

ISSN 0869-8139

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ИМЕНИ И. М. СЕЧЕНОВА



Том 109, № 11
октябрь
2023



СОДЕРЖАНИЕ

ТРАДИЦИОННЫЕ И НОВЫЕ АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ МОДЕЛЬНЫЕ ОРГАНИЗМЫ В ТРАНСЛЯЦИОННЫХ НЕЙРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

От редактора спецвыпуска

Трансляционные кросс-таксонные и кросс-доменные исследования ЦНС <i>А. В. Калугев</i>	1519
--	------

Обзорные и проблемные статьи

Молекулярно-генетические механизмы регуляции циркадных ритмов и их роль в психопатологиях <i>К. В. Смирнова, Н. Д. Чижова, Е. В. Герасимова, А. В. Калугев, Т. Г. Амтиславская</i>	1522
Моделирование таупатий на <i>Danio rerio</i> <i>М. М. Котова, Т. О. Колесникова, А. В. Калугев</i>	1547
Экспериментальные модели нарушений ЦНС при развитии болезней лизосомального накопления <i>А. С. Лебедев, М. М. Котова, Т. О. Колесникова, Д. С. Галстян, А. В. Калугев</i>	1567
Роль вариабельности генов моноаминовых транспортеров человека в спортивной физиологии <i>А. В. Черепанова, Я. Р. Бравый, А. В. Карабельский, М. М. Котова, Т. О. Колесникова, А. В. Калугев</i>	1584
Экспериментальные модели синаптопатий на основе рыб зебраданио <i>А. С. Лебедев, М. М. Котова, Н. П. Ильин, Т. О. Колесникова, Д. С. Галстян, Т. В. Вьюнова, Е. В. Петерсен, А. В. Калугев</i>	1601
Экспериментальные модели митохондриальных дисфункций при патогенезе болезней ЦНС на зебраданио <i>Л. В. Юшко, М. М. Котова, Т. В. Вьюнова, А. В. Калугев</i>	1617

Экспериментальные статьи

Влияние острого и хронического недосыпания на рабочую и долговременную память у крыс <i>М. В. Чернышев, М. А. Гузев, И. В. Екимова</i>	1635
У самок мышей нокаут по гену TAAR1 отсутствует ранний поведенческий ответ на острый иммобилизационный стресс <i>Е. П. Виноградова, Ю. А. Симон, А. Ю. Александров, В. М. Князева, Л. Н. Станкевич, А. В. Козырева, А. А. Александров</i>	1650
Фармакоэнцефалографическая оценка дозозависимости эффектов антипсихотических средств у крыс <i>Ю. И. Сысоев, Д. Д. Шиц, М. М. Пучик, И. С. Князева, М. С. Корелов, В. А. Приходько, И. А. Титович, Н. О. Селизарова, С. В. Оковитый</i>	1665
Фармакологическое ингибирование активности водного канала AQP4 вызывает усиление альфа-синуклеиновой патологии в черной субстанции в модели болезни Паркинсона у крыс <i>К. В. Лапина, М. В. Ханина, М. П. Кайсманова, И. В. Екимова</i>	1684

Поведенческие, геномные и нейрохимические нарушения в модели нейротравмы на взрослых рыбах зебрании (*Danio rerio*)

Н. П. Ильин, Д. С. Галстян, К. А. Демин, А. В. Калусев

1699

Юбилей Алана Валерьевича Калусева

1718

CONTENTS

Editorial

Translational Cross-Taxon and Cross-Domain CNS Studies <i>A. V. Kalueff</i>	1519
--	------

Reviews

Molecular Genetic Mechanisms of Circadian Rhythm Regulation and Their Role in Psychopathology <i>K. V. Smirnova, N. D. Chizhova, E. V. Gerasimova, A. V. Kalueff, and T. G. Amstislavskaya</i>	1522
Modeling Taupathies in Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) <i>M. M. Kotova, T. O. Kolesnikova, and A. V. Kalueff</i>	1547
Experimental Models of CNS Deficits in Lysosomal Storage Diseases <i>A. S. Lebedev, M. M. Kotova, T. O. Kolesnikova, D. S. Galstyan, and A. V. Kalueff</i>	1567
The Role of Variability in Monoamine Transporter Genes in Sports Physiology <i>A. V. Cherepanova, Y. R. Bravy, A. V. Karabelsky, M. M. Kotova, T. O. Kolesnikova, and A. V. Kalueff</i>	1584
Experimental Models of Synaptopathies Based on Zebrafish <i>A. S. Lebedev, M. M. Kotova, N. P. Ilyin, T. O. Kolesnikova, D. S. Galstyan, T. V. Vyunova, E. V. Petersen, and A. V. Kalueff</i>	1601
Experimental Models of Mitochondrial Dysfunction Disorders in the Pathogenesis of CNS Diseases on Zebrafish <i>L. V. Yushko, M. M. Kotova, T. V. Vyunova, and A. V. Kalueff</i>	1617

Experimental Articles

Effect of Acute and Chronic Sleep Deficit on Working and Long-Term Memory in Rats <i>M. V. Chernyshev, M. A. Guseev, and I. V. Ekimova</i>	1635
Mice Lacking TAAR1 Show No Early Behavioral Response to Acute Restraint Stress <i>E. P. Vinogradova, Yu. A. Simon, A. Yu. Aleksandrov, V. M. Knyazeva, L. N. Stankevich, A. V. Kozyreva, and A. A. Aleksandrov</i>	1650
Pharmacoecephalographic Assessment of Antipsychotic Agents' Effect Dose-Dependency in Rats <i>Yu. I. Sysoev, D. D. Shits, M. M. Puchik, I. S. Knyazeva, M. S. Korelov, V. A. Prikhodko, I. A. Titovich, N. O. Selizarova, and S. V. Okovityi</i>	1665
Pharmacological Inhibition of the AQP4 Water Channel Activity Causes an Aggravation of Alpha-Synuclein Pathology in the Substantia Nigra in a Rat Model of Parkinson's Disease <i>K. V. Lapshina, M. V. Khanina, M. P. Kaismanova, and I. V. Ekimova</i>	1684
Behavioral, Genomic and Neurochemical Deficits Evoked by Neurotrauma in Adult Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) <i>N. P. Ilyin, D. S. Galstyan, K. A. Demin, and A. V. Kalueff</i>	1699
Jubilee of RAS Professor Allan V. Kalueff	1718

ОТ РЕДАКТОРА
СПЕЦВЫПУСКА

ТРАНСЛЯЦИОННЫЕ КРОСС-ТАКСОННЫЕ
И КРОСС-ДОМЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЦНС

© 2023 г. А. В. Калуев^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, *}

¹Научный центр мирового уровня “Центр персонализированной медицины”,
Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова МЗ РФ,
Санкт-Петербург, Россия

²Институт экспериментальной медицины, Национальный медицинский исследовательский
центр им. В.А. Алмазова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

³Институт трансляционной биомедицины,
Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

⁴Группа преклинического биоскрининга, Российский научный центр радиологии
и хирургических технологий им. акад. Гранова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

⁵Направление “Нейробиология”, Научный центр генетики и наук о жизни,
Научно-технологический университет “Сириус”, Федеральная территория Сириус, Россия

⁶Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия

⁷Лаборатория трансляционной биопсихиатрии НИИ нейронаук и медицины,
Новосибирск, Россия

*E-mail: avkalueff@gmail.com

Поступила в редакцию 02.10.2023 г.

После доработки 04.10.2023 г.

Принята к публикации 04.10.2023 г.

DOI: 10.31857/S0869813923110055, EDN: GUYNHA

Лечение заболеваний центральной нервной системы (ЦНС), а также изучение фундаментальных особенностей ее функционирования является важной задачей современной биомедицины. В настоящем специальном выпуске собраны нейробиологические исследования, посвященные изучению функций и патологии ЦНС как на традиционных, так и альтернативных модельных организмах. Задача данного спецвыпуска заключалась в том, чтобы подчеркнуть важность эволюционно-физиологического подхода к изучению ЦНС, в том числе эволюционно-консервативных свойств нервной системы, общих патофизиологических механизмов, а также трансляции данных между разными видами с позиций межвидовой сравнительной нейробиологии. Основоположником данного подхода — то есть того, что сейчас часто называют “трансляционной нейронаукой”, по праву является наш знаменитый физиолог Леон Абгарович Орбели. В статьях, собранных в настоящем спецвыпуске, в очередной раз продемонстрированы значимость и жизненность идей Л.А. Орбели. При этом особое внимание в спецвыпуске уделено изучению молекулярных основ ЦНС [1–4] и работам, использующим новые методы и модельные организмы [5–9].

Изучению многих из данных вопросов посвятил свою плодотворную научную деятельность наш коллега и друг, крупный отечественный физиолог, главный научный сотрудник лаборатории сравнительной термофизиологии Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, д. б. н. Юрий Федотович Пастухов (1936–2022). Научный вклад Ю.Ф. Пастухова и его лаборатории в

сравнительную физиологию и патофизиологию полагаю необходимым в рамках данного спецвыпуска [2, 3] подчеркнуть особо.

Существующие классификации заболеваний ЦНС традиционно основывались на нозологических единицах — конкретных синдромах, часто перекрывающихся, но обычно рассматривающихся как отдельные, цельные болезни. Такой подход господствовал на протяжении десятилетий: например, эпилепсия рассматривалась независимо от аутизма, болезнь Альцгеймера — вне круга аффективных расстройств, а психические заболевания в целом — отдельно от болезней неврологических. Однако за последние годы произошли важные “тектонические” изменения в нашем понимании процессов патогенеза заболеваний ЦНС. Например, становится очевидным перекрывание на уровне генетики и молекулярных механизмов многих распространенных болезней мозга. Так, униполярную депрессию можно рассматривать в контексте перекрывающегося спектра вместе с биполярной депрессией и, в конечном итоге, шизофренией. Понимание перекрывания основных нейробиологических доменов — эмоций, когний, социального поведения, двигательной активности и ряда других — позволило по-новому взглянуть на динамику мозговых процессов: например, при переходе от тревоги к депрессии или от биполярной депрессии к шизофрении. Общность симптомов болезней ЦНС неизбежно поднимает вопрос о перекрывании их молекулярных и генетических факторов.

Важным концептуальным подходом является предложенная Национальными институтами здоровья США концепция критериев исследовательских доменов (Research Domain Criteria, RDOCs), согласно которым магистральными направлениями для изучения болезней мозга является кросс-доменная нейробиология, которая разрушает границы между отдельными заболеваниями и группами, но прокладывает широкие рельсы для будущих исследователей на основе общности патофизиологических механизмов. К примеру, вместо отдельного рассмотрения эпилепсии, задержки развития ЦНС и когнитивных нарушений такими магистральными направлениями могут быть синаптопатии, таупатии, или болезни лизосомального накопления, объединяющие эти и ряд других заболеваний мозга.

Вторым актуальным стратегическим направлением исследований мозга является расширение спектра биологических видов для изучения физиологических и патофизиологических процессов ЦНС. Собранные в настоящем выпуске журнала статьи в полной мере раскрывают важность использования новых модельных организмов в современной физиологии. Учитывая, что большинство экспериментальных нейробиологических исследований в мире проводится с использованием моделей на грызунах, большое значение имеет расширение биологического и видового репертуара применяемых модельных организмов — например, более активное использование в нейробиологии рыб зебрданию (zebrafish) и других позвоночных, а также беспозвоночных. Среди подходов, освященных в данном выпуске, следует отметить использование генетических моделей, анализ роли сна в процессах ЦНС, применение методов фармакологической коррекции на грызунах и рыбах зебрданию, а также исследования роли генетических детерминант у человека в спорте. Повышение эволюционной диверсификации и увеличение разнообразия моделей крайне важны для получения полноценной картины физиологии мозга в норме и патологии. Это позволяет определить эволюционно-консервативные черты патологии данных заболеваний, а также лучше понять природу межвидовой вариативности многих нейробиологических функций.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана Министерством науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2022-301 от 20.04.2022).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Смирнова КВ, Чижова НД, Герасимова ЕВ, Калуев АВ, Амстиславская ТГ (2023) Молекулярно-генетические механизмы регуляции циркадных ритмов и их роль в психопатиях. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 109(11): 1522–1546. [Smirnova KV, Chizhova ND, Gerasimova EV, Kalueff AV, Amstislavskaya TG (2023) Molecular genetic mechanisms of circadian rhythm regulation and its role in psychopathies. Russ J Pysiol 109(11): 1522–1546. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0869813923110109>
2. Лапшина КВ, Ханина МВ, Кайсманова МП, Екимова ИВ (2023) Фармакологическое ингибирование активности водного канала AQP4 вызывает усиление альфа-синуклеиновой патологии в черной субстанции в модели болезни Паркинсона у крыс. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 109(11): 1684–1698. [Lapshina KV, Hanina MV, Kajsmanova MP, Ekimova IV (2023) Pharmacological inhibition of AQP4 water channel activity causes increased alpha-synuclein pathology in the substantia nigra in a rat model of Parkinson's disease. Russ J Pysiol 109(11): 1684–1698. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0869813923110079>
3. Чернышев МВ, Гузеев МА, Екимова ИВ (2023) Влияние острого и хронического недосыпания на рабочую и долговременную память у крыс. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 109(11): 1635–1649. [Chernyshev MV, Guzeev MA, Ekimova IV (2023) Effects of acute and chronic sleep deprivation on working and long-term memory in rats. Russ J Pysiol 109(11): 1635–1649. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0869813923110031>
4. Виноградова ЕП, Симон ЮА, Александров АЮ, Князева ВМ, Станкевич ЛН, Козырева АВ, Александров АА (2023) У мышей нокаут по гену TAAR1 отсутствует ранний поведенческий ответ на острый иммобилизационный стресс. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 109(11): 1650–1664. [Vinogradova EP, Simon JA, Aleksandrov AY, Knyazeva VM, Stankevich LN, Kozyreva AV, Aleksandrov AA (2023) TAAR1 gene knockout mice lack an early behavioral response to acute immobilization stress. Russ J Pysiol 109(11): 1650–1664. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0869813923110122>
5. Сысов ЮИ, Шитц ДД, Пучик ММ, Князева ИС, Корелов МС, Приходько ВА, Селизарова НО, Оковитый СВ (2023) Фармакоэнцефалографическая оценка дозозависимости эффектов антипсихотических средств у крыс. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 109(11): 1665–1683. [Sysoev YI, Shits DD, Puchik MM, Knyazeva MS, Prikhodko VA, Selizarova NO, Okovityi SV (2023) Pharmacoencephalographic evaluation of the dose-dependent effects of antipsychotic drugs in rats. Russ J Pysiol 109(11): 1665–1683. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0869813923110110>
6. Котова ММ, Колесникова ТО, Калуев АВ (2023) Моделирование таупатий на *Danio rerio*. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 109(11): 1547–1566. [Kotova MM, Kolesnikova TO, Kalueff AV (2023) Modeling of tauopathies on zebrafish (*Danio rerio*). Russ J Pysiol 109(11): 1547–1566. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0869813923110067>
7. Лебедев СА, Котова ММ, Колесникова ТО, Галстян ДС, Калуев АВ (2023) Экспериментальные модели нарушений ЦНС при развитии болезней лизосомального накопления. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 109(11): 1567–1583. [Lebedev SA, Kotova MM, Kolesnikova TO, Galstyan DS, Kalueff AV (2023) Experimental models of CNS abnormalities in the development of lysosomal accumulation diseases. Russ J Pysiol 109(11): 1567–1583. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0869813923110080>
8. Ильин НП, Галстян ДС, Демин КА, Калуев АВ (2023) Поведенческие, геномные и нейрохимические нарушения в модели нейротравмы на взрослых рыбах зебраданию (*Danio rerio*). Рос физиол журн им ИМ Сеченова 109(11): 1699–1717. [Ilyin NP, Galstyan DS, Demin KA, Kalueff AV (2023) Behavioral, genomic and neurochemical abnormalities in a model of neurotrauma in adult zebrafish (*Danio rerio*). Russ J Pysiol 109(11): 1699–1717. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0869813923110043>
9. Юшко ЛВ, Котова ММ, Вьюнова ТВ, Калуев АВ (2023) Экспериментальные модели митохондриальных дисфункций при патогенезе болезней ЦНС на зебраданию. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 109(11): 1617–1634. [Yushko LV, Kotova MM, Viunova TV, Kalueff AV (2023) Experimental models of mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of CNS diseases at zebrafish. Russ J Pysiol 109(11): 1617–1634. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0869813923110146>

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ
ЦИРКАДНЫХ РИТМОВ И ИХ РОЛЬ В ПСИХОПАТОЛОГИЯХ

© 2023 г. К. В. Смирнова^{1, 2, *}, Н. Д. Чижова^{1, 2}, Е. В. Герасимова³,
А. В. Калужев^{1, 2, 3, 4, 5, 6}, Т. Г. Амстиславская^{1, 2, **}

¹ Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Научно-технологический университет “Сириус”, Сочи, Россия

⁴ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

⁵ Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия

⁶ Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова МЗ РФ,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: vedelina@mail.ru

**E-mail: amstislavskaytg@neuronm.ru

Поступила в редакцию 07.12.2022 г.

После доработки 12.01.2023 г.

Принята к публикации 14.01.2023 г.

Циркадные (циркадианные) ритмы представляют собой циклические колебания интенсивности биологических процессов, связанные со сменой дня и ночи, к которым в ходе эволюции приспособились многие живые организмы. Нарушения циркадных ритмов провоцируются как факторами среды (смена часового пояса или продолжительности дня и ночи), так и поломками во внутренней регуляции циклов (мутации ключевых “часовых” генов). Эти изменения могут приводить к патогенезу различных заболеваний, в том числе психопатологий. Поскольку механизмы, лежащие в основе циркадной регуляции, достаточно консервативны, для большего понимания этих процессов и их связи с психопатологиями активно используют экспериментальные модели *in vivo*. В настоящем обзоре рассмотрены вопросы регуляции циркадных ритмов, а также их межтаксонные сходства и различия у млекопитающих и костных рыб (на примере широко используемых в биомедицине рыб зебрданнио, *Danio rerio*). В работе обсуждаются современные представления о молекулярно-генетических механизмах, лежащих в основе регуляции циркадных ритмов, и их взаимосвязь с патогенезом психических расстройств у человека и модельных организмов.

Ключевые слова: циркадные ритмы, аффективные расстройства, моделирование психопатологии, экспериментальные модели, грызуны, зебрданнио

DOI: 10.31857/S0869813923110109, **EDN:** GNPRKI

ВЕДЕНИЕ

Циркадные (циркадианные) ритмы представляют собой широкий спектр поведенческих, гормональных и биохимических процессов, возникающих под влиянием изменения длительности светового дня [1]. В головном мозге позвоночных существует главный водитель ритма – парное супрахиазматическое ядро гипоталамуса (SCN), которое контролирует биоритмы всех систем органов, тканей и клеток организма, определяя время основных физиологических событий (пищеварения,

сна и бодрствования, моторной активности и др.) [2]. На молекулярном уровне регуляция циркадных ритмов представляет собой петлю отрицательной обратной связи. Ключевыми ее участниками выступают транскрипционные факторы CLOCK и BMAL1 — позитивные регуляторы экспрессии генов *period* (*Per*), *cryptochrome* (*Cry*) и *reverseerythoblastoma* (*Rev-Erba* α/β), белковые продукты которых, в свою очередь, являются репрессорами транскрипции *Clock* и *Bmal1* (*Arntl1*) [1].

Люди с определенными полиморфизмами в генах циркадной регуляции имеют предрасположенность к психическим расстройствам, которые также могут возникать при нарушении циркадных ритмов вследствие частых перелетов или работы в ночную смену [3, 4]. Высокая степень эволюционной консервативности процессов циркадной регуляции у разных видов позвоночных позволила создать валидные экспериментальные модели психопатологий с генетическим или средовым нарушением циркадных ритмов [1]. И хотя в качестве классического объекта для таких исследований используют грызунов, все чаще для изучения функций мозга начинают использовать пресноводных костных рыб зебранию (*zebrafish*, *Danio rerio*) [5, 6].

В настоящем обзоре рассмотрены современные данные о связи циркадных ритмов и психопатологий, в качестве факторов патогенеза которых выступают полиморфизмы циркадных генов и средовые нарушения суточных ритмов. Обсуждаются также экспериментальные (животные) модели психопатологий, связанные с поломками циркадных ритмов позвоночных. В работе показана общность молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе регуляции циркадных ритмов у эволюционно отстоящих друг от друга классов (млекопитающих и костных рыб), что открывает возможности для развития направления трансляционной биологии и использования полученных данных в практической медицине.

РОЛЬ СВЕТА В ЦИРКАДНОЙ АКТИВНОСТИ СИСТЕМ ОРГАНИЗМА

Главный внешний фактор, влияющий на циркадные ритмы — это изменение окружающего освещения, которое оказывает влияние на SCN. У млекопитающих это ядро получает световые сигналы от специальных клеток сетчатки — меланопсин-экспрессирующих фоточувствительных ганглиозных клеток (ipRGC), дающих проекции в мозг, тем самым опосредуя широкий спектр зрительных функций [7]. Меланопсин, связанный с G-белком, возбуждается светом, в результате чего мембраны ipRGC деполяризуются, модулируя физиологические и поведенческие процессы [8]. IpRGC характерны для многих позвоночных, в т.ч. зебранию. И хотя их устройство и принцип работы похожи у представителей разных таксонов, имеются некоторые различия в генах, кодирующих меланопсин. В частности у млекопитающих он кодируется всего одним геном из семейства *Opn4m*, тогда как у рыб (зебранию) — тремя генами из семейства *opn4m* и двумя генами из семейства *opn4x* [9].

Важно отметить, что меланопсин млекопитающих имеет максимум абсорбции при длине волны 467 нм (синий свет), после чего он преобразуется в продукт с максимумом абсорбции при 476 нм (синий свет). Существует также особое состояние меланопсина — экстремеланопсин, который образуется при длинноволновом свете более 575 нм (от желтого до красного света) и может возвращаться в обычное состояние после воздействия синего света [10]. Это важно в установке циркадного ритма млекопитающих, поскольку SCN в большей степени отслеживает изменения спектрального состава света между синим и желтым, нежели интенсивность освещения [11]. В целом широкая спектральная чувствительность ipRGC достигает максимума при 460 нм, что аналогично распределению длин волн в сумерках [8]. В отличие от млекопитающих, все пять генов меланопсинов зебранию кодируют функциональный фотопигмент с пиковой спектральной чувствительностью в диа-

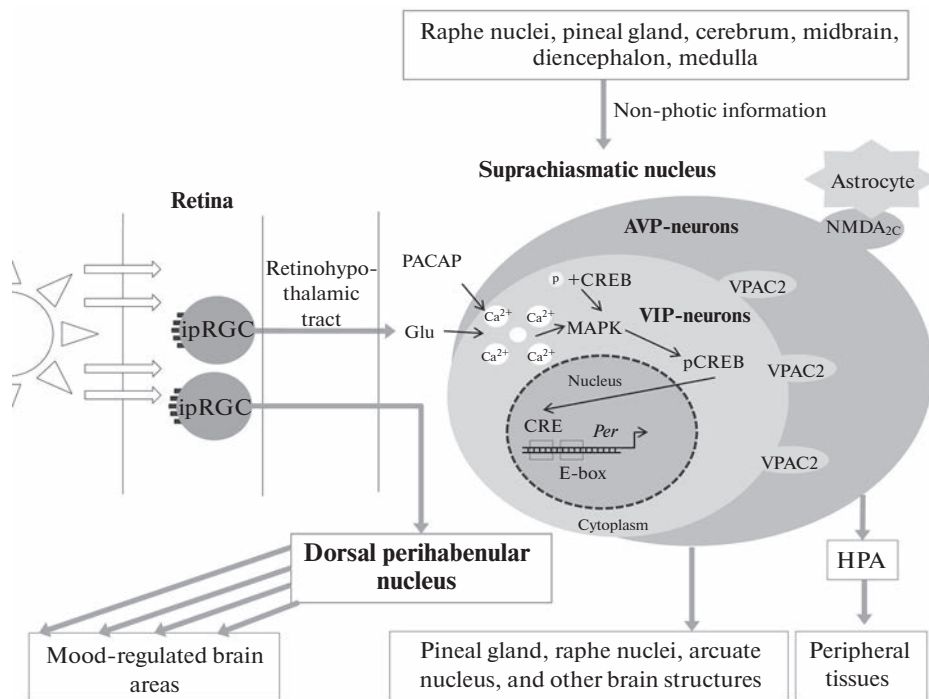


Рис. 1. Иерархическое устройство циркадной системы млекопитающих и запуск циркадных колебаний светом через ipRGC. Белые стрелки – воздействие света, серые – проекции нейронов, черные – биохимические пути внутри SCN.

пазоне от 470 до 484 нм, при этом гены *orn4m-1* и *orn4m-3* демонстрируют бистабильность, как у беспозвоночных, где хромофор сетчатки меняет цис- и транс-меры, а продукты активности *orn4m-2*, *orn4x-1* и *orn4x-2* являются моностабильными и функционируют скорее как классические фотопигменты позвоночных [9]. Периферические клетки зебрадании также экспрессируют большое количество различных опсинов и реагируют на разные длины волн, способные запускать экспрессию циркадных генов, включая ультрафиолетовое и инфракрасное излучение [12].

Характерной чертой млекопитающих является иерархическое устройство циркадной системы, где SCN играет роль главного водителя ритма (рис. 1). Полученные от ipRGC сигналы моносинаптически передаются по ретиногипоталамическому тракту в SCN. Ядро представляет собой гетерогенную структуру, чьи нейроны анатомически и функционально разделены на две области: вентромедиальную сердцевину и дорзолатеральную оболочку, основными нейропептидами которых являются вазоактивный интестинальный полипептид (VIP) и аргинин-вазопрессин (AVP) соответственно [13]. Нейроны SCN могут также содержать тормозный нейромедиатор – гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК) [14, 15]. VIP-содержащие нейроны после получения информации от сетчатки дают проекции в AVP-содержащие клетки SCN. Посредством рецепторов VPAC2 они удерживают синхронизацию клеточной активности ядра в целом [13, 16]. AVP-содержащие нейроны координируют другие структуры мозга и органы через нейроэндокринную гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую ось (HPA), согласовывая поведенческие и

физиологические ритмы [17, 18]. При этом ipRGC сетчатки могут давать проекции не только в SCN, поскольку у мышей было показано, что сигналы от ipRGC могут поступать в дорзальное перихабенулярное ядро, а оттуда в прилежащее ядро (NAc), тем самым участвуя в регуляции поведения [19].

SCN имеет связи со множеством зон мозга, наиболее значимой из которых является шишковидная железа, вырабатывающая мелатонин. Нарушение этих связей в результате нейродегенеративных процессов приводит к нарушению циркадных ритмов [15]. Помимо этого, ядро отсылает проекции в другие зоны гипоталамуса, серотонинергические ядра шва и дугообразное ядро [20–22]. SCN также получает дополнительные входы от ядер шва (через шовно-гипоталамический тракт), от шишковидной железы и от многочисленных областей конечного, промежуточного, среднего и продолговатого мозга, обеспечивая взаимосвязь циркадных ритмов и поведения [23].

Важно отметить, что активность SCN регулируется не только нейронами, но и астроцитами. Так, например, нейроны SCN проявляют активность в течение светового дня, а астроциты работают ночью и могут подавлять активность нейронов дорзальной части SCN через регуляцию комплекса пресинаптических глутаматергических N-метил-D-аспартатных рецепторов NMDA_{2C} [24]. Поскольку астроциты, как и глия в целом, активно вовлечены в развитие психопатологий, такое взаимодействие с SCN порождает дополнительную связь между циркадными ритмами и поведенческими нарушениями [25].

В отличие от млекопитающих, у костных рыб светочувствительные клетки расположены по всему телу, а сама циркадная система децентрализована. Внутри мозга костных рыб обнаружены глубинно расположенные фоторецепторы, например, в таламусе обнаружена экспрессия некоторых генов опсинов, в том числе *va-opsin*, *val-opsin*, *tmt-opsin* и *opn4* [26]. В других областях также обнаружены фоторецепторы [27]. Фоточувствительные нейроны преоптической области личинок зебрании позволяют им улавливать свет даже в отсутствие глаз, они вовлечены в реакцию поиска света и участвуют в выборе стратегии поведения при этом поиске [28, 29]. Активность глубинно расположенных фоторецепторов костных рыб может изменяться в течение дня [30]. Тем не менее, функции этих рецепторов в циркадной регуляции остаются малоизученными, что представляет собой интересную область для кросс-таксонных нейробиологических исследований.

Основные зоны мозга, вовлеченные в циркадную регуляцию у рыб, не являются необходимыми для функционирования ритмов периферических тканей [31]. У рыб уже в первые 16 ч после оплодотворения световой режим влияет на ритм экспрессии некоторых мРНК, тогда как шишковидная железа формируется на 3–4 дня позже [32]. Эта особенность существенно отличает костных рыб от млекопитающих, у которых синхронизация ритмов происходит во время эмбрионального и раннего неонатального развития за счет циркадной системы матери, которая координирует синхронизацию циркадных часов в SCN плода [33]. Несмотря на децентрализованность циркадной системы у костных рыб, у них есть области мозга, аналогичные SCN млекопитающих, которые также могут получать информацию как от сетчатки, так и от других структур мозга, в частности шишковидной железы. Далее информация передается в передний и средний мозг, а также в переднее прегломерулярное ядро. При этом шишковидная железа рыб имеет свой собственный осциллятор и может функционировать без SCN, совершая ритмическую выработку мелатонина и определяя ритмические паттерны поведения. Поскольку большинство мишеней шишковидной железы зебрании, по-видимому, являются преоптическими и прецеребеллярными центрами, то ее проекции участвуют в световой и циркадной модуляции этих центров [27, 34, 35]. Таким образом, существует базовое сходство в структурах мозга и их функциональных связях между зебранией и

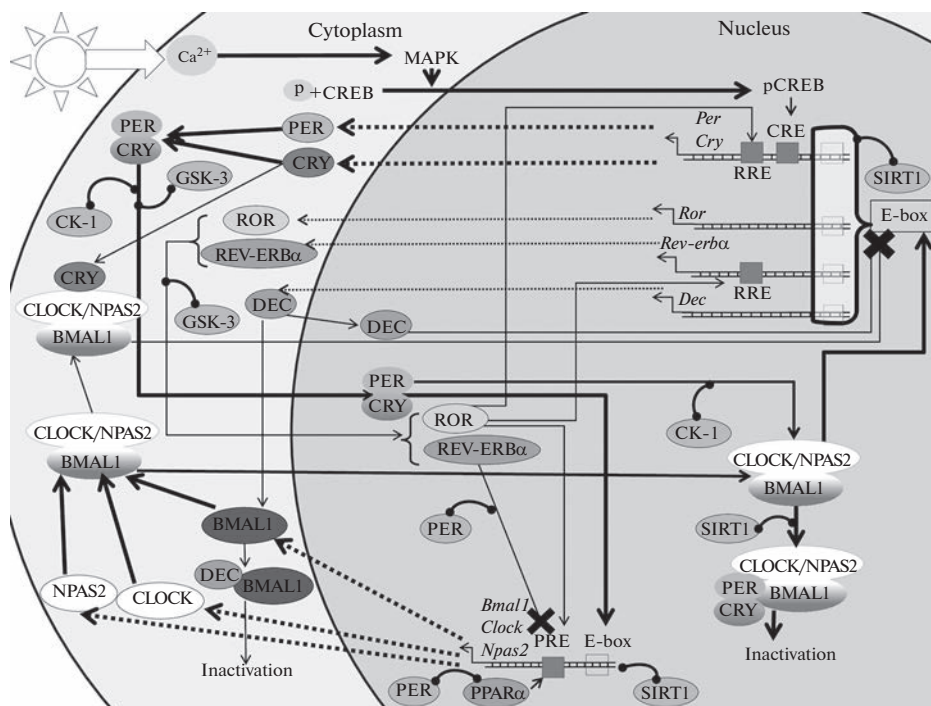


Рис. 2. Молекулярные механизмы циркадных часов млекопитающих. Толстые сплошные и прерывистые стрелки иллюстрируют основные молекулярные пути, тонкие — дополнительные. Прерывистые стрелки — выход мРНК из ядра и трансляция. Крест — блокирование транскрипции. Отрезки с круглым окончанием обозначают содействие процессу определенными белками. Прямоугольные участки на ДНК — промоторы.

млекопитающими, позволяя использовать их как экспериментальные модели для исследования циркадных процессов.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЦИРКАДНЫХ ЧАСОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ И КОСТНЫХ РЫБ

Биохимические компоненты циркадных часов различаются в зависимости от таксона, но основаны на ритмичном изменении концентрации факторов по принципу отрицательной обратной связи (рис. 2.). Это колебание управляет суточными паттернами экспрессии генов, которые регулируют метаболические ритмы клеток организма [1, 36]. Циркадные часы большинства позвоночных имеют несколько основных транскрипционных факторов, участвующих в суточных осцилляциях: CLOCK и BMAL1 — активаторы транскрипции циркадных генов и семейства белков PER и CRY — репрессоры транскрипции [1].

У млекопитающих клеточные осцилляции запускаются светом через ретиногипоталамический тракт с помощью глутамата, который увеличивает внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в нейронах SCN, тем самым активируя MAPK-сигнальный каскад. Предположительно, в этом процессе принимает участие пептид, активирующий аденилатциклазу гипофиза (PACAP) [37–39]. Это приводит к фосфорилированию транскрипционного фактора CREB и его транслокации в ядро, где он связывается с элементом CRE на промоторе ряда генов, в том числе *Per* [37, 38]. В те-

чение дня в цитоплазме накапливаются белки PER, они образуют комплекс с CRY и транслоцируются в ядро, где активируют транскрипцию *Bmal1* и *Clock* [40, 41]. Важно отметить, что PER нуждается в CRY для своего ядерного транспорта, тогда как CRY могут проходить в ядро самостоятельно [42]. Экспрессия *Bmal1* регулируется не только за счет PER2, но и благодаря ROR-элементу (RRE) на промоторе этого гена. Так, REV-ERB α играет ключевую роль в регуляции колебаний экспрессии *Bmal1*, ингибируя его транскрипцию, а белок ROR α активирует ее, связываясь с RRE [43]. Аналогично регулируется экспрессия других часовых генов, *Npas2* и *Clock* [44].

PER2 способен напрямую взаимодействовать с ядерными рецепторами REV-ERB α или PPAR α на RRE промоторах *Bmal1*, действуя как корепрессор или коактиватор соответственно [41]. Гетеродимер белков CLOCK (или его паралог NPAS2) и BMAL1 способны связываться с E-бокс-регуляторным элементом на промоторах различных генов, в том числе *Rev-erb α* , *Ror*, *Per*, *Dec* и *Cry*, активируя их транскрипцию. Накопление белков PER и CRY, их последующая димеризация, транспорт в ядро и присоединение к комплексу CLOCK:BMAL1 нарушает связь последнего с промоторами генов и останавливает транскрипцию [45, 46]. CRY способны связываться с CLOCK:BMAL1 в цитоплазме и блокировать активацию генов мишеней CLOCK:BMAL1, не нарушая при этом связи комплекса с промоторами [46, 47]. *Dec1* и *Dec2* представляют собой гены, кодирующие факторы транскрипции bHLH (Basic-helix-loop-helix), которые ингибируют *Per* и свою собственную транскрипцию за счет связывания с белком BMAL1 и/или конкуренции с CLOCK:BMAL1 за последовательности E-бокса на своих собственных промоторах. Считается, что эти молекулярные петли обеспечивают стабильность молекулярных часов и их точную настройку [36]. Так, DEC1,2 совместно с белком CHRONO контролирует длину циркадного периода в SCN новорожденных мышей. CHRONO участвует в объединении клеточных колебаний с разными периодами, а DEC1,2 удлиняет период раннего неонатального периода за счет интеграции клеточных ритмов [48].

Циркадный осциллятор зебрании во многом схож с таковым у млекопитающих. Главным различием в его молекулярных механизмах является то, что костные рыбы в ходе эволюции претерпели дупликацию генома, что оказало влияние на циркадную генетику. Так, например, зебрании имеют по 2 копии генов *arntl1* (*arntla* и *arntl1b*, или *bmal1a/b*) и *clock* (*clock* и *clock-3*), однако эти копии имеют сходную циркадную фазу [49]. Тем не менее у костных рыб обнаружена диверсифицированная регуляция экспрессии среди многих копий канонических часовых генов, что проявляется в тканеспецифических паттернах экспрессии в ответах на внутренние и внешние стимулы. В итоге, эти различия, вероятно, отражают неравномерность влияния суточных факторов на метаболизм и клеточные процессы в центральных и периферических тканях рыб [50]. Если кратко представить молекулярный осциллятор зебрании, то процесс похож на таковой у млекопитающих, еще раз подтверждая консервативность процессов циркадной регуляции. В частности, гетеродимер CLOCK:BMAL1 активирует транскрипцию генов *per2* и *cryla*, их белковые продукты димеризуются, соединяются с комплексом CLOCK:BMAL1, что подавляет активацию транскрипции этих генов [32]. Белок Per2 играет двойную роль в регуляции циркадных часов зебрании. Он репрессирует экспрессию гена шишковидной железы арилалкиламин N-ацетилтрансферазы 2 (*aanat2*) через E-бокс и снижает/усиливает экспрессию *arntl1b* посредством связывания с Rev-erb/Ror α соответственно.

Более того, Per2 рыб зебрании, по-видимому, также выполняет тканеспецифические регуляторные роли во многих периферических органах и имеет решающее значение для поддержания циркадной регуляции в сердце и печени [51]. Для зебрании также важна передача по сигнальному пути TGF- β для нормальной

функции циркадных часов, поскольку TGF- β -сигналинг оказывает влияние на фазу экспрессии *per1b* [52]. У млекопитающих данный путь участвует в сопряжении периферических тканей, опосредуя паракринную настройку фазы молекулярных часов и регулируя транскрипции основных часовых генов [53]. Сходство процессов циркадной регуляции рыб и млекопитающих в очередной раз указывает на эволюционную древность этих механизмов.

Следует отметить, что фазы экспрессии циркадных генов могут различаться у дневных и ночных животных — как, например, происходит у мышей (*Mus musculus*, ведущих преимущественно ночной образ жизни) и бабуинов (*Papio anubis*, представителей дневных животных), пики экспрессии основных часовых генов которых различаются по фазе примерно на 12 ч. Гены *Bmal1* и *Per1* у приматов показывают пики экспрессии вечером и утром соответственно, тогда как у мышей эти пики демонстрируют обратную картину в большинстве тканей организма. Интересно, что *Cry1* отличается от других генов: средняя фаза его экспрессии у бабуинов приходится на конец дня, а у мышей задерживается на 7 ч до пика после полуночи. Важно отметить, что в SCN в отличие от других тканей фаза экспрессии компонентов циркадных часов мышей не отличается от таковой у бабуинов. Так, фаза пика экспрессии *Bmal1* одинаково приходится на ранний вечер и у бабуинов, и у мышей, а фазы экспрессии *Per1* и *Cry2* проходят через 6 и 12 ч соответственно [54]. Это показывает, что в периферических тканях млекопитающих происходит сложная настройка суточных ритмов, как упоминалось выше, и этот фактор следует учитывать при планировании экспериментов.

ПОСТТРАНСКРИПЦИОННЫЕ И ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ В РЕГУЛЯЦИИ СУТОЧНЫХ РИТМОВ

Большую роль в циркадной регуляции играют посттранскрипционные и посттрансляционные модификации. Например, менее 30% мРНК циркадных генов регулируются транскрипцией *de novo*, что предполагает существование механизмов посттранскрипционной циркадной регуляции [55]. Доказательством этому служит то, что некоторые мРНК-редактирующие ферменты имеют ритмическую экспрессию [56]. Так, нарушение образования кэп-структуры на 5'-конце молекулы мРНК у мышей приводит к пролонгированию циркадного периода часовых генов [57]. Стабильность циркадных мРНК может регулироваться посредством модуляции длины поли(А)-хвоста. Ген *Cnot1*, кодирующий каркасный белок деаденилазного комплекса CCR4-NOT, экспрессируется на высоком уровне в супрахиазматическом ядре. Дефицит белка CNOT1 у мышей приводит к удлинению циркадного периода и изменению паттернов экспрессии мРНК и белков различных часовых генов, в основном *Per2*. Кроме того, CNOT1 связывается с мРНК *Per2* через РНК-связывающий белок BRF1 (ZFP36L1), а нокдаун *Brf1* приводит к повышению уровня экспрессии *PER2* [58].

Большую роль в процессах посттранскрипционной регуляции играет альтернативный сплайсинг. Например, пре-мРНК гена *Per2* альтернативно сплайсируется в соответствии с суточными ритмами, а вариант белка PER2S связан с нарушением организации ядрышка, которое действует как стимул, запускающий циркадные колебания [59]. Процессы посттранскрипционных модификаций хорошо изучены на млекопитающих, но не на зебрадании, что указывает на важность изучения особенностей циркадной регуляции рыб.

Посттрансляционные модификации и их роль в регуляции циркадных часов изучены более активно как у млекопитающих, так и у рыб (табл. 1). Одна из главных ролей в регуляции циркадных белков принадлежит кazeинкиназам 1-го типа (СК-1) — семейству эволюционно консервативных киназ, регулирующих большое

Таблица 1. Посттрансляционная регуляция циркадных белков с помощью CK-1, GSK-3 и SIRT1

Регулятор	PER	CRY	REV-ERB	BMAL1	CLOCK
CK-1	(Ser487) Деградация [63] (Ser662) Стабилизация [64]	Комплекс с PER, GAPVD1 Транслокация в ядро [69]	—	—	Совместно с CK-2 и PER2 Дестабилизация комплекса CLOCK:BMAL1 [42]
	CK-1ε Ингибирование транспорта в ядро [67]				
GSK-3	(Ser657) Транслокация в ядро [72]	(Ser557) Деградация [74]	(Ser55/Ser59) Стабилизация [73]	(Ser17/Tyr21) Деградация [75]	(Ser-кластер) Деградация [76]
SIRT1	Циркадная регуляция транскрипции генов				
	Деградация [77]	—	—	Деацетилирование Снижение связывание с E-боксом [79] Подавление активности в периферических тканях, но усиление в SCN [82]	Образование комплекса усиление ацетилазной активности CLOCK [79] Подавление активности в периферических тканях, но усиление в SCN [82]

разнообразие внутриклеточных процессов эукариот [60]. Изоформы δ и ϵ принимают активное участие в фосфорилировании циркадных белков. CK-1 δ играет ключевую роль в регуляции длины циркадного периода, тогда как CK-1 ϵ играют второстепенную роль, что впоследствии было подтверждено на зебрадании с помощью селективных ингибиторов этих белков [61, 62].

CK-1 прежде всего являются регуляторами активности PER, поскольку фосфорилирование сайта Ser478 этого белка с помощью CK-1 необходимо для последующего полиубиквитинирования и деградации PER2 [63]. С другой стороны, фосфорилирование по сайту Ser662 необходимо для последующего множественного фосфорилирования CK-1, что стабилизирует PER2 [64]. Переключение между деградацией и стабилизацией зависит от температуры окружения, так как высокие температуры обычно увеличивают скорость биохимических реакций, в том числе и деградаций PER2 [65]. При этом циркадные часы сохраняют примерно 24-часовой период независимо от температуры окружающей среды (явление, известное как температурная компенсация). Таким образом, циркадные часы компенсируют вызванное температурой увеличение скорости биохимических реакций. Например, при более высоких температурах среды происходит стабилизация PER2, тем самым компенсируя вызванное температурой ускорение его деградации [66].

Другая важная роль CK-1 — регулирование транспорта PER в ядро клеток. Например, CK-1 ϵ ингибирует этот транспорт за счет фосфорилирования аминокислотных остатков, прилежащих к домену ядерной локализации белков PER [67]. В других работах CK-1, наоборот, способствуют транспорту через образование комплекса PER2 с CRY и GAPVD1 — фактора цитоплазматического переноса [68, 69]. Активность по отношению к PER2 определяется статусом специфического сайта Tyr347 на CK-1 δ , который, вероятно, регулируется циклин-зависимыми киназами, а его мутация содействует деградации PER2 [70]. CK-1 δ совместно с CK-2 и PER2 способствует фосфорилированию некоторых сайтов CLOCK в комплексе CLOCK:BMAL1, находящемся на промоторе активируемых генов. Гиперфосфорилированное состояние CLOCK определяет начало фазы репрессии транскрипции циркадных генов, когда связывание комплекса CLOCK:BMAL1 с промоторами

ослабевает. Важно отметить, что проникновение CK-1 δ напрямую требует PER и косвенно — CRY, поскольку они необходимы для проникновения PER в ядро [42].

Еще один важный регулятор циркадных ритмов — гликогенсинтазкиназы-3 (GSK-3), GSK-3 α и β изоформы которых обнаружены в SCN, а их активность снижается в начале ночи и усиливается утром [71]. Фосфорилирование белков PER по сайту Ser657 с помощью GSK-3 способствует их транслокации в ядро [72]. Также GSK-3 способна стабилизировать REV-ERB α и способствует его транслокации в ядро, тем самым подавляя транскрипцию гена *Bmal1* [73]. При этом GSK-3 β играет большую роль в деградации белков. Так, фосфорилирование CRY2 по сайту Ser557, если имеется сайт p-Ser553, приводит к его протеосомной деградации [74], а фосфорилирование BMAL1 по сайтам Ser17/Tyr21 ведет к разрушению белка посредством убиквитинирования [75]. Помимо этого, GSK-3 принимает участие в регуляции особого серинового кластера белка CLOCK, названного фосфо-дегроном, что в условиях высокой активности GSK-3 ведет к деградации CLOCK [76].

NAD⁺-зависимая деацетилаза гистонов SIRT1 также играет важную роль в циркадной регуляции. Она необходима для обеспечения циркадной транскрипции *Bmal1*, *Rory*, *Per2* и *Cry1*. Ритмичное связывание SIRT1 с комплексом CLOCK:BMAL1 способствует деацетилированию и деградации белка PER2 [77]. SIRT1 и PER2 составляют негативную реципрокную петлю, необходимую для модуляции циркадного ритма. Дефицит SIRT1 приводит к повышению экспрессии *Per2*, что еще больше подавляет экспрессию *Sirt1*, через взаимодействие PER2 с сайтом связывания CLOCK:BMAL1 комплекса на промоторе *Sirt1* [78]. SIRT1 способен физически связываться с CLOCK, способствуя его ацетилазной активности, в том числе по отношению к сайту Lys537 в белке BMAL1. В то же время SIRT1 сам по себе способен деацетилировать BMAL1 в ответ на изменение концентрации NAD⁺, снижая его способность связываться с E-боксом, что указывает на роль клеточного метаболизма в циркадной регуляции. Также показано, что активность SIRT1, а не его мРНК, находится под контролем циркадных механизмов [79]. Ритмическая активность SIRT1 обусловлена колебательными паттернами уровней NAD⁺, а те, в свою очередь, вызваны активностью фермента никотинамидфосфорибозилтрансферазы (NAMPT), который положительно регулируется с помощью CLOCK:BMAL1. Активация SIRT1 через этот NAMPT-опосредованный путь подавляет активность CLOCK:BMAL1, тем самым формируя петлю отрицательной обратной связи [80, 81].

Несмотря на то, что в периферических тканях SIRT1 является негативным регулятором комплекса CLOCK:BMAL1, в SCN он способствует активации BMAL1 и CLOCK через рецептор PGC-1 α , который является коактиватором транскрипции, связанным с метаболическими функциями клетки. Таким образом, регуляция точных ритмов на уровне посттрансляционных модификаций может происходить по-разному в разных тканях [82]. С помощью SIRT1 из вентромедиального гипоталамуса центральным часам передается информация о времени приема пищи, тем самым синхронизируя их с сигналами питания, что в очередной раз указывает на связь между метаболизмом и циркадным ритмом [83].

Среди менее изученных механизмов регуляции циркадных белков можно отметить роль протеинфосфатазы 4, которая напрямую взаимодействует с гетеродимером CLOCK:BMAL1 и снижает его активационный потенциал, тем самым, вероятно, участвуя в задержке активации генов-мишеней [84]. JUMONJIC и домен ARID, содержащий гистон-лизин-деметилазу 1a (JARID1a), образует комплекс с CLOCK:BMAL1, который рекрутируется на промотор *Per2*. Также JARID1a увеличивает ацетилирование гистонов путем ингибирования функции деацетилазы гистонов 1 и усиливает транскрипцию с помощью CLOCK:BMAL1. Истощение JARID1a в

клетках млекопитающих снижает ацетилирование гистонов промотора *Per2*, ослабляет экспрессию циркадных генов и укорачивает период циркадных ритмов [85].

Белки PER2 также подвержены сумоилированию — процессу, который может изменять белок-белковые взаимодействия, субклеточную локализацию или активность белка и участвовать в регуляции транскрипции [86]. В сумоилировании PER2 принимают участие белки SUMO1 и SUMO2, а сайт Lys736 на PER2 необходим для взаимодействия с ними. SUMO2 облегчает взаимодействие PER2 с β -TrCP, что приводит к протеасомной деградации PER2. SUMO1, напротив, усиливает опосредованное СК-1 фосфорилирование сайта Ser662, ингибирует деградацию PER2 и повышает его функцию как супрессора транскрипции [87]. Таким образом, посттранскрипционные и посттрансляционные регуляторные механизмы в тканях в своем многообразии позволяют обеспечивать тонкую настройку циркадных ритмов организма.

СРЕДОВОЕ НАРУШЕНИЕ ЦИРКАДНЫХ РИТМОВ И ПОЛИМОРФИЗМЫ ЦИРКАДНЫХ ГЕНОВ КАК ФАКТОРЫ РАЗВИТИЯ ПСИХОПАТОЛОГИЙ

Как отмечалось ранее, свет крайне важен для настройки и синхронизации внутренних ритмов организма (рис. 1). ipRGC сетчатки в основном передают свет напрямую в SCN, однако некоторые популяции могут давать проекции в зоны мозга, регулирующие поведение. На мышах показано, что сигналы от ipRGC могут поступать в дорзальное перихабенулярное ядро, а оттуда в прилежащее ядро (NAc). Этот путь более активен в ночное время, что может опосредовать появление депрессивно-подобного фенотипа у мышей в условиях ночного освещения [19]. Нейроны из перихабенулярного региона дают проекции в другие области мозга, отвечающие за настроение (префронтальная кора, дорзомедиальный стриатум, NAc, латеральная хабенула), что объясняет поведенческие изменения в условиях нарушения светового режима [88]. Субпопуляция ipRGC, характеризующаяся низкой экспрессией гена *Brn3b*, может опосредовать вызванный ночным световым загрязнением когнитивный дефицит, не влияя на функции SCN как водителя ритма, что, по-видимому, отражает важность SCN для работы гиппокампа в процессе обучения, это подтверждалось более ранними исследованиями [88]. Все это доказывает, что свет, помимо настройки циркадных ритмов, может влиять на поведение и в определенных условиях нарушать его.

До того, как было введено повсеместное электрическое освещение, люди в ночное время подвергались минимальному освещению. Полная луна ясной ночью освещает окружение на 0.1–0.3 люкса (до 1.0 люкса в тропиках). Сегодня более 80% населения мира и 99% жителей США и Европы испытывают значительное ночное световое загрязнение (например, освещение типичного торгового центра составляет 10–20 люкс) [89]. И хотя экономические выгоды от внедрения электричества во все сферы производства привели к появлению ночных рабочих смен, работники ночной смены имеют повышенный риск развития различных заболеваний, в том числе и психических нарушений, таких как депрессия и тревожность [3]. С другой стороны, световую терапию используют для лечения несезонной депрессии и нормализации сна у пациентов с синдромом запаздывания времени сна (delayed sleep phase syndrome) [90–92].

Другой фактор — частые смены часовых поясов — может вызывать джетлаг-синдром, связанный с перестройкой организма под новые световые, социальные и пищевые ритмы. Поскольку этот синдром часто сопровождается бессонницей или гиперсомнией, он тоже может провоцировать усугубление психических расстройств [93, 94]. Предполагается, что циркадные ритмы человека обычно достаточно гибки, чтобы подстраиваться под смену часовых поясов и различные режимы освещения. Однако слабая чувствительность к свету приводит к снижению

этой гибкости, а светотерапия может быть потенциальным подходом к решению проблем, связанных со сменной работой и частыми путешествиями [92]. Также предполагается, что слабая связь между системой AVP супрахиазматического ядра и НРА ослабляет гибкость суточных ритмов [95]. В свою очередь несоответствие между принудительной продолжительностью сна в рабочие и в выходные дни определяют как социальный джетлаг, который также влияет на психические функции, вызывая агрессию, расстройства настроения, ухудшение когнитивных показателей и употребление психоактивных веществ [96]. С другой стороны, поскольку не обнаружено прямой связи между социальным джетлагом и депрессивными симптомами, его влияние на поведение и здоровье человека требует более детального изучения [97]. Тем не менее роль внешних факторов среды в изменениях циркадной регуляции и психическом здоровье людей представляется существенной.

Молекулярные компоненты циркадных ритмов также могут быть вовлечены в различные патологии, включая психические расстройства человека. Пациенты с биполярным аффективным расстройством (БАР) и бессонницей часто несут полиморфизм в гене *Clock* (rs1801260C), вариант которого также связан с повышенной вероятностью попыток суицида у людей, подвергшихся стрессу, и с модификациями белого вещества мозга [98]. Полиморфизм гена *Bmal1* вовлечен в регуляцию поведения и ассоциирован с БАР. Люди, несущие Т/Т генотип (rs7107287), имеют симптомы депрессии с циклотимическим темпераментом [99, 100], а полиморфизм rs2278749 этого гена коррелирует с увеличением массы тела, количеством принимаемой пищи и сезонным аффективным расстройством (САР) [101]. Два полиморфизма гена *Per3* также вовлечены в развитие психопатологий: вариант rs228697 ассоциирован с повышенной тревожностью и, возможно, предрасположенностью к депрессии, а rs57875989 часто встречается у пациентов с депрессией [102, 103]. В Китае в популяции пациентов с клинической депрессией часто встречается С аллель гена *Cry1* (rs2287161), полиморфизм которого связан с депрессивными эпизодами при биполярном расстройстве [104, 105] и депрессивными симптомами при болезни Паркинсона [106]. Полиморфизм в гене *Cry2* (rs10838524) также ассоциирован с САР и дистимией [107–109].

Таким образом, выявляются два основных фактора, влияющих на развитие психопатологий: генетика циркадных компонентов и факторы внешней среды, обуславливающие циркадные процессы организма. Для создания экспериментальных моделей *in vivo*, исходя из перечисленных факторов, может активно использоваться генетическая модификация циркадных генов, моделирование влияния внешних факторов и совмещение этих двух подходов для изучения взаимодействия генетических и средовых факторов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ ПСИХИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ, СВЯЗАННЫЕ С НАРУШЕНИЕМ ЦИРКАДНОЙ РЕГУЛЯЦИИ

В настоящее время разработано множество экспериментальных моделей с нарушенным функционированием циркадных генов, показывающих признаки психических расстройств (табл. 2). На различных животных, преимущественно грызунах, изучаются потенциальные механизмы, вовлеченные в развитие патологических состояний, и методы их лечения. Например, мыши с мутацией в гене *Clock* (*Clock*Δ19) имеют фенотипические признаки, сходные с симптоматикой БАР, в т.ч. снижение тревожности и сокращение времени сна, гиперактивность и повышенный ответ на подкрепление [110]. У них наблюдается снижение опосредованного AMPA-рецепторами возбуждения нейронов в NAc из-за гиперполяризации постсинаптической мембраны в состоянии покоя, что связано со снижением количества белка GRIA1 на поверхности мембраны и нарушением ритма его синтеза.

Таблица 2. Экспериментальные модели нарушения циркадных ритмов

Животное	Модель	Поведенческий фенотип	Затронутые механизмы	Источник
Модели нарушения циркадных генов				
Мышь (<i>Mus musculus</i>)	ClockΔ19	Маниакально-подобное поведение: гиперактивность; снижение тревожности и времени сна; повышенный ответ на вознапряжение	Повышение активности дофаминовых нейронов в VTA и дофаминового сигналинга в NAc; гиперполяризованность мембраны шипиков NAc в состоянии покоя; снижение количества белка GR1A1 на поверхности мембраны; нарушения поведения нормализуются литием и блокаторами КК-1δ/ε	[110–112]
	ClockΔ19-VTA	Маниакально- и депрессивно-подобное поведение: гиперактивность; снижение тревожности; неподвижность в тесте принудительного плаванья; Изменение циркадного ритма локомоторной активности	Повышенная активность дофаминергических нейронов VTA; изменение экспрессии генов ионных каналов и метаболизма дофамина	[113]
	SCN-Bmal1-KD	Депрессивно-подобный фенотип	Снижение массы тела; аномальный циркадный ритм кортикостерона	[115]
	Bmal1-KO	Депрессивно-подобный фенотип: ангедония (снижение предпочтения сахарозы)	Гипокортицизм; нарушение реакции надпочечников на АКТГ; Снижение транскрипции генов транспорта холестерина в клетках коры надпочечников	[116]
	Rev-erbα-KO	Дефицит краткосрочной, долгосрочной и контекстной памяти; нарушение гнездового поведения	Усиление оборота дофамина в гиппокампе	[117]
	NAc-Per1/2-KD	Тревожный фенотип	–	[118]
	Per3-KO (hPer3-P415A/H417R)	Нарушение ритмов локомоторной активности; депрессивно-подобный фенотип	Нарушение стабильности PER1, PER2	[120]

Таблица 2. Продолжение

Животное	Модель	Поведенческий фенотип	Затронутые механизмы	Источник
	Сту1-КО	Тревожный фенотип	–	[122]
	Сту2-КО			
	Сту1/2-КО	Снижение спонтанной локомоции; нарушение памяти о страхе, тревожность; высокая чувствительность к препаратам-психостимуляторам	Снижение уровня фосфорилирования белка ERK в MSN	
Макака крабод (Macaca fascicularis)	Vma11-КО	Снижение количества сна и повышение активности в ночное время; тревожно-, депрессивно- и шизофрено-подобный фенотип	Аритмичность колебания уровней гормонов; снижение экспрессии провоспалительных цитокинов и уровня кортизола в крови	[114]
Крыса (Rattus norvegicus domestica)	Per2-KD-LNhb	Депрессивно-подобное поведение (преимущественно в ночное время)	–	[119]
Зебрариано (Danio rerio)	per1b-КО	Гиперактивность и импульсивность; дефицит обучения и памяти (поведение, подобное дефициту внимания)	Снижение уровня дофамина в теле мальков и мозге взрослых рыб; повышение экспрессии генов метаболизма дофамина; восьмичасовая задержка экспрессии rev-erb α и последующая задержка экспрессии тирозингидроксилазы	[121]
Модели внешнего воздействия				
Мышь (Mus musculus)	Тусклый свет в ночное время (3 ночи)	Депрессивно-подобный фенотип	Нейровоспаление; снижение плотности дендритных шипиков в гиппокампе; изменения экспрессии циркадных генов в гиппокампе;	[124]
	20-часовой цикл	Изменение циркадной регуляции температуры тела; снижение когнитивной гибкости; изменения эмоциональности	Снижение массы тела и длины дендритных отростков в префронтальной коре; повышение концентрации инсулина и лептина в крови	[127]
	Лишение сна	Симптомы мании	Нарушение функционирования НРА; повышение концентрации цитокинов в мозге и сыворотке крови; возвращение к нормальному фенотипу с помощью лития	[128]

Таблица 2. Продолжение

Животное	Модель	Поведенческий фенотип	Затронутые механизмы	Источник
	СХСП	Депрессивно-подобный и тревожный фенотип; изменение архитектуры сна, циркадного ритма двигательной активности и температуры тела	Изменение уровней мРНК <i>Per2</i> в зонах мозга, связанных с эмоциями и мотивацией; антагонисты κ-опиоидных рецепторов перед воздействием СХСП смягчали последующие патологические изменения	[129, 130]
		Тревожный фенотип	Снижение экспрессии генов <i>Per1</i> и <i>Per2</i> в NAc; восстановление антидепрессантами	[118, 130]
Крыса (<i>Rattus norvegicus domestica</i>)	Непрерывное дневное освещение (8 нед.)	Тревожно- и депрессивно-подобное поведение; изменение ритмов двигательной активности	Нарушение ритmicности выработки мелатонина и кортикостерона; снижение нейрональной активности клеток SCN	[123]
	Пре- и постнатальное постоянное освещение	Тревожный фенотип	Не обнаружено нарушений во взрослом возрасте	[125]
	Стресс раннего периода жизни	–	Повышенная концентрация глюкокортикоидов в плазме крови; сдвиг ритма экспрессии <i>Bmal1</i> в СХЯ	[132]
Сибирский хомячок (<i>Phodopus sungorus</i>)	Тусклый свет в ночное время (1 нед.)	Незначительные изменения двигательной активности	Нарушение суточных колебаний концентрации кортизола; изменение паттернов экспрессии белков часовых генов в SCN и гиппокампе	[126]
Модели взаимодействия генетических и средовых факторов				
Мышь (<i>Mus musculus</i>)	<i>Bmal1</i> -КО + повторяющийся стресс обездвигивания	Слабо восприимчивы к стрессу	Отсутствие изменений в уровне кортикостерона при повышении концентрации АКТГ в крови	[116]
	<i>Per3</i> -КО (h <i>Per3</i> -P415A/H417R) + 4-20 цикл света/темноты	Депрессивно-подобное поведение	–	[120]
Макака-крабоед (<i>Macaca fascicularis</i>)	<i>Bmal1</i> -КО + постоянное освещение	Усугубление поведенческого фенотипа у нокаутов		[114]

Помимо этого, ClockΔ19-мыши характеризуются повышенной активностью дофаминовых нейронов в вентральной области покрышки (VTA) и повышенным дофаминовым сигналингом в NAc [110]. Нарушения поведения в этой модели нормализуются литием, способным ингибировать активность GSK-3, и блокаторами СК-1δ/ε [111, 112]. Эта же мутация, но специфично вызванная в вентральной покрышечной области (ClockΔ19-VTA), приводит к появлению смешанного состояния маниакально-подобного и депрессивно-подобного поведения, изменению циркадного ритма двигательной активности и повышенной активности нейронов в данной области, а также изменению экспрессии генов ионных каналов и генов, связанных с метаболизмом дофамина [113].

Нокаут *Bmal1* (*Bmal1*-KO) у макак-крабоедов (*Macaca fascicularis*) снижает количество сна и повышает активность в ночное время, понижает и нарушает ритмичность выработки гормонов, таких как мелатонин, тестостерон и дегидроэпиандростерон [114]. Параллельно наблюдается усиленная экспрессия провоспалительных цитокинов в крови и наличие системного воспаления, а также признаки тревожности и депрессивно-подобного поведения, связанного с повышенным уровнем кортизола в крови, а также нарушения сенсорной обработки, что характерно для шизофрено-подобного поведения. Эти поведенческие признаки усугублялись в условиях постоянного освещения [114]. SCN-специфический нокадаун *Bmal1* (SCN-*Bmal1*-KD) приводит к появлению депрессивно-подобного фенотипа у мышей, увеличению веса тела, аномальному циркадному ритму кортикостерона и его слабому повышению в ответ на стресс [115]. Мыши, нокаутные по *Bmal1* (*Bmal1*-KO), характеризуются ангедонией (сниженным предпочтением сахарозы), что является признаком депрессивно-подобного поведения, низким уровнем кортикостерона и нарушением ответа надпочечников на адренокортикотропный гормон (АКТГ) в связи с подавлением транскрипции генов, участвующих в транспорте холестерина в клетках надпочечников [116]. Все это приводит к отсутствию выраженного поведенческого ответа на острый и субхронический стресс на фоне стабильного уровня кортикостерона в крови до и после воздействия стресса, тогда как повышение концентрации АКТГ в ответ на стресс явно выражено [116].

Мыши с нокаутом *Rev-erba* (*Rev-erba*-KO) обладают дефицитом кратковременной, долговременной и контекстной памяти, а также демонстрируют нарушение способности строить гнезда, что отражает нарушение функций гиппокампа и усиление оборота дофамина в нем [117]. Одновременный нокадаун генов *Per1/2* в прилежащем ядре мышей (NAc-*Per1/2*-KD) приводит к появлению у них тревожного фенотипа в большей мере, чем нокадаун *Per1* или *Per2* по отдельности [118]. Нокадаун *Per2* в латеральнойhabenуле крыс (*Per2*-KD-LHb) приводит к появлению депрессивно-подобного поведения, преимущественно в ночное время [119]. Трансгенные мыши с мутацией гена *Per3* (*hPer3*-P415A/H417R), обуславливающей развитие у людей синдрома продвинутой фазы сна (advanced sleep phase syndrome), показывают нарушение ритмов локомоторной активности и депрессивно-подобный фенотип, что связано с нарушением стабильности белка PER3 и ведет к ослаблению стабильности белков PER1 и PER2 [120]. Кроме того, эти животные в условиях короткого фотопериода (4:20 цикл света/темноты) показывают признаки депрессивно-подобного поведения [120]. При этом нокаут гена *per1b* у зебрании вызывает гиперактивность, импульсивность, дефицит обучения и памяти и поведение, подобное дефициту внимания, снижение уровня дофамина в теле мальков и мозге взрослых рыб, что соотносится с данными, полученными на мышах и с симптоматикой людей с синдромом дефицита внимания и гиперреактивности [121]. У этих рыб обнаружена восьмичасовая задержка экспрессии *rev-erba*, что влияет на задержку экспрессии гена тирозингидроксилазы [121].

Мыши с нокаутом генов *Cry1/2* (*Cry1/2*-KO) характеризуются снижением спонтанной двигательной активности и нарушением распознавания при сохранении памяти о страхе. Двойные мутанты проявляют повышенную тревожность, а нокаут по генам *Cry1* и *Cry2* в отдельности приводит к менее выраженному тревожному фенотипу [122]. Мыши *Cry1/2* также демонстрируют большую чувствительность к препаратам-психостимуляторам, что связано со сниженным уровнем фосфорилирования белка ERK в средних шипиковых нейронах (medium spiny neurons, MSN) [122].

Влияние внешних факторов на циркадные ритмы и поведение также широко исследуется с использованием моделей *in vivo*. Крысы, подвергшиеся непрерывному дневному освещению в течение 8 недель, проявляют признаки тревожного и депрессивно-подобного поведения, у этих животных наблюдается изменение ритмов двигательной активности, выработки мелатонина и кортикостерона, снижение нейрональной активности в SCN [123]. Тусклый свет в течение трех ночей приводит к появлению депрессивно-подобного фенотипа у мышей, нейровоспалению, снижению плотности дендритных шипиков и изменению экспрессии циркадных генов в гиппокампе [124]. Пре- и постнатальное трехнедельное воздействие тусклым светом в ночное время на крыс может приводить к появлению тревожности во взрослом возрасте [125]. У сибирских хомячков (*Phodopus sungorus*) постоянное освещение в течение недели приводило к нарушению суточных колебаний концентрации кортизола и изменению паттернов экспрессии белков часовых генов в SCN и гиппокампе [126].

Другой подход к моделированию циркадных и поведенческих нарушений — изменение длины цикла света/темноты. Содержание мышей в 20-часовом цикле приводит к снижению длины дендритных отростков в префронтальной коре, изменению циркадной регуляции температуры тела, увеличению массы тела, повышению концентрации гормонов инсулина и лептина в крови, снижению когнитивной гибкости и изменениям эмоциональности [127]. Лишение сна при сохранении нормального цикла света/темноты приводит к появлению симптомов мании у мышей, нарушению функционирования НРА, вызывает окислительный стресс, повышение концентрации цитокинов в мозге и сыворотке крови (однако эти последствия могут быть нормализованы литием) [128].

Стресс хронического социального поражения (СХСП) широко используется как модель для создания тревожного и депрессивно-подобного поведения у грызунов [129]. СХСП оказывает влияние на архитектуру сна и динамику уровней мРНК *Per2* в зонах мозга, связанных с эмоциями и мотивацией [129, 130] (экспрессия *Per1* и *Per2* снижена в NAc у мышей после десятидневного СХСП, но возвращается к нормальному состоянию после лечения антидепрессантами) [118]. При этом СХСП не изменяет циркадные ритмы в SCN, что, вероятно, связано с малым количеством рецепторов к глюкокортикоидам в клетках данного ядра [131]. У новорожденных крысят присутствует достаточное количество этих рецепторов в SCN, из-за чего стресс раннего периода жизни (до 6-дневного возраста) оказывает влияние на фазу генной экспрессии SCN [132].

В настоящее время имеется немного исследований, посвященных взаимодействию генетических и средовых факторов циркадной регуляции, его роли в развитии психопатологий. Количество работ, исследующих патологическое поведение зебраданио в контексте нарушения циркадной регуляции и психопатологии, также незначительно. В то же время зебраданио обладают рядом важных характеристик, позволяющих использовать их как перспективную модель психопатологий, а также для изучения механизмов регуляции циркадных ритмов. Одним из таких преимуществ является то, что состояния бодрствования и покоя у рыб легко определяются поведенческими критериями. Поэтому фенотипы повышенной или пониженной суточной активности и изменение длительности периодов бодрствования и покоя можно использовать в качестве маркеров поведенческих нарушений. Зебраданио

также удобны и для фармакологического скрининга препаратов, используемых для улучшения качества сна и лечения психопатологий [133], например, мелатонина [133, 134]. Кроме того, консервативность циркадных процессов и указанные ранее сходства в регуляции молекулярных компонентов циркадных ритмов делают зебранию удобным объектом для трансляционной циркадной биологии в целом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Циркадные ритмы — важный и неотъемлемый фактор жизни, от которого во многом зависит психическое здоровье человека. Их нарушения как со стороны генетических, так и факторов внешней среды, могут приводить к развитию серьезных психопатологий и расстройств поведения. Регуляция биоритмов в организме осуществляется на различных уровнях, в том числе на уровне посттранскрипционной и посттрансляционной обработки продуктов циркадных генов, поэтому понимание этих механизмов в экспериментальных моделях может помочь в разработке терапевтических агентов, нацеленных на разные стадии этого процесса. Это также необходимо и для выработки профилактических мер, способствующих предотвращению поведенческих нарушений, вызванных аномалиями циркадной регуляции.

Создание новых экспериментальных моделей психопатологий с упором на циркадные функции также является важным направлением научно-исследовательской деятельности, в том числе с использованием новых перспективных модельных систем (например, зебранию). Так, например, потенциал для скрининга физиологически активных веществ на зебранию в десятки или сотни раз превышает возможности подобных скринов на грызунах, что позволяет не только выявлять принципиально новые регуляторы циркадных ритмов в ходе высокопроизводительного тестирования на рыбах, но и проводить перепрофилирование лекарственных препаратов (drug repurposing) на предмет возможной модуляции циркадных ритмов препаратами, уже одобренными для клинического применения в других целях. В целом, несмотря на большой объем данных, посвященных центральной регуляции циркадных ритмов, остается множество открытых вопросов (табл. 3), которые могут служить фундаментом для будущих научных работ по данной теме.

Таблица 3. Перечень малоизученных вопросов по проблемам центральной регуляции циркадных ритмов

1. Функции глубинных фоторецепторов рыб в циркадной регуляции и регуляции поведения;
2. Роль генетических различий (гомология геномов ~70%) между человеком и зебранием в регуляции циркадных ритмов;
3. Роль эпигенетических механизмов ЦНС в регуляции циркадных ритмов человека и зебранию;
4. Установка ритмов экспрессии циркадных генов в периферических тканях;
5. Посттрансляционная и посттранскрипционная обработка продуктов циркадных генов у рыб;
6. Влияния социального джетлага на поведение;
7. Взаимодействия мутаций в циркадных генах и внешних факторов, и роль этого взаимодействия в развитии психопатологий;
8. Поведение зебранию в контексте нарушения циркадной регуляции и психопатологии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую признательность д. м. н. К.В. Даниленко за советы и ценные замечания при работе над статьей.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена за счет средств федерального бюджета на проведение фундаментальных научных исследований (тема № 122042700001-9).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы — К.В.С., Т.Г.А., сбор и анализ литературных данных, написание рукописи, подготовка иллюстраций — К.В.С., Н.Д.Ч., написание таблиц, первичная коррекция текста — Е.В.Г., финальная коррекция текста и научное консультирование — А.В.К., Т.Г.А.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bhadra U, Thakkar N, Das P, Pal Bhadra M* (2017) Evolution of circadian rhythms: from bacteria to human. *Sleep Med* 35: 49–61.
<https://doi.org/10.1016/j.sleep.2017.04.008>
2. *Herzog ED, Hermanstyn T, Smyllie NJ, Hastings MH* (2017) Regulating the Suprachiasmatic Nucleus (SCN) Circadian Clockwork: Interplay between Cell-Autonomous and Circuit-Level Mechanisms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9: a027706.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027706>
3. *Lee A, Myung S-K, Cho JJ, Jung Y-J, Yoon JL, Kim MY* (2017) Night Shift Work and Risk of Depression: Meta-analysis of Observational Studies. *J Korean Med Sci* 32: 1091.
<https://doi.org/10.3346/jkms.2017.32.7.1091>
4. *Lu Z, Klein-Cardena K, Lee S, Antonsen TM, Girvan M, Ott E* (2016) Resynchronization of circadian oscillators and the east-west asymmetry of jet-lag. *Chaos An Interdiscip J Nonlinear Sci* 26: 094811.
<https://doi.org/10.1063/1.4954275>
5. *Haesemeyer M, Schier AF* (2015) The study of psychiatric disease genes and drugs in zebrafish. *Curr Opin Neurobiol* 30: 122–130.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.12.002>
6. *Fontana BD, Mezzomo NJ, Kalueff AV, Rosemberg DB* (2018) The developing utility of zebrafish models of neurological and neuropsychiatric disorders: A critical review. *Exp Neurol* 299: 157–171.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.10.004>
7. *Aranda ML, Schmidt TM* (2021) Diversity of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: circuits and functions. *Cell Mol Life Sci* 78: 889–907.
<https://doi.org/10.1007/s00018-020-03641-5>
8. *Do MTH* (2019) Melanopsin and the Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells: Biophysics to Behavior. *Neuron* 104: 205–226.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.07.016>
9. *Davies WL, Zheng L, Hughes S, Tamai TK, Turton M, Halford S, Foster RG, Whitmore D, Hankins MW* (2011) Functional diversity of melanopsins and their global expression in the teleost retina. *Cell Mol Life Sci* 68: 4115–4132.
<https://doi.org/10.1007/s00018-011-0785-4>
10. *Matsuyama T, Yamashita T, Imamoto Y, Shichida Y* (2012) Photochemical Properties of Mammalian Melanopsin. *Biochemistry* 51: 5454–5462.
<https://doi.org/10.1021/bi3004999>
11. *Walmsley L, Hanna L, Moulard J, Martial F, West A, Smedley AR, Bechtold DA, Webb AR, Lucas RJ, Brown TM* (2015) Colour As a Signal for Entraining the Mammalian Circadian Clock. *PLoS Biol* 13: e1002127.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002127>
12. *Steindal IAF, Whitmore D* (2020) Zebrafish Circadian Clock Entrainment and the Importance of Broad Spectral Light Sensitivity. *Front Physiol* 11.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.01002>
13. *Jones JR, Simon T, Lones L, Herzog ED* (2018) SCN VIP Neurons Are Essential for Normal Light-Mediated Resetting of the Circadian System. *J Neurosci* 38: 7986–7995.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1322-18.2018>

14. Ono D, Honma K, Yanagawa Y, Yamanaka A, Honma S (2018) Role of GABA in the regulation of the central circadian clock of the suprachiasmatic nucleus. *J Physiol Sci* 68: 333–343. <https://doi.org/10.1007/s12576-018-0604-x>
15. *Ukrainitseva YV, Kovalzon VM* (2016) Circadian regulation and its disorders in Parkinson's disease patients. Part 2: Experimental models, alpha-synuclein, and melatonin. *Hum Physiol* 42: 559–570. <https://doi.org/10.1134/S0362119716050170>
16. Mazuski C, Abel JH, Chen SP, Hermanstynne TO, Jones JR, Simon T, Doyle FJ, Herzog ED (2018) Entrainment of Circadian Rhythms Depends on Firing Rates and Neuropeptide Release of VIP SCN Neurons. *Neuron* 99: 555–563.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.06.029>
17. Kalsbeek A, Fliers E, Hofman MA, Swaab DF, Buijs RM (2010) Vasopressin and the Output of the Hypothalamic Biological Clock. *J Neuroendocrinol* 22: 362–372. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2010.01956.x>
18. Mieda M, Ono D, Hasegawa E, Okamoto H, Honma K, Honma S, Sakurai T (2015) Cellular Clocks in AVP Neurons of the SCN Are Critical for Interneuronal Coupling Regulating Circadian Behavior Rhythm. *Neuron* 85: 1103–1116. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.02.005>
19. An K, Zhao H, Miao Y, Xu Q, Li Y-F, Ma Y-Q, Shi Y-M, Shen J-W, Meng J-J, Yao Y-G, Zhang Z, Chen J-T, Bao J, Zhang M, Xue T (2020) A circadian rhythm-gated subcortical pathway for nighttime-light-induced depressive-like behaviors in mice. *Nat Neurosci* 23: 869–880. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0640-8>
20. Campos LMG, Cruz-Rizzolo RJ, Watanabe IS, Pinato L, Nogueira MI (2014) Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus based on the distribution of vasoactive intestinal peptide (VIP) and arginine vasopressin (AVP) immunoreactive fibers in the hypothalamus of *Sapajus apella*. *J Chem Neuroanat* 57–58: 42–53. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2014.03.004>
21. Malek ZS, Labban LM (2021) Photoperiod regulates the daily profiles of tryptophan hydroxylase-2 gene expression the raphe nuclei of rats. *Int J Neurosci* 131: 1155–1161. <https://doi.org/10.1080/00207454.2020.1782903>
22. Buijs FN, Guzmán-Ruiz M, León-Mercado L, Basualdo MC, Escobar C, Kalsbeek A, Buijs RM (2017) Suprachiasmatic Nucleus Interaction with the Arcuate Nucleus; Essential for Organizing Physiological Rhythms. *Eneuro* 4: ENEURO.0028-17.2017. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0028-17.2017>
23. Ni R-J, Shu Y-M, Luo P-H, Zhou J-N (2021) Whole-brain mapping of afferent projections to the suprachiasmatic nucleus of the tree shrew. *Tissue Cell* 73: 101620. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2021.101620>
24. Brancaccio M, Patton AP, Chesham JE, Maywood ES, Hastings MH (2017) Astrocytes Control Circadian Timekeeping in the Suprachiasmatic Nucleus via Glutamatergic Signaling. *Neuron* 93: 1420–1435.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.02.030>
25. Ortinski P, Reissner K, Turner J, Anderson TA, Scimemi A (2022) Control of complex behavior by astrocytes and microglia. *Neurosci Biobehav Rev* 137: 104651. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104651>
26. Hang CY, Kitahashi T, Parhar IS (2014) Localization and characterization of val-opsin isoform-expressing cells in the brain of adult zebrafish. *J Comp Neurol* 522: 3847–3860. <https://doi.org/10.1002/cne.23645>
27. Moore HA, Whitmore D (2014) Circadian Rhythmicity and Light Sensitivity of the Zebrafish Brain. *PLoS One* 9: e86176. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086176>
28. Horstick EJ, Bayley Y, Sinclair JL, Burgess HA (2017) Search strategy is regulated by somatostatin signaling and deep brain photoreceptors in zebrafish. *BMC Biol* 15: 4. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0346-2>
29. Fernandes AM, Fero K, Arrenberg AB, Bergeron SA, Driever W, Burgess HA (2012) Deep Brain Photoreceptors Control Light-Seeking Behavior in Zebrafish Larvae. *Curr Biol* 22: 2042–2047. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.08.016>
30. Hang CY, Kitahashi T, Parhar IS (2015) Brain area-specific diurnal and photic regulation of val-opsinA and val-opsinB genes in the zebrafish. *J Neurochem* 133: 501–510. <https://doi.org/10.1111/jnc.13084>
31. Ben-Moshe Livne Z, Alon S, Vallone D, Bayley Y, Tovin A, Shainer I, Nisembaum LG, Aviram I, Smadja-Storz S, Fuentes M, Falcón J, Eisenberg E, Klein DC, Burgess HA, Foulkes NS, Gothilf Y (2016) Genetically Blocking the Zebrafish Pineal Clock Affects Circadian Behavior. *PLoS Genet* 12: e1006445. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006445>
32. Krylov VV, Izvekov EI, Pavlova VV, Pankova NA, Osipova EA (2021) Circadian rhythms in zebrafish (*Danio rerio*) behaviour and the sources of their variability. *Biol Rev* 96: 785–797. <https://doi.org/10.1111/brev.12678>

33. Landgraf D, Achten C, Dallmann F, Oster H (2015) Embryonic development and maternal regulation of murine circadian clock function. *Chronobiol Int* 32: 416–427.
<https://doi.org/10.3109/07420528.2014.986576>
34. Laurà R, Magnoli D, Zichichi R, Guerrera MC, De Carlos F, Suárez AA, Abbate F, Ciriaco E, Vega JA, Germanà A (2012) The photoreceptive cells of the pineal gland in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Microsc Res Tech* 75: 359–366.
<https://doi.org/10.1002/jemt.21064>
35. Yáñez J, Busch J, Anadón R, Meissl H (2009) Pineal projections in the zebrafish (*Danio rerio*): overlap with retinal and cerebellar projections. *Neuroscience* 164: 1712–1720.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.09.043>
36. Sato F, Kohsaka A, Bhawal U, Muragaki Y (2018) Potential Roles of Dec and Bmal1 Genes in Interconnecting Circadian Clock and Energy Metabolism. *Int J Mol Sci* 19: 781.
<https://doi.org/10.3390/ijms19030781>
37. Gompf HS, Fuller PM, Hattar S, Saper CB, Lu J (2015) Impaired Circadian Photosensitivity in Mice Lacking Glutamate Transmission from Retinal Melanopsin Cells. *J Biol Rhythms* 30: 35–41.
<https://doi.org/10.1177/0748730415561545>
38. Koyanagi S, Hamdan AM, Horiguchi M, Kusunose N, Okamoto A, Matsunaga N, Ohdo S (2011) cAMP-response Element (CRE)-mediated Transcription by Activating Transcription Factor-4 (ATF4) Is Essential for Circadian Expression of the Period 2 Gene. *J Biol Chem* 286: 32416–32423.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.258970>
39. Lindberg PT, Mitchell JW, Burgoon PW, Beaulé C, Weihe E, Schäfer MK-H, Eiden LE, Jiang SZ, Gillette MU (2019) Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide (PACAP)-Glutamate Co-transmission Drives Circadian Phase-Advancing Responses to Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cell Projections by Suprachiasmatic Nucleus. *Front Neurosci* 13: 1281.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01281>
40. Yu W, Nomura M, Ikeda M (2002) Interactivating Feedback Loops within the Mammalian Clock: BMAL1 Is Negatively Autoregulated and Upregulated by CRY1, CRY2, and PER2. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 933–941.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6300>
41. Schmutz J, Ripperger JA, Baeriswyl-Aebischer S, Albrecht U (2010) The mammalian clock component PERIOD2 coordinates circadian output by interaction with nuclear receptors. *Genes Dev* 24: 345–357.
<https://doi.org/10.1101/gad.564110>
42. Cao X, Yang Y, Selby CP, Liu Z, Sancar A (2021) Molecular mechanism of the repressive phase of the mammalian circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2021174118>
43. Bozek K, Relógio A, Kielbasa SM, Heine M, Dame C, Kramer A, Herzog H (2009) Regulation of Clock-Controlled Genes in Mammals. *PLoS One* 4: e4882.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004882>
44. Crumbley C, Burris TP (2011) Direct Regulation of CLOCK Expression by REV-ERB. *PLoS One* 6: e17290.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017290>
45. Takeda Y, Jothi R, Birault V, Jetten AM (2012) ROR γ directly regulates the circadian expression of clock genes and downstream targets in vivo. *Nucleic Acids Res* 40: 8519–8535.
<https://doi.org/10.1093/nar/gks630>
46. Ye R, Selby CP, Chiou Y-Y, Ozkan-Dagliyan I, Gaddameedhi S, Sancar A (2014) Dual modes of CLOCK:BMAL1 inhibition mediated by Cryptochrome and Period proteins in the mammalian circadian clock. *Genes Dev* 28: 1989–1998.
<https://doi.org/10.1101/gad.249417.114>
47. Kwon I, Lee J, Chang SH, Jung NC, Lee BJ, Son GH, Kim K, Lee KH (2006) BMAL1 Shuttling Controls Transactivation and Degradation of the CLOCK/BMAL1 Heterodimer. *Mol Cell Biol* 26: 7318–7330.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00337-06>
48. Ono D, Honma K, Schmal C, Takumi T, Kawamoto T, Fujimoto K, Kato Y, Honma S (2021) CHRONO and DEC1/DEC2 compensate for lack of CRY1/CRY2 in expression of coherent circadian rhythm but not in generation of circadian oscillation in the neonatal mouse SCN. *Sci Rep* 11: 19240.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-98532-5>
49. Li Y, Li G, Wang H, Du J, Yan J (2013) Analysis of a Gene Regulatory Cascade Mediating Circadian Rhythm in Zebrafish. *PLoS Comput Biol* 9: e1002940.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002940>
50. West AC, Iversen M, Jørgensen EH, Sandve SR, Hazlerigg DG, Wood SH (2020) Diversified regulation of circadian clock gene expression following whole genome duplication. *PLoS Genet* 16: e1009097.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009097>
51. Wang M, Zhong Z, Zhong Y, Zhang W, Wang H (2015) The Zebrafish Period2 Protein Positively Regulates the Circadian Clock through Mediation of Retinoic Acid Receptor (RAR)-related

- Orphan Receptor α (Ror α). *J Biol Chem* 290: 4367–4382.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.605022>
52. *Sloin HE, Ruggiero G, Rubinstein A, Smadja Storz S, Foulkes NS, Gothilf Y* (2018) Interactions between the circadian clock and TGF- β signaling pathway in zebrafish. *PLoS One* 13: e0199777.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199777>
 53. *Finger A-M, Jäschke S, del Olmo M, Hurwitz R, Granada AE, Herzel H, Kramer A* (2021) Inter-cellular coupling between peripheral circadian oscillators by TGF- β signaling. *Sci Adv* 7.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.abg5174>
 54. *Mure LS, Le HD, Benegiamo G, Chang MW, Rios L, Jillani N, Ngotho M, Kariuki T, Dkhissi-Benyahya O, Cooper HM, Panda S* (2018) Diurnal transcriptome atlas of a primate across major neural and peripheral tissues. *Science* (80): 359.
<https://doi.org/10.1126/science.aao0318>
 55. *Koike N, Yoo S-H, Huang H-C, Kumar V, Lee C, Kim T-K, Takahashi JS* (2012) Transcriptional Architecture and Chromatin Landscape of the Core Circadian Clock in Mammals. *Science* (80) 338: 349–354.
<https://doi.org/10.1126/science.1226339>
 56. *Terajima H, Yoshitane H, Ozaki H, Suzuki Y, Shimba S, Kuroda S, Iwasaki W, Fukada Y* (2017) ADARBI catalyzes circadian A-to-I editing and regulates RNA rhythm. *Nat Genet* 49: 146–151.
<https://doi.org/10.1038/ng.3731>
 57. *Fustin J-M, Doi M, Yamaguchi Y, Hida H, Nishimura S, Yoshida M, Isagawa T, Morioka MS, Kakeya H, Manabe I, Okamura H* (2013) RNA-Methylation-Dependent RNA Processing Controls the Speed of the Circadian Clock. *Cell* 155: 793–806.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.026>
 58. *Mohamed HMA, Takahashi A, Nishijima S, Adachi S, Murai I, Okamura H, Yamamoto T* (2022) CNOT1 regulates circadian behaviour through Per2 mRNA decay in a deadenylation-dependent manner. *RNA Biol* 19: 703–718.
<https://doi.org/10.1080/15476286.2022.2071026>
 59. *Avitabile D, Genovese L, Ponti D, Ranieri D, Raffa S, Calogero A, Torrisi MR* (2014) Nucleolar localization and circadian regulation of Per2S, a novel splicing variant of the Period 2 gene. *Cell Mol Life Sci* 71: 2547–2559.
<https://doi.org/10.1007/s00018-013-1503-1>
 60. *Fan J-Y, Preuss F, Muskus MJ, Bjes ES, Price JL* (2009) Drosophila and Vertebrate Casein Kinase 1 δ Exhibits Evolutionary Conservation of Circadian Function. *Genetics* 181: 139–152.
<https://doi.org/10.1534/genetics.108.094805>
 61. *Etchegaray J-P, Machida KK, Noton E, Constance CM, Dallmann R, Di Napoli MN, DeBruyne JP, Lambert CM, Yu EA, Reppert SM, Weaver DR* (2009) Casein Kinase 1 Delta Regulates the Pace of the Mammalian Circadian Clock. *Mol Cell Biol* 29: 3853–3866.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00338-09>
 62. *Smadja Storz S, Tovin A, Mracek P, Alon S, Foulkes NS, Gothilf Y* (2013) Casein Kinase 1 δ Activity: A Key Element in the Zebrafish Circadian Timing System. *PLoS One* 8: e54189.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054189>
 63. *Masuda S, Narasimamurthy R, Yoshitane H, Kim JK, Fukada Y, Virshup DM* (2020) Mutation of a PER2 phosphodegron perturbs the circadian phosphoswitch. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117: 10888–10896.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2000266117>
 64. *Shanware NP, Hutchinson JA, Kim SH, Zhan L, Bowler MJ, Tibbetts RS* (2011) Casein Kinase 1-dependent Phosphorylation of Familial Advanced Sleep Phase Syndrome-associated Residues Controls PERIOD 2 Stability. *J Biol Chem* 286: 12766–12774.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.224014>
 65. *Zhou M, Kim JK, Eng GWL, Forger DB, Virshup DM* (2015) A Period2 Phosphoswitch Regulates and Temperature Compensates Circadian Period. *Mol Cell* 60: 77–88.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.08.022>
 66. *Narasimamurthy R, Virshup DM* (2017) Molecular Mechanisms Regulating Temperature Compensation of the Circadian Clock. *Front Neurol* 8.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00161>
 67. *Vielhaber EL, Duricka D, Ullman KS, Virshup DM* (2001) Nuclear Export of Mammalian PERIOD Proteins. *J Biol Chem* 276: 45921–45927.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M107726200>
 68. *Takano A, Isojima Y, Nagai K* (2004) Identification of mPer1 phosphorylation sites responsible for the nuclear entry. *J Biol Chem* 279: 32578–32585.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M403433200>
 69. *Aryal RP, Kwak PB, Tamayo AG, Gebert M, Chiu PL, Walz T, Weitz CJ* (2017) Macromolecular Assemblies of the Mammalian Circadian Clock. *Mol Cell* 67: 770–782.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.07.017>
 70. *Eng GWL, Edison, Virshup DM* (2017) Site-specific phosphorylation of casein kinase 1 δ (CK1 δ) regulates its activity towards the circadian regulator PER2. *PLoS One* 12.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177834>

71. Paul JR, McKeown AS, Davis JA, Totsch SK, Mintz EM, Kraft TW, Cowell RM, Gamble KL (2017) Glycogen synthase kinase 3 regulates photic signaling in the suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 45: 1102–1110.
<https://doi.org/10.1111/ejn.13549>
72. Leloup J-C, Goldbeter A (2011) Modelling the dual role of Per phosphorylation and its effect on the period and phase of the mammalian circadian clock. *IET Syst Biol* 5: 44–49.
<https://doi.org/10.1049/iet-syb.2009.0068>
73. Yin L, Wang J, Klein PS, Lazar MA (2006) Nuclear Receptor Rev-erb α Is a Critical Lithium-Sensitive Component of the Circadian Clock. *Science* (80) 311: 1002–1005.
<https://doi.org/10.1126/science.1121613>
74. Kurabayashi N, Hirota T, Sakai M, Sanada K, Fukada Y (2010) DYRK1A and Glycogen Synthase Kinase 3 β , a Dual-Kinase Mechanism Directing Proteasomal Degradation of CRY2 for Circadian Timekeeping. *Mol Cell Biol* 30: 1757–1768.
<https://doi.org/10.1128/MCB.01047-09>
75. Sahar S, Zocchi L, Kinoshita C, Borrelli E, Sassone-Corsi P (2010) Regulation of BMAL1 Protein Stability and Circadian Function by GSK3 β -Mediated Phosphorylation. *PLoS One* 5: e8561.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008561>
76. Spengler ML, Kuropatwinski KK, Schumer M, Antoch M (2009) A serine cluster mediates BMAL1-dependent CLOCK phosphorylation and degradation. *Cell Cycle* 8: 4138–4146.
<https://doi.org/10.4161/cc.8.24.10273>
77. Asher G, Gatfield D, Stratmann M, Reinke H, Dibner C, Kreppel F, Mostoslavsky R, Alt FW, Schibler U (2008) SIRT1 Regulates Circadian Clock Gene Expression through PER2 Deacetylation. *Cell* 134: 317–328.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.050>
78. Wang R-H, Zhao T, Cui K, Hu G, Chen Q, Chen W, Wang X-W, Soto-Gutierrez A, Zhao K, Deng C-X (2016) Negative reciprocal regulation between Sirt1 and Per2 modulates the circadian clock and aging. *Sci Rep* 6: 28633.
<https://doi.org/10.1038/srep28633>
79. Nakahata Y, Kaluzova M, Grimaldi B, Sahar S, Hirayama J, Chen D, Guarente LP, Sassone-Corsi P (2008) The NAD $^{+}$ -Dependent Deacetylase SIRT1 Modulates CLOCK-Mediated Chromatin Remodeling and Circadian Control. *Cell* 134: 329–340.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.002>
80. Nakahata Y, Sahar S, Astarita G, Kaluzova M, Sassone-Corsi P (2009) Circadian Control of the NAD $^{+}$ Salvage Pathway by CLOCK-SIRT1. *Science* (80)324: 654–657.
<https://doi.org/10.1126/science.1170803>
81. Ramsey KM, Yoshino J, Brace CS, Abrassart D, Kobayashi Y, Marcheva B, Hong H-K, Chong JL, Buhr ED, Lee C, Takahashi JS, Imai S, Bass J (2009) Circadian Clock Feedback Cycle Through NAMPT-Mediated NAD $^{+}$ Biosynthesis. *Science* (80) 324: 651–654.
<https://doi.org/10.1126/science.1171641>
82. Chang H-C, Guarente L (2013) SIRT1 Mediates Central Circadian Control in the SCN by a Mechanism that Decays with Aging. *Cell* 153: 1448–1460.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.027>
83. Orozco-Solis R, Ramadori G, Coppari R, Sassone-Corsi P (2015) SIRT1 relays nutritional inputs to the circadian clock through the Sfl neurons of the ventromedial hypothalamus. *Endocrinology* (United States) 156: 2174–2184.
<https://doi.org/10.1210/en.2014-1805>
84. Schibler U (2021) BMAL1 dephosphorylation determines the pace of the circadian clock. *Genes Dev* 35: 1076–1078.
<https://doi.org/10.1101/gad.348801.121>
85. DiTacchio L, Le HD, Vollmers C, Hatori M, Witcher M, Secombe J, Panda S (2011) Histone Lysine Demethylase JARID1a Activates CLOCK-BMAL1 and Influences the Circadian Clock. *Science* (80) 333: 1881–1885.
<https://doi.org/10.1126/science.1206022>
86. Gareau JR, Lima CD (2010) The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 861–871.
<https://doi.org/10.1038/nrm3011>
87. Chen L-C, Hsieh Y-L, Tan GYT, Kuo T-Y, Chou Y-C, Hsu P-H, Hwang-Verslues WW (2021) Differential effects of SUMO1 and SUMO2 on circadian protein PER2 stability and function. *Sci Rep* 11: 14431.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-93933-y>
88. Fernandez DC, Fogerson PM, Lazzerini Ospri L, Thomsen MB, Layne RM, Severin D, Zhan J, Singer JH, Kirkwood A, Zhao H, Berson DM, Hattar S (2018) Light Affects Mood and Learning through Distinct Retina-Brain Pathways. *Cell* 175: 71–84.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.004>
89. Falchi F, Cinzano P, Duriscoe D, Kyba CCM, Elvidge CD, Baugh K, Portnov BA, Rybnikova NA, Furgoni R (2016) The new world atlas of artificial night sky brightness. *Sci Adv* 2.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.1600377>

90. *Tähkämö L, Partonen T, Pesonen A-K* (2019) Systematic review of light exposure impact on human circadian rhythm. *Chronobiol Int* 36: 151–170.
<https://doi.org/10.1080/07420528.2018.1527773>
91. *Faulkner SM, Bee PE, Meyer N, Dijk D-J, Drake RJ* (2019) Light therapies to improve sleep in intrinsic circadian rhythm sleep disorders and neuro-psychiatric illness: A systematic review and meta-analysis. *Sleep Med Rev* 46: 108–123.
<https://doi.org/10.1016/j.smr.2019.04.012>
92. *Al-Karawi D, Jubair L* (2016) Bright light therapy for nonseasonal depression: Meta-analysis of clinical trials. *J Affect Disord* 198: 64–71.
<https://doi.org/10.1016/j.jad.2016.03.016>
93. *Zee PC, Goldstein CA* (2010) Treatment of Shift Work Disorder and Jet Lag. *Curr Treat Options Neurol* 12: 396–411.
<https://doi.org/10.1007/s11940-010-0090-9>
94. *Rundle AG, Revenson TA, Friedman M* (2018) Business Travel and Behavioral and Mental Health. *J Occup Environ Med* 60: 612–616.
<https://doi.org/10.1097/JOM.0000000000001262>
95. *Li Y, Androulakis IP* (2021) Light entrainment of the SCN circadian clock and implications for personalized alterations of corticosterone rhythms in shift work and jet lag. *Sci Rep* 11: 17929.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-97019-7>
96. *Castilhos Beauvalet J, Luísa Quiles C, Alves Braga de Oliveira M, Vieira Ilgenfritz CA, Hidalgo MP, Comiran Tonon A* (2017) Social jetlag in health and behavioral research: a systematic review. *Chron Physiol Ther* 7: 19–31.
<https://doi.org/10.2147/CPT.S108750>
97. *Knapen SE, Riemersma-van der Lek RF, Antypa N, Meesters Y, Penninx BWJH, Schoevers RA* (2018) Social jetlag and depression status: Results obtained from the Netherlands Study of Depression and Anxiety. *Chronobiol Int* 35: 1–7.
<https://doi.org/10.1080/07420528.2017.1374966>
98. *Benedetti F, Riccaboni R, Dallaspesza S, Locatelli C, Smeraldi E, Colombo C* (2015) Effects of CLOCK gene variants and early stress on hopelessness and suicide in bipolar depression. *Chronobiol Int* 32: 1156–1161.
<https://doi.org/10.3109/07420528.2015.1060603>
99. *Rybakowski JK, Dmierzak-Weglarz M, Dembinska-Krajewska D, Hauser J, Akiskal KK, Akiskal HH* (2014) Polymorphism of circadian clock genes and temperamental dimensions of the TEMPS-A in bipolar disorder. *J Affect Disord* 159: 80–84.
<https://doi.org/10.1016/j.jad.2014.02.024>
100. *Jankowski KS, Dmierzak-Weglarz M* (2017) ARNTL, CLOCK and PER3 polymorphisms – links with chronotype and affective dimensions. *Chronobiol Int* 34: 1105–1113.
<https://doi.org/10.1080/07420528.2017.1343341>
101. *Kim H-I, Lee H-J, Cho C-H, Kang S-G, Yoon H-K, Park Y-M, Lee S-H, Moon J-H, Song H-M, Lee E, Kim L* (2015) Association of CLOCK, ARNTL, and NPAS2 gene polymorphisms and seasonal variations in mood and behavior. *Chronobiol Int* 32: 785–791.
<https://doi.org/10.3109/07420528.2015.1049613>
102. *Liberman AR, Halitjaha L, Ay A, Ingram KK* (2018) Modeling Strengthens Molecular Link between Circadian Polymorphisms and Major Mood Disorders. *J Biol Rhythms* 33: 318–336.
<https://doi.org/10.1177/0748730418764540>
103. *Melhuish Beaupre L, Brown GM, Kennedy JL* (2020) Circadian genes in major depressive disorder. *World J Biol Psychiatry* 21: 80–90.
<https://doi.org/10.1080/15622975.2018.1500028>
104. *Hua P, Liu W, Chen D, Zhao Y, Chen L, Zhang N, Wang C, Guo S, Wang L, Xiao H, Kuo S-H* (2014) Cry1 and Tef gene polymorphisms are associated with major depressive disorder in the Chinese population. *J Affect Disord* 157: 100–103.
<https://doi.org/10.1016/j.jad.2013.11.019>
105. *Drago A, Monti B, De Ronchi D, Serretti A* (2015) CRY1 Variations Impacts on the Depressive Relapse Rate in a Sample of Bipolar Patients. *Psychiatr Invest* 12: 118.
<https://doi.org/10.4306/pi.2015.12.1.118>
106. *D'Souza T, Rajkumar AP* (2020) Systematic review of genetic variants associated with cognitive impairment and depressive symptoms in Parkinson's disease. *Acta Neuropsychiatr* 32: 10–22.
<https://doi.org/10.1017/neu.2019.28>
107. *Fiedorowicz JG, Coryell WH, Akhter A, Ellingrod VL* (2012) Cryptochrome 2 variants, chronicity, and seasonality of mood disorders. *Psychiatr Genet* 22: 305–306.
<https://doi.org/10.1097/YPG.0b013e3283539594>
108. *Kovanen L, Kaunisto M, Donner K, Saarikoski ST, Partonen T* (2013) CRY2 Genetic Variants Associate with Dysthymia. *PLoS One* 8: e71450.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071450>
109. *Kovanen L, Donner K, Kaunisto M, Partonen T* (2017) PRKCDBP (CAVIN3) and CRY2 associate with major depressive disorder. *J Affect Disord* 207: 136–140.
<https://doi.org/10.1016/j.jad.2016.09.034>

110. Parekh PK, Becker-Krail D, Sundaravelu P, Ishigaki S, Okado H, Sobue G, Huang Y, McClung CA (2018) Altered GluA1 (Gria1) Function and Accumbal Synaptic Plasticity in the Clock Δ 19 Model of Bipolar Mania. *Biol Psychiatry* 84: 817–826.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.06.022>
111. Kozikowski AP, Gunosewoyo H, Guo S, Gaisina IN, Walter RL, Ketcherside A, McClung CA, Mesecar AD, Caldarone B (2011) Identification of a Glycogen Synthase Kinase-3 β Inhibitor that Attenuates Hyperactivity in CLOCK Mutant Mice. *Chem Med Chem* 6: 1593–1602.
<https://doi.org/10.1002/cmdc.201100188>
112. Arey R, McClung CA (2012) An inhibitor of casein kinase 1 ϵ/δ partially normalizes the manic-like behaviors of the Clock Δ 19 mouse. *Behav Pharmacol* 23: 392–396.
<https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e32835651fd>
113. Mukherjee S, Coque L, Cao J-L, Kumar J, Chakravarty S, Asaithamby A, Graham A, Gordon E, Enwright JF, DiLeone RJ, Birnbaum SG, Cooper DC, McClung CA (2010) Knockdown of Clock in the Ventral Tegmental Area Through RNA Interference Results in a Mixed State of Mania and Depression-Like Behavior. *Biol Psychiatry* 68: 503–511.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.04.031>
114. Qiu P, Jiang J, Liu Z, Cai Y, Huang T, Wang Y, Liu Q, Nie Y, Liu F, Cheng J, Li Q, Tang Y-C, Poo M, Sun Q, Chang H-C (2019) BMAL1 knockout macaque monkeys display reduced sleep and psychiatric disorders. *Natl Sci Rev* 6: 87–100.
<https://doi.org/10.1093/nsr/nwz002>
115. Landgraf D, Long JE, Proulx CD, Barandas R, Malinow R, Welsh DK (2016) Genetic Disruption of Circadian Rhythms in the Suprachiasmatic Nucleus Causes Helplessness, Behavioral Despair, and Anxiety-like Behavior in Mice. *Biol Psychiatry* 80: 827–835.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.03.1050>
116. Leliavski A, Shostak A, Husse J, Oster H (2014) Impaired Glucocorticoid Production and Response to Stress in Arntl-Deficient Male Mice. *Endocrinology* 155: 133–142.
<https://doi.org/10.1210/en.2013-1531>
117. Jager J, O'Brien WT, Manlove J, Krizman EN, Fang B, Gerhart-Hines Z, Robinson MB, Klein PS, Lazar MA (2014) Behavioral Changes and Dopaminergic Dysregulation in Mice Lacking the Nuclear Receptor Rev-erb α . *Mol Endocrinol* 28: 490–498.
<https://doi.org/10.1210/me.2013-1351>
118. Spencer S, Falcon E, Kumar J, Krishnan V, Mukherjee S, Birnbaum SG, McClung CA (2013) Circadian genes Period 1 and Period 2 in the nucleus accumbens regulate anxiety-related behavior. *Eur J Neurosci* 37: 242–250.
<https://doi.org/10.1111/ejn.12010>
119. Li Y, Li G, Li J, Cai X, Sun Y, Zhang B, Zhao H (2021) Depression-like behavior is associated with lower Per2 mRNA expression in the lateral habenula of rats. *Genes, Brain Behav* 20.
<https://doi.org/10.1111/gbb.12702>
120. Zhang L, Hirano A, Hsu P-K, Jones CR, Sakai N, Okuro M, McMahon T, Yamazaki M, Xu Y, Saigoh N, Saigoh K, Lin S-T, Kaasik K, Nishino S, Ptáček LJ, Fu Y-H (2016) A PERIOD3 variant causes a circadian phenotype and is associated with a seasonal mood trait. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1600039113>
121. Huang J, Zhong Z, Wang M, Chen X, Tan Y, Zhang S, He W, He X, Huang G, Lu H, Wu P, Che Y, Yan Y-L, Postlethwait JH, Chen W, Wang H (2015) Circadian Modulation of Dopamine Levels and Dopaminergic Neuron Development Contributes to Attention Deficiency and Hyperactive Behavior. *J Neurosci* 35: 2572–2587.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2551-14.2015>
122. De Bundel D, Gangarossa G, Biever A, Bonnefont X, Valjent E (2013) Cognitive dysfunction, elevated anxiety, and reduced cocaine response in circadian clock-deficient cryptochrome knockout mice. *Front Behav Neurosci* 7.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00152>
123. Tapia-Orsorio A, Salgado-Delgado R, Angeles-Castellanos M, Escobar C (2013) Disruption of circadian rhythms due to chronic constant light leads to depressive and anxiety-like behaviors in the rat. *Behav Brain Res* 252: 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.05.028>
124. Walker WH, Borniger JC, Gaudier-Diaz MM, Hecmarie Meléndez-Fernández O, Pascoe JL, Courtney DeVries A, Nelson RJ (2020) Acute exposure to low-level light at night is sufficient to induce neurological changes and depressive-like behavior. *Mol Psychiatry* 25: 1080–1093.
<https://doi.org/10.1038/s41380-019-0430-4>
125. Borniger JC, McHenry ZD, Abi Salloum BA, Nelson RJ (2014) Exposure to dim light at night during early development increases adult anxiety-like responses. *Physiol Behav* 133: 99–106.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.05.012>
126. Bedrosian TA, Galan A, Vaughn CA, Weil ZM, Nelson RJ (2013) Light at Night Alters Daily Patterns of Cortisol and Clock Proteins in Female Siberian Hamsters. *J Neuroendocrinol* 25: 590–596.
<https://doi.org/10.1111/jne.12036>

127. Karatsoreos IN, Bhagat S, Bloss EB, Morrison JH, McEwen BS (2011) Disruption of circadian clocks has ramifications for metabolism, brain, and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 1657–1662. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018375108>
128. Valvassori SS, Resende WR, Dal-Pont G, Sangaletti-Pereira H, Gava FF, Peterle BR, Carvalho AF, Varela RB, Dal-Pizzol F, Quevedo J (2017) Lithium ameliorates sleep deprivation-induced mania-like behavior, hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis alterations, oxidative stress and elevations of cytokine concentrations in the brain and serum of mice. *Bipolar Disord* 19: 246–258. <https://doi.org/10.1111/bdi.12503>
129. Wells AM, Ridener E, Bourbonais CA, Kim W, Pantazopoulos H, Carroll FI, Kim K-S, Cohen BM, Carlezon WA (2017) Effects of Chronic Social Defeat Stress on Sleep and Circadian Rhythms Are Mitigated by Kappa-Opioid Receptor Antagonism. *J Neurosci* 37: 7656–7668. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0885-17.2017>
130. Henderson F, Vialou V, El Mestikawy S, Fabre V (2017) Effects of Social Defeat Stress on Sleep in Mice. *Front Behav Neurosci* 28(11): 227. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00227>
131. Ota SM, Suchecki D, Meerlo P (2018) Chronic social defeat stress suppresses locomotor activity but does not affect the free-running circadian period of the activity rhythm in mice. *Neurobiol Sleep Circadian Rhythm* 5: 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.nbscr.2018.03.002>
132. Olejníková L, Polídarová L, Šumová A (2018) Stress affects expression of the clock gene *Bmal1* in the suprachiasmatic nucleus of neonatal rats via glucocorticoid-dependent mechanism. *Acta Physiol* 223: e13020. <https://doi.org/10.1111/apha.13020>
133. Levitas-Djerbi T, Appelbaum L (2017) Modeling sleep and neuropsychiatric disorders in zebrafish. *Curr Opin Neurobiol* 44: 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.02.017>
134. Tang Y-Q, Li Z-R, Zhang S-Z, Mi P, Chen D-Y, Feng X-Z (2019) Venlafaxine plus melatonin ameliorate reserpine-induced depression-like behavior in zebrafish. *Neurotoxicol Teratol* 76: 106835. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2019.106835>

Molecular Genetic Mechanisms of Circadian Rhythm Regulation and Their Role in Psychopathology

K. V. Smirnova^{a, b, *}, N. D. Chizhova^{a, b}, E. V. Gerasimova^c,
A. V. Kalueff^{a, b, c, d, e, f}, and T. G. Amstislavskaya^{a, b, **}

^aScientific Research Institute of Neurosciences and Medicine, Novosibirsk, Russia

^bNovosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

^cSirius University of Science and Technology, Sochi, Russia

^dSt. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

^eUral Federal University, Yekaterinburg, Russia

^fAlmazov National Medical Research Center, Ministry of Healthcare of Russian Federation,
St. Petersburg, Russia

*e-mail: vedelina@mail.ru

**e-mail: amstislavskayag@neuronm.ru

Circadian rhythms are cyclic fluctuations in the intensity of biological processes associated with the change of day and night, to which many organisms have adapted during the evolution. Disturbances in circadian rhythms are triggered by both environmental factors (e.g., altering the time zone or the length of day/night) and disrupted internal regulation of cycles (e.g., mutations of key clock genes). These changes can lead to the pathogenesis of various diseases, including psychopathologies. Since the mechanisms underlying circadian regulation are rather evolutionarily conservative, experimental animal models are actively used to probe these processes and their relationship with psychopathologies. Here, we discuss the regulation of circadian rhythms, as well as their cross-taxon similarities and differences between mammals and teleost fish (zebrafish, *Danio rerio*). We also discuss recent findings on molecular genetic mechanisms underlying the regulation of circadian rhythms and their link to pathogenesis of mental disorders in humans and model organisms.

Keywords: circadian rhythms, affective disorders, psychopathology modeling, experimental models, rodents, zebrafish

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

МОДЕЛИРОВАНИЕ ТАУПАТИЙ НА *DANIO RERIO*

© 2023 г. М. М. Котова¹, Т. О. Колесникова¹, А. В. Калуев^{1, 2, 3, 4, 5, *}

¹Научный центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет “Сириус”,
Федеральная территория Сириус, Россия

²Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия

³Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия

⁴Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова МЗ РФ,
Санкт-Петербург, Россия

⁵Российский научный центр радиологии и хирургических технологий им. акад. А.М. Гранова
МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: avkalueff@gmail.com

Поступила в редакцию 21.03.2023 г.

После доработки 23.06.2023 г.

Принята к публикации 25.06.2023 г.

Таупатии — гетерогенная группа прогрессирующих нейродегенеративных заболеваний, вызванных накоплением в мозге агрегатов тау-белка. Тау-белок стабилизирует состояние микротрубочек и регулирует аксональный транспорт, однако при гиперфосфорилировании начинает откладываться в мозге в виде агрегатов, являясь основным патогенетическим механизмом возникновения таупатий. По степени вовлеченности тау-белка в патогенез заболевания выделяют первичные и вторичные таупатии. Наиболее распространенной вторичной таупатией является болезнь Альцгеймера. Экспериментальные модели на животных являются важным методом исследования физиологии тау-белка и патогенеза таупатий. В работе обсуждаются современные представления о молекулярных механизмах таупатий, а также существующие экспериментальные модели таупатий на новых альтернативных модельных объектах — рыбах зебрании (*zebrafish*, *Danio rerio*), и новые направления исследований в данной области.

Ключевые слова: зебрании, таупатии, животные модели, нейродегенерация, тау-белок

DOI: 10.31857/S0869813923110067, **EDN:** GUUNFA

ВВЕДЕНИЕ

Таупатии представляют собой гетерогенную группу серьезных нейродегенеративных заболеваний, которые характеризуются прогрессирующими неврологическими и когнитивными симптомами и вызываются нарушением функционирования и аккумуляцией тау-белка в мозге (табл. 1). Типичными клиническими проявлениями таупатий являются различные неврологические моторные дисфункции (глазодвигательные нарушения, постуральная неустойчивость, акинезия), когнитивные нарушения — расстройства памяти (деменция), речи и поведения, а также нарушение сложных видов чувствительности [1]. На молекулярном уровне при таупатиях в мозге происходит накопление аномально свернутого тау-белка, который может быть организован в различные макромолекулярные агрегаты, включая спи-

Таблица 1. Классификация и распространенность основных таупатий человека

Патология	Встречаемость (на 100000 населения)
Первичные	
3R-таупатии	
Болезнь Пика	15–22 случаев [10]
4R-таупатии	
Прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП)	7 случаев [11]
Кортикобазальная дегенерация (КБД)	2–3 случая [11]
Деменция с аргирофильной зернистостью	40 случаев [2]
Глобулярная глиальная таупатия (ГГТ)	1–2 случая [12]
Вторичные	
Болезнь Альцгеймера (БА)	470 случаев [13]

ральные филаменты и нейрофибриллярные клубки [2]. Тау является белком, ассоциированным с микротрубочками нейрона (МАР), и вместе другими МАР-белками стабилизирует состояние микротрубочек, тем самым регулируя рост аксонов и аксональный транспорт, а также полярность нейритов [3–5]. Тау-белок также участвует в инсулиновом сигналинге центральной нервной системы (ЦНС), поскольку его дисфункции приводят к резистентности к инсулину и могут способствовать метаболическим нарушениям мозга [6].

При таупатиях патологический тау-белок внутри нейронов начинает активно взаимодействовать с нитями актина, способствуя их уплотнению и образованию пучков [1]. Это, в свою очередь, приводит к сверхжесткости клеточного цитоскелета, нарушая функции митохондрий и иницируя окислительный стресс [1]. Уплотнение цитоскелета также нарушает ядерную оболочку клеток, приводя к расслаблению нитей хроматина, в свою очередь запуская транскрипцию молчащих в норме генов и активируя апоптоз [1]. Имеются также данные о подавлении тау-белком синтеза белков (за счет снижения уровня трансляции и ингибирования биогенеза рибосом) в экспериментальных моделях, что также может играть роль в негативной регуляции долговременной памяти при таупатиях [7, 8].

Тау-белок кодируется геном *MAPT* (microtubule-associated protein tau), и у человека представлен шестью изоформами, которые различаются по содержанию экзонов (рис. 1). Активность тау-белка и связывание с микротрубочками регулируется фосфорилированием, а его гиперфосфорилирование приводит к агрегации белка и таупатиям [9]. У человека ген *MAPT* находится в 17-й хромосоме и кодирует три различных транскрипта. Первый содержит 2 тыс. пар нуклеотидов и кодирует ядерный тау-белок, который не связан со стабилизацией микротрубочек, а участвует в защите ДНК [14]. Второй транскрипт содержит 6 тыс. пар нуклеотидов и является основной формой тау-белка, локализуемой в ЦНС. Третий транскрипт содержит 8 тыс. пар нуклеотидов и обнаруживается в периферической нервной системе [15]. Ген тау-белка содержит 16 экзонов, 8 из которых подвергаются альтернативному сплайсингу [16]. Экзоны между собой отличаются вставками в N-концевом домене (изоформы N1 и N2), а также 3 или 4 повторами в домене, отвечающем за взаимодействие с микротрубочками (изоформы 3R и 4R) [15] (см. рис. 1).

Распределение сайтов фосфорилирования тау-белка асимметрично, и большинство из них располагаются на С-конце его молекулы [15]. Протеинкиназы, фосфорилирующие тау-белок, включают пролин-направленные протеинкиназы (PDPK), являющиеся серин-треониновыми киназами, а также не-PDPK протеинкиназы и

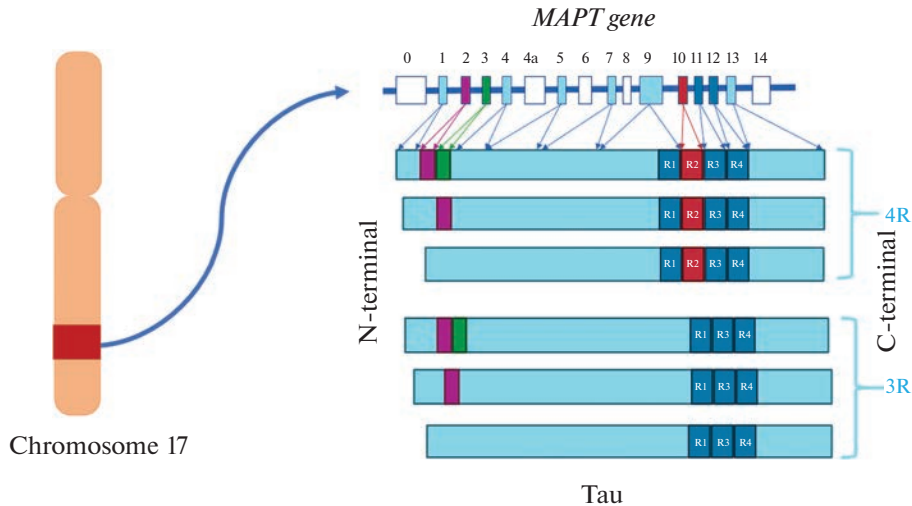


Рис. 1. Структура гена *MAPT* и изоформ кодируемого им тау-белка человека, по [16]. Экзоны 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 и 13 входят в состав всех изоформ тау-белка, присутствующих в центральной (ЦНС) и периферической нервной системе. Экзон 4a не экспрессируется в ЦНС (но встречается в периферической нервной системе), а экзон 14 не транслируется. Экзоны 2, 3 и 10 подвергаются альтернативному сплайсингу и являются ключевыми участками, по которым различаются изоформы тау-белка [16]. По числу повторов аминокислотных последовательностей (3 или 4 повтора) в домене его молекулы, отвечающем за взаимодействие с микротрубочками, различают 3R- и 4R-таупатии (см. детали в тексте).

тирозиновые протеинкиназы (ТРК) [17]. Основной PDPK является киназа-3 гликогенсинтазы (GSK-3), которая фосфорилирует тау-белок по 42 сайтам [18], и уровень которой повышается при нейродегенерациях [19]. Циклинзависимая киназа 5 (cdk5) также относится к группе PDPK, а для ее активации требуется субъединица p25, которая накапливается при болезни Альцгеймера (БА) и может быть вовлечена в ее патогенез [20]. Работа комплекса cdk5/p25 снижает способность тау-белка взаимодействовать с микротрубочками, что в итоге может привести к разрушению цитоскелета и апоптозу [20]. Среди не-PDPK киназ следует упомянуть казеинкиназу 1, представленную у людей шестью изоформами, дельта-изоформа которой локализуется с нейрофибрилярными агрегатами при различных таупатиях, например БА и ПНП [21].

Аномальное накопление тау-белка в мозге может быть обусловлено и тем, что агрегированный белок может распространяться от нейрона к нейрону и индуцировать образование макромолекулярных агрегатов в соседней клетке [22]. Патогенная форма тау-белка может передаваться как прямой транслокацией через мембрану, так и при помощи секреции мембранных органелл (т.е., с участием экзосом, аутофагии и эндосом/лизосом), а также посредством эктосом [23, 24]. Метаболизм и удаление тау-белка осуществляется деградацией протеасомой [25], а также в результате аутофагии [26].

ТАУПАТИИ

По степени вовлеченности агрегаций тау-белка в патогенез мозга выделяют первичные и вторичные таупатии. В случае, когда отложение тау является преобладающим признаком, заболевание относят к первичным таупатиям. Например, тако-

выми являются болезнь Пика, прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП), кортикобазальная дегенерация (КБД), деменция с аргирофильной зернистостью и глобулярная глиальная тауопатия (ГГТ), (табл. 1). Если помимо неправильного формирования тау-белка есть другие движущие силы патогенеза, то заболевание рассматривают как вторичную таупатию. Наиболее распространенной и клинически известной вторичной таупатией является БА [2]. Также используется классификация таупатий по количеству повторов аминокислотных последовательностей в домене молекулы тау-белка, отвечающем за взаимодействие с микротрубочками (рис. 1). В частности, к 3R-таупатиям с тройным повтором в этом домене относят болезнь Пика, к 4R таупатиям с четырьмя повторами — ПНП, КБД и ГГТ [2]. Выделяют также смешанные 4R/3R-формы таупатий, в том числе, например, БА и возраст-ассоциированная таупатия [2].

Помимо неврологических показателей, таупатии также диагностируются по молекулярным и гистологическим признакам. Например, болезнь Пика является вариантом деменции и характеризуется нарушением когнитивных функций, а также проявлением асоциальных наклонностей. При болезни Пика происходит дегенерация лобных и височных долей мозга, которая сопровождается появлением цитоплазматических телец Пика — скоплений агрегированного тау-белка. Такие включения преобладают в клетках зубчатой извилины гиппокампа, а также в астроцитах и олигодендроцитах [27].

При ПНП нейрофибриллярные клубки обнаруживаются в субталамическом ядре, базальных ганглиях и стволе мозга [28]. При этом наблюдается патоанатомическая гетерогенность, поскольку иногда преимущественно поражается ствол головного мозга, а иногда наблюдается патология в коре мозга. Еще одним отличительным признаком заболевания является астроглиальная таупатия (которая характеризуется отложением белка в астроцитах) и присутствие субкортикальных тау-клубочков [29].

Для КБД характерным патологическим признаком является накопление тау в кортикальных нейронах и глие, а также в нейронах стриатума, сопровождающееся нейродегенерацией коры и черной субстанции. При этом агрегаты тау-белка имеют форму нейрофибриллярных трубочек и сферических включений — кортикобазальных телец [30]. Деменция с аргирофильной зернистостью характеризуется мелкими диффузными включениями белка тау, которые локализуются в аксонах и дендритах. Данное состояние часто сопутствует другим таупатиям, таким как ПНП, КБД и БА [2] (табл. 1).

Основными неврологическими признаками таупатий, которые могут относиться к разным заболеваниям, являются постуральные, глазодвигательные, когнитивные и поведенческие нарушения, а также дисфункции различных видов чувствительности и речи (включая афазию и апраксию). Наиболее серьезное клиническое проявление таупатий — деменция — встречается у 3–26% пациентов. Лобно-височную деменцию (ЛВД) можно разделить на несколько синдромов с разными фенотипическими проявлениями, наиболее распространенной формой которой является поведенческий вариант ЛВД [31]. Частыми клиническими признаками ЛВД являются расстройства суждений, самоконтроля, а также социализации.

Кортикобазальный синдром (КБС) является вариантом первичной прогрессирующей афазии, которая характеризуется нарушениями речи и понимания предложений. В основе КБС может лежать как КБД, так и другие протеинопатии. При КБС и ПНП нарушается преимущественно двигательная функция: КБС характеризуется односторонней ригидностью, апраксией и феноменом чужой руки, а при ПНП наблюдается осевая ригидность, брадикинезия и дисфагия [31].

В целом, таупатии представляют собой сложные, полифакторные расстройства ЦНС, в основе которых лежат патологии тау-белка, вызванные различными при-

чинами. Например, агрегация тау-белка может быть вызвана генетическими дефектами ферментов, участвующих как в его секреции, так и в посттрансляционных модификациях [2]. И хотя генетические факторы играют ведущую роль в патогенезе таупатий, однако для некоторых из них, например, БА, показаны и другие факторы риска, включая кишечный дисбактериоз [32], воздействие токсинов окружающей среды [33] и нездоровый образ жизни [34]. Более того, на сегодняшний день не существует эффективных терапевтических подходов, позволяющих ограничить агрегацию и накопление тау-белка в мозге, поэтому лечение данных заболеваний остается преимущественно симптоматическим. Например, для коррекции двигательных нарушений применяется L-dopa [35], аффективных и поведенческих симптомов — селективные ингибиторы обратного захвата серотонина и норадреналина [36], а когнитивных нарушений — ноотропные препараты (например, мемантин) [37]. С учетом сложной полифакторной патофизиологии таупатий, а также их малой изученности и высокой клинической значимости, терапия данных заболеваний мозга является важной биомедицинской проблемой. Помимо клинических данных, большую роль в изучении патогенеза заболеваний ЦНС играют животные (экспериментальные) модели. Поэтому моделирование таупатий на животных моделях является важной стратегией трансляционных исследований в данной области.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ ТАУПАТИЙ

Широко используемым модельным объектом для изучения таупатий являются мыши, трансгенные модели которых различаются по экспрессируемой изоформе тау-белка, наличию или отсутствию патогенных мутаций, характеру распределения белка, а также степени сверхэкспрессии и паттерну фосфорилирования. Например, модель P301L, которая содержит одноименную мутацию в гене тау в нейронах мозга мыши, воспроизводит образование агрегатов тау-белка в мозге человека P301L [38]. Так как таупатии являются одним из проявлений БА, существует ряд моделей, в которых комбинируются мутации гена тау с другими мутациями, ассоциированными с данной болезнью. Так, например, у трансгенной линии мышей 3xTg-AD с мутациями в генах, ассоциированных с БА (*APP*, *PSEN*) и тау-белка, помимо агрегации фосфорилированного тау, также наблюдается формирование бляшек из бета-амилоида (еще один характерный патоморфологический признак БА), а также когнитивные нарушения и нейровоспаление [39].

Помимо генетических моделей таупатий, также имеются их фармакологические модели, чаще всего с использованием крыс. Например, введение крысам хлорида алюминия или стрептозотоцина усиливает гиперфосфорилирование тау-белка. Однако, как правило, данные модели не являются достаточно специфичными, и часто являются также моделями БА (с наличием других характерных для нее признаков), из-за чего нельзя изолированно изучить роль гиперфосфорилирования и агрегации тау-белка в ЦНС [40–42]. Внутри-гиппокампальное введение олигомеров тау-белка грызунам позволяет изучить влияние острого увеличения уровня тау, но в меньшей мере позволяет отразить временную динамику патологических изменений в результате постепенного накопления тау-белка, которое происходит в клинике у пациентов с таупатиями [43, 44].

В качестве альтернативных модельных объектов при изучении различных патогенетических аспектов таупатий также широко используются фруктовые мушки *Drosophila melanogaster* и нематоды *Caenorhabditis elegans*. Например, у мушек имеется 1 ген, кодирующий тау-белок, который содержит 5 доменов, взаимодействующих с микротрубочками (в отличие от 3 и 4 повторов у человека). В настоящий момент существует около сотни моделей таупатий на мушках, которые воспроизводят гиперфосфорилирование, но не агрегацию тау-белка, и отличаются экспрессией

разных изоформ тау-белка, включая мутантные изоформы, в том числе с различными промоторами, например, глазоспецифичными [45]. *C. elegans* экспрессируют две изоформы пептида, гомологичные тау-белку человека [46]. На сегодняшний день известно около 20 моделей таупатий на нематодах, которые также отличаются изоформами и промоторами, а также хорошо воспроизводят прогрессирующий (возраст-зависимый) характер патогенеза [46].

Наряду с грызунами и беспозвоночными созданы экспериментальные модели таупатий на новых модельных объектах — рыбах зебраданио (*zebrafish*, *Danio rerio*). Настоящий обзор обсуждает существующие экспериментальные модели таупатий на зебраданио и новые направления исследований в данной области.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ТАУПАТИЙ НА ЗЕБРАДАНИО

Нейробиология зебраданио

Зебраданио — пресноводная костистая рыба, которая обитает в Южной Азии и обладает рядом характеристик, делающих ее популярным модельным объектом для изучения физиологии и патофизиологии ЦНС [47–50]. У зебраданио представлены все основные нейромедиаторы, характерные для позвоночных, в том числе глутамат, гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), моноамины, ацетилхолин, гистамин, глицин, эндоканабиноиды и пурины. Кроме того, наблюдается высокое сходство с человеком в процессах синтеза и метаболизма нейромедиаторов, которые подробно изучены к настоящему моменту [51, 52]. На зебраданио также можно оценить широкий спектр поведенческих реакций. В частности, они демонстрируют социальное, тревожное и ориентировочно-исследовательское поведение, и, несмотря на отсутствие коры и гиппокампа, демонстрируют выраженные когнитивные функции, память и обучение [53].

Головной мозг зебраданио по своему строению достаточно консервативен и представлен передним, средним и задним мозгом [54]. Передний мозг, в свою очередь, состоит из конечного мозга (паллий, субпаллий и обонятельные луковицы), промежуточного мозга и гипоталамуса. Из-за того, что мозг зебраданио развивается путем инвагинации, некоторые области, включая гиппокамп и миндалину, у зебраданио не представлены, а их функции выполняют другие структуры (например, одна из зон паллия эквивалентна зубчатой извилине гиппокампа). В целом, основные функции конечного мозга рыб — это регуляция памяти, эмоций и социального поведения. Промежуточный мозг, состоящий из таламуса, шишковидного тела и уздечки, регулирует внимание и циркадные ритмы рыб [54]. Средний мозг зебраданио участвует в осуществлении зрительной и слуховой функций. Задний мозг представлен продолговатым мозгом, мостом и мозжечком. Мозжечок участвует в реализации двигательных рефлексов и в двигательном обучении, а ствол контролирует жизненно важные функции (например, дыхание) [54].

Практическими преимуществами зебраданио как модельного объекта в биомедицине являются высокая скорость размножения и возможность визуализации эмбрионального развития благодаря прозрачности икринок, что позволяет наблюдать за развитием как целого организма, так и отдельных его клеток. Данная модель в основном используется для оценки действия фармакологических и токсикологических агентов, которые оказывают эффект на развивающийся организм [55]. Кроме того, зебраданио используются для анализа поведенческих паттернов, оценка которых требует меньших временных затрат по сравнению с грызунами. Во многом это происходит благодаря небольшому размеру животных и поведенческих установок, а также возможности тестировать много животных параллельно. Экономия временных ресурсов, высокая генетическая и физиологическая гомология с человеком, а также развитые нейромедиаторные системы [56–58] вместе обуславлива-

ют применимость зebraданию в качестве модели для высокоэффективного скрининга нейрофармакологических препаратов и анализа нейробиологических процессов, в том числе для моделирования таупатий.

Генетические модели таупатии на зebraданию

Важная стратегия моделирования таупатий на зebraданию — это создание генетически модифицированных организмов. Например, если у человека ген тау-белка (*MAPT*) представлен в одной копии, то у зebraданию (в результате дополнительной дубликации генома у костистых рыб) имеется два паралога — *MAPT_a* и *MAPT_b*. При создании моделей таупатии на зebraданию в их геном обычно вводится человеческий *MAPT*, несущий мутации, характерные для генетически-обусловленных клинических форм таупатий. Как правило, в моделях на зebraданию используются нейрональные промоторы, такие как GATA-2 [59] или Нус [60], а также систему экспрессии Gal4/UAS, часто реализуемую и для трансгенных фруктовых мушек. Обычно создаются две конструкции (driver и responder), которые соответственно содержат активатор транскрипции Gal4 и последовательность, кодирующую мутантный тау-белок и также флуоресцентный белок (например, DsRed) для визуализации клеток, где произошло встраивание конструкции в геном [60, 61].

В модели нейрональной экспрессии *MAPT* с мутацией *2N4R* у рыб наблюдается накопление гиперфосфорилированного тау-белка и разрушение компонентов цитоскелета [59]. Одной из наиболее признанных моделей таупатий на зebraданию является нейрональная экспрессия мутантной формы тау P301L, в которой помимо гиперфосфорилирования тау-белка и образования нейрофибриллярных клубков также наблюдается нейродегенерация в спинном мозге, дефектные мотонейроны и нарушение локомоции [60].

Еще одной моделью таупатий у зebraданию является экспрессия мутантной формы тау A152T, при которой наблюдаются патологическое фосфорилирование тау-белка и образование нейрофибриллярных клубков, нейродегенерация, дефектные мотонейроны и нарушение протеасомной активности, что приводит к замедлению клиренса тау [62]. Также имеются другие генетические модели зebraданию, которые приводят к увеличению уровня фосфорилированного тау-белка, но не воспроизводят некоторые важные фенотипические проявления патологии [63–65] в отличие от вышеперечисленных моделей. Например, если для клинических таупатий характерны аксонопатии в виде дистрофии аксонов и демиелинизации, у зebraданию аксонопатия выражена в развитии дефектных мотонейронов [66], тем самым отличаясь от клинической картины.

Фармакологические модели таупатии на зebraданию

Созданные в настоящее время фармакологические модели на зebraданию значительно хуже, чем генетические (например, нокаутные или трансгенные) подходят для воспроизведения патологии таупатий. Как правило, они не моделируют биохимические признаки, характерные для болезней, а воспроизводят основной неврологический симптом — нарушение когнитивных функций. Тем не менее, таупатии можно моделировать у рыб введением оикаеовой кислоты — ингибитора протеинфосфатаз. Протеинфосфатаза PP2A является основным ферментом, который дефосфорилирует тау-белок. Таким образом, введение оикаеовой кислоты приводит к патологическому увеличению фосфорилированного тау-белка, а также вызывает когнитивные нарушения зebraданию. Однако поскольку у таких рыб происходит агрегация бета-амилоида, данная модель недостаточно специфична, и может рассматриваться скорее в контексте БА [67]. Также логично использовать введение рыбам олигомеров тау-белка или амилоидного белка (как и в случае с грызунами).

Например, зебраданию проводят внутримозговое введение олигомеров бета-амилоида с целью вызвать нейродегенерацию по типу БА. И хотя в отличие от грызунов введение взрослым особям зебраданию амилоидного пептида напрямую не вызывает фосфорилирование и агрегацию тау-белка [68, 69], таупатию (наряду с другими симптомами БА) можно вызвать при введении бета-амилоида эмбрионам рыб [70].

Поведенческие тесты на зебраданию

Поскольку основными клиническими признаками таупатий являются неврологические и когнитивные нарушения, возникает необходимость моделирования и оценки поведенческих фенотипов на зебраданию. Поведенческие тесты также являются основой создания высокопроизводительных скрининговых платформ на зебраданию, в том числе с перспективой тестирования новых препаратов для коррекции таупатий. Существуют достаточно хорошо валидированные акватические поведенческие тесты на рыбах. Например, в условиях новизны (в тесте открытого поля) у рыб, как и у грызунов, можно оценивать общую локомоцию и ориентировочно-исследовательское поведение [71]. У зебраданию в таких условиях защитная реакция проявляется в уходе в придонную область и замирании, а затем происходит плавное увеличение исследовательского поведения по мере развития привыкания (габитуации) [72, 73]. При этом подавление общего уровня локомоторной активности (снижение пройденного расстояния и скорости) будет свидетельствовать о неврологических дисфункциях рыб, повышение замирания и придонное плавание — о повышенной тревожности, а нарушение естественной габитуации — о нарушении кратковременной пространственной памяти [72, 73].

Для оценки когнитивных функций на зебраданию применяются акватические Х-, Т- и У-образные лабиринты, а также тест условно-рефлекторного пассивного избегания (УРПИ) [74, 75]. Например, в У-образном лабиринте можно оценивать спонтанную альтернацию по количеству и последовательности поворотов как показателей кратковременной памяти [76]. Рабочую пространственную память можно также оценивать по габитуации (привыканию) исследовательской активности в аквариуме. Лабиринты, как и в случае с грызунами, также могут быть использованы для оценки долговременной памяти рыб. Аналогично, УРПИ основано на запоминании контекста, в котором зебраданию предъявляли негативный стимул, в результате чего вырабатывается реакция избегания. Негативным стимулом для выработки УРПИ могут явиться резко брошенный перед рыбой небольшой камень [77–79], перемешивание воды [80] или электрический ток [81]. В моделях таупатий на зебраданию ожидается нарушение когнитивных фенотипов, а также неврологические нарушения, в том числе гиполокомоция и атаксия.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Как уже указывалось, весомым преимуществом моделирования заболеваний ЦНС на зебраданию по сравнению с грызунами является возможность быстро проводить исследования поведенческих паттернов и обширные возможности генетических манипуляций. Кроме того, есть другие, более частные практические преимущества применения рыб при моделировании таупатий. В частности, у зебраданию можно визуализировать мотонейроны на стадии развития с использованием специфичных трансгенных линий [82] или специфических к моторным аксонам антител Znp1 (мышинный моноклональный антисинапсинагмин) [82], отслеживая развитие мотонейронов в динамике таупатии. Также модель таупатии на зебраданию позволяет визуализировать *in vivo* пути деградации тау-белка, а именно работу убиквитин-протеасомной системы и аутофагия-лизосомального пути. Для этого в

первом случае в эмбрион вводят меченый субстрат, который расщепляется протеасомой [83], во втором случае используют трансгенных животных, экспрессирующих флуоресцентную метку GFP-Lc3 (Lc3 является белком, который конъюгирует с мембраной фагосомы и используется как маркер аутофагии, а GFP (green fluorescent protein) является традиционно используемым маркерным флуоресцентным белком), позволяя тем самым оценить активность аутофагии по уровню флуоресценции в мозге [84].

Соотнести гистологические характеристики таупатий, наблюдаемые у грызунов, с конкретными патологическими состояниями человека достаточно сложно. С одной стороны, трудность вызывает диагностика разных форм таупатий в клинике в силу их частой коморбидности. Так, например, деменция с агрофильной зернистостью является частым сопутствующим заболеванием при других таупатиях [2]. С другой стороны, не наблюдается абсолютного сходства между зонами распределения белковых агрегатов при нейродегенеративных состояниях у человека и грызунов. В частности, признаки патоморфологии при БА у человека в основном наблюдаются в префронтальной коре, тогда как у грызунов — преимущественно в гиппокампе [85]. Интересно, что обе данные области мозга отсутствуют у зебраданио. Тем не менее, можно попытаться провести некоторую аналогию с точки зрения трансляции патофизиологических признаков таупатий. Так, у мышей линии P301L таупатия проявляется в виде нейрофибриллярных отложений тау-белка преимущественно в коре больших полушарий, аналогично патологии КБД [38]. Работы на зебраданио также демонстрируют отложения тау-белка в виде нейрофибриллярных агрегатов, хотя распределение в головном мозге в данном случае отличается, накапливаясь у рыб в таламусе [63]. Также ряд моделей, включая зебраданио с мутантной формой тау-белка FTDP-17 и P301L, демонстрирует агрегаты в виде нейрофибриллярных клубков, характерных для ПНП [59, 60]. Таким образом, несмотря на то, что распределение агрегатов тау-белка у конкретных модельных объектов может отличаться, структура патологических образований в животных моделях соответствует некоторым формам, наблюдаемым у человека.

В целом, существующие модели таупатий на зебраданио к настоящему моменту уже показали свою высокую практическую значимость. Например, модель трансгенных зебраданио, экспрессирующих мутантную форму человеческого тау P301L, также обладают флуоресцентно помеченными митохондриями, что позволяет одновременно исследовать жизненный цикл митохондрий и моделировать таупатию [86]. В данной модели наблюдается нарушение митохондриального транспорта, тем самым указывая на вовлечение митохондриальной патологии при вызванной у рыб таупатии [86]. На зебраданио также подтверждена важная роль мозгового нейротрофического фактора (BDNF) в патогенезе таупатий. Например, экспрессия BDNF снижается у эмбрионов через 48 ч после оплодотворения в модели таупатии, вызванной экспрессией мутантной формы человеческого тау P301L, что приводит к нарушению аксонального развития, однако не вызывает нейродегенерацию [87]. Кроме того, в модели зебраданио с экспрессией P301L выявлена роль гена белка FKBP52 (FK506-связывающий белок, иммунофилин) — индуктора агрегации тау, чей нокдаун, в свою очередь, нормализует рост и развитие мотонейронов [88]. Таким образом, исследования на зебраданио указывают на возможность использования данного белка и других новых возможных мишеней при терапии таупатий.

Отдельной проблемой является моделирование глиальной таупатии, так как данная патология является распространенной как при КБД, так и ПНП. Поскольку большинство моделей на грызунах и рыбах направлено на нейрональную экспрессию тау-белка, его роль в глиальной патологии остается недостаточно изученной (табл. 2). Тем не менее, зебраданио могут быть полезны и для решения данной проблемы. Например, при сочетании сверхэкспрессии тау P301L с моделью трансгенных рыб

Таблица 2. Открытые вопросы в области экспериментального моделирования таупатий

Открытые вопросы
• Как могут быть созданы новые эффективные фармакологические и фармакогенетические модели таупатий на зебраданио? • Насколько функциональные изменения при вторичных таупатиях отражают изменения при первичных? Например, насколько возможно использовать модели болезни Альцгеймера (БА) у рыб как прокси для изучения первичных таупатий? • Какие существуют дополнительные ранние (досимптомные) поведенческие и патофизиологические биомаркеры таупатий у зебраданио? • Оказывает ли влияние хронический стресс на развитие таупатий? Если да, то каковы механизмы такого влияния, и особенности у рыб (по сравнению с грызунами)? • Как факторы окружающей среды (например, ее загрязнение) влияют на развитие таупатий? Каким образом можно воспроизводить влияние данных средовых факторов в животных моделях, в том числе акватических? • Наличие сопутствующих заболеваний может осложнить диагностику таупатий, например, БА [104]. Каким образом возможно решить эту проблему? • Нарушение аутофагии способствует патогенезу тау-ассоциированной нейродегенерации [105]. Будет ли терапевтическая стратегия, основанная на активации аутофагии, успешна для лечения разных форм таупатий? Будет ли такая стратегия работать для вторичных таупатий? • Ингибирование системы mTOR опосредует деградацию фосфорилированного тау-белка. Какой вклад в патогенез таупатий вносят mTORопатии? И, наоборот, возможно ли уменьшить таупатию посредством воздействия на mTOR-сигналинг? • Какую роль играют эпигенетические факторы в патогенезе таупатий? • Какова роль нейроглиальных взаимодействий при развитии таупатий? Какова специфика вовлечения нейронов и глии в моделях таупатии зебраданио? • Показано, что некоторые препараты при таупатии имеют пол-зависимые терапевтические эффекты [106]. Есть ли разница в патогенезе таупатий в зависимости от пола, и почему? • Снижение содержания тау-белка уменьшает проявление симптомов аутизма у мышей [107]. Каковы возможные механизмы взаимосвязи таупатий и расстройств аутистического спектра? Можно ли подобрать терапию, одновременно корректирующую расстройства аутистического спектра и таупатии? • Известно, что диабет является фактором риска развития таупатий. Насколько могут противодиабетические средства служить потенциальными терапевтическими агентами при таупатиях? • Возможно ли использовать терапию стволовыми клетками для коррекции таупатий? • Какова роль нейровоспаления в патогенезе таупатий? Могут ли противовоспалительные средства служить потенциальными терапевтическими агентами при таупатиях? • Каков геномный и протеомный профиль таупатий? Существуют ли общие, а также специфические (для каждого заболевания) омиксные “подписи” таупатий? • Насколько транскриптомные профили таупатий человека перекрываются с таковыми в экспериментальных моделях данного патогенеза у животных? Насколько последние общие (перекрываются) у грызунов и зебраданио?

с флуоресцентными маркерами микроглии ApoE (аполипопротеин E)-eGFP происходит изменение морфологического состояния глиальных клеток и фагоцитоз. В этой же модели показана нейропротекторная роль микроглии при экспериментальной таупатии, так как абляция глиальных клеток усиливает фосфорилирование тау-белка [89]. Таким образом, модели таупатий на зебраданио позволяют оценить особенности состояния микроглии при патогенезе, также указывая на необходи-

мость дальнейшего изучения роли астроцитов и олигодендроцитов в патогенезе таупатий.

Модели таупатий на зебрадании также могут быть использованы при тестировании потенциальных терапевтических агентов. Например, на трансгенных зебрадании, экспрессирующих человеческий тау P301L, оказывается эффективной малая молекула AR-534 — ингибитор киназы GSK3 β , снижающий фосфорилирование тау [90]. На зебрадании также протестированы несколько клинических препаратов, включая сурфен и оксалилсурфен, восстанавливающие дефекты мотонейронов при таупатии, вызванной у рыб экспрессией мутантной формы тау P301L [91]. Эмбриональная модель таупатии вызывается у зебрадании экспрессией tau-GFP, что позволяет *in vivo* отслеживать гибель нейронов. При высокоэффективном скрининге 400 соединений из экстрактов растений показано, что 45 соединений снижают вызванную таупатией нейродегенерацию [92].

Дополнительным потенциальным преимуществом генетических моделей таупатий на зебрадании является уже упомянутая дупликация части генома костистых рыб [58]. Например, при нокауте какого-то витального гена у рыб по-прежнему можно получить жизнеспособное животное, если у него останется один из парологичных генов, а функциональное проявление экспрессии гена будет выражено в меньшей степени, чем у дикого типа. Кроме того, у зебрадании, как у многих рыб, хорошо развита нейрорегенерация, и ее изучение может открыть новые терапевтические мишени при коррекции нейродегенеративных заболеваний, в том числе таупатий, основанной на механизмах нейрогенеза и нарушений нейроглиальных взаимодействий.

Изучение процессов возникновения и протекания таупатий на зебрадании открывает и другие перспективные направления исследований, в том числе оценку ранних маркеров, включая как специфические поведенческие паттерны, так и биохимические маркеры в крови или цереброспинальной жидкости. Подобная ранняя диагностика заболеваний позволит подобрать терапию до начала нейродегенерации и сохранить когнитивные способности человека. Для БА примером досимптомного поведенческого маркера может быть депрессия, которая втрое увеличивает риск БА [93], а ее коррекция антидепрессантами снижает нейродегенерацию [94]. Обнаружение подобных досимптомных физиологических маркеров таупатий позволит создать терапию на ранних стадиях болезни, тем самым существенно повышая шансы на успех терапии таупатий.

Также могут быть патогенетически связаны таупатии и диабет. Например, оба типа сахарного диабета являются фактором риска тау-опосредованной нейродегенерации [95], а у мышей с генетической моделью БА нарушается инсулиновый сигналинг [96], позволяя предположить нарушения инсулин-зависимых процессов в качестве раннего биохимического маркера таупатий. Перспективно и изучение роли системы mTOR (мишени рапамицина у млекопитающих) при таупатиях, когнитивных дисфункциях и БА [97]. Например, ингибирование mTOR способствует клиренсу тау-белка [98], и поэтому модуляция mTOR-сигналинга может являться перспективной терапевтической стратегией при таупатиях различной природы. Интересным вопросом является также роль микробиоты в развитии таупатий. К примеру, показана связь между микробиотой кишечника и развитием БА, опосредованным нейровоспалением [99], а также связь между микробиотой и тау-опосредованной нейродегенерацией, поскольку таупатия уменьшалась при нарушении микробиоты с помощью антибиотиков [100]. Подробное изучение механизмов такой взаимосвязи может быть изучено в модели зебрадании, которая используется для изучения функционирования оси “микробиота—мозг” [101].

Несмотря на ряд преимуществ зебрадании как экспериментальной модели, в моделировании таупатий у рыб имеются также и ограничения, основным из кото-

рых является гораздо меньшее количество разработанных моделей по сравнению с грызунами. В частности, отсутствуют на зебраданио фармакологические модели первичных таупатий, разработка которых представляется перспективной, поскольку существующие генетические модели в настоящее время не позволяют изучать наиболее сложную (с точки терапии и диагностики) спорадическую форму данного заболевания. С другой стороны, развитие именно генетических моделей позволяет изучать и подбирать новую перспективную форму коррекции заболевания — генную терапию. Так, например, с помощью генной терапии возможно ингибирование трансмембранных фагоцитарных рецепторов CD33, которые участвуют в иммунном ответе, экспрессируются микроглией и являются генами риска БА [102].

Другим весомым ограничением как модели является упомянутая ранее более активная (чем у млекопитающих) нейрорегенерация зебраданио, которая в принципе способна помешать оценке действия терапевтического агента при нейрорегенерации. Например, у зебраданио гораздо легче происходит компенсация нарушений ЦНС при нейротравмах и имеется гораздо больше ниш взрослого нейрогенеза, чем у человека или грызунов [103]. Поэтому на зебраданио может быть сложно смоделировать динамику протекания таупатии человека, а также оценить силу терапевтического эффекта, поскольку высокий уровень нейрорегенерации может скомпенсировать таупатию либо замаскировать потенциальный терапевтический эффект препарата. Существует также многие другие открытые вопросы моделирования таупатий на зебраданио (табл. 2), ответы на которые позволят более масштабно понять данный тип патогенеза ЦНС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время существует широкий спектр моделей таупатий на грызунах и зебраданио, важными преимуществами моделирования на которых являются скорость анализа поведения, возможность эффективного скрининга терапевтических агентов и генетических мутаций, а также оценка нейрорегенерации при нейрорегенеративном состоянии и визуализация динамики патогенеза. Существующие модели таупатий на рыбах уже доказали свою практическую значимость, поскольку на них показан ряд новых особенностей патогенеза, в том числе митохондриальной дисфункции и роли микроглии, а также показан терапевтический эффект некоторых соединений.

Тем не менее остается ряд открытых вопросов (табл. 2) и вызовов для будущих исследований в данной области, к которым можно отнести создание фармакологических и фармакогенетических моделей таупатий на зебраданио, в первую очередь — первичных таупатий. Еще одним вызовом является поиск ранних, досимптомных патофизиологических маркеров, позволяющих диагностировать болезнь на ранних стадиях. Решение этих проблем в результате будущих системных исследований на грызунах и зебраданио позволит продвинуться в понимании патогенеза таупатий и поиске терапевтических агентов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Настоящая работа поддержана средствами Научно-технологического университета “Сириус” (субсидия Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение 075-10-2021-093). Работа А.В. Калугина финансово поддержана Санкт-Петербургским государственным университетом (проект 93020614).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея статьи (А.В.К.), подготовка черновика статьи (М.М.К., Т.О.К., А.В.К.), редактирование и подготовка финальной версии (М.М.К., А.В.К.)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vasenina EE, Levin OS* (2020) Современные подходы к клинической диагностике и лечению мультисистемных дегенераций, связанных с накоплением тау-протеина. Журн неврол психиатр им СС Корсакова 120(10-2): 22–30. [*Vasenina EE, Levin OS* (2020) Contemporary approaches to clinical diagnosis and treatment of tau-protein accumulation related multisystem degenerations. Zh Nevrol Psikhiatr im SS Korsakova 120(10-2): 22–30 (In Russ)]. <https://doi.org/10.17116/jnevro202012010222>
2. *Kovacs GG* (2017) Tauopathies. Handb Clin Neurol 145: 355–368. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802395-2.00025-0>
3. *Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW* (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. Proc Natl Acad Sci U S A 72(5): 1858–1862. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.5.1858>
4. *Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW* (1977) Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. J Mol Biol 116(2): 227–247. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(77\)90214-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(77)90214-5)
5. *Kempf M, Clement A, Faissner A, Lee G, Brandt R* (1996) Tau Binds to the Distal Axon Early in Development of Polarity in a Microtubule- and Microfilament-Dependent Manner. J Neurosci 16(18): 5583–5592. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.16-18-05583.1996>
6. *Sotiropoulos I, Galas M-C, Silva JM, Skoulakis E, Wegmann S, Maina MB, Blum D, Sayas CL, Mandelkow E-M, Mandelkow E, Spillantini MG, Sousa N, Avila J, Medina M, Mudher A, Buee L* (2017) Atypical, non-standard functions of the microtubule associated Tau protein. Acta Neuropathol Commun 5(1): 91. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0489-6>
7. *Papanikolopoulou K, Roussou IG, Gouzi JY, Samiotaki M, Panayotou G, Turin L, Skoulakis EMC* (2019) Drosophila Tau Negatively Regulates Translation and Olfactory Long-Term Memory, But Facilitates Footshock Habituation and Cytoskeletal Homeostasis. J Neurosci 39(42): 8315–8329. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0391-19.2019>
8. *Evans HT, Taylor D, Kneynsberg A, Bodea L-G, Götz J* (2021) Altered ribosomal function and protein synthesis caused by tau. Acta Neuropathol Commun (91): 110. <https://doi.org/10.1186/s40478-021-01208-4>
9. *Wegmann S, Biernat J, Mandelkow E* (2021) A current view on Tau protein phosphorylation in Alzheimer's disease. Curr Opin Neurobiol 69: 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2021.03.003>
10. Pick's Disease. Accessed 20 March 2023. <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/22637-picks-disease#> (2022)
11. *Swallow DMA, Zheng CS, Counsell CE* (2022) Systematic Review of Prevalence Studies of Progressive Supranuclear Palsy and Corticobasal Syndrome. Mov Disord Clin Pract 9(5): 604–613. <https://doi.org/10.1002/mdc3.13489>
12. *Forrest SL, Kril JJ, Kovacs GG* (2021) Association Between Globular Glial Tauopathies and Frontotemporal Dementia-Expanding the Spectrum of Gliocentric Disorders: A Review. JAMA Neurol 78(8): 1004–1014. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2021.1813>
13. Всемирная Организация Здравоохранения: Деменция (2019). Accessed 2023 World Health Organization: Dementia.
14. *Sultan A, Nessler F, Violet M, Bégar S, Loyens A, Talahari S, Mansuroglu Z, Marzin D, Sergeant N, Humez S, Colin M, Bonnefoy E, Buée L, Galas MC* (2011) Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection. J Biol Chem 286(6): 4566–4575. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.199976>
15. *Wegmann S, Biernat J, Mandelkow E* (2021) A current view on Tau protein phosphorylation in Alzheimer's disease. Curr Opin Neurobiol 69: 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2021.03.003>
16. *Tapia-Rojas C, Cabezas-Opazo F, Deaton CA, Vergara EH, Johnson GVW, Quintanilla RA* (2019) It's all about tau. Prog Neurobiol 175: 54–76. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.12.005>

17. *Mietelska-Porowska A, Wasik U, Goras M, Filipek A, Niewiadomska G* (2014) Tau protein modifications and interactions: their role in function and dysfunction. *Int J Mol Sci* 15(3): 4671–4713. <https://doi.org/10.3390/ijms15034671>
18. *Hanger DP, Anderton BH, Noble W* (2009) Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med* 15(3): 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2009.01.003>
19. *Pei JJ, Tanaka T, Tung YC, Braak E, Iqbal K, Grundke-Iqbal I* (1997) Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 56(1): 70–78. <https://doi.org/10.1097/00005072-199701000-00007>
20. *Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, de la Monte S, Dikkes P, Tsai LH* (1999) Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402(6762): 615–622. <https://doi.org/10.1038/45159>
21. *Schwab C, DeMaggio AJ, Ghoshal N, Binder LI, Kuret J, McGeer PL* (2000) Casein kinase 1 delta is associated with pathological accumulation of tau in several neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging* 21(4): 503–510. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(00\)00110-x](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(00)00110-x)
22. *Fuster-Matanzo A, Hernández F, Ávila J* (2018) Tau Spreading Mechanisms; Implications for Dysfunctional Tauopathies. *Int J Mol Sci* 19(3): 645. <https://doi.org/10.3390/ijms19030645>
23. *Merezhko M, Uronen R-L, Huttunen HJ* (2020) The Cell Biology of Tau Secretion. *Front Mol Neurosci* 13: 569818. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.569818>
24. *Pooler AM, Phillips EC, Lau DHW, Noble W, Hanger DP* (2013) Physiological release of endogenous tau is stimulated by neuronal activity. *EMBO Rep* 14(4): 389–394. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.15>
25. *Cripps D, Thomas SN, Jeng Y, Yang F, Davies P, Yang AJ* (2006) Alzheimer disease-specific conformation of hyperphosphorylated paired helical filament-Tau is polyubiquitinated through Lys-48, Lys-11, and Lys-6 ubiquitin conjugation. *J Biol Chem* 281(16): 10825–10838. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512786200>
26. *Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, Cuervo AM* (2005) Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol* 64(2): 113–122. <https://doi.org/10.1093/jnen/64.2.113>
27. *Kovacs GG, Rozemuller AJM, van Swieten JC, Gelpi E, Majtenyi K, Al-Sarraj S, Troakes C, Bódi I, King A, Hortobágyi T, Esiri MM, Ansorge O, Giaccone G, Ferrer I, Arzberger T, Bogdanovic N, Nilsson T, Leissner I, Alafuzoff I, Ironside JW, Kretschmar H, Budka H* (2013) Neuropathology of the hippocampus in FTLD-Tau with Pick bodies: a study of the BrainNet Europe Consortium. *Neuropathol Appl Neurobiol* 39(2): 166–178. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2012.01272.x>
28. *Williams DR, Holton JL, Strand C, Pittman A, de Silva R, Lees AJ, Revesz T* (2007) Pathological tau burden and distribution distinguishes progressive supranuclear palsy-parkinsonism from Richardson's syndrome. *Brain* 130(6): 1566–1576. <https://doi.org/10.1093/brain/awm104>
29. *Dickson DW, Rademakers R, Hutton ML* (2007) Progressive Supranuclear Palsy: Pathology and Genetics. *Brain Pathol* 17(1): 74–82. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00054.x>
30. *Arima K* (2006) Ultrastructural characteristics of tau filaments in tauopathies: Immuno-electron microscopic demonstration of tau filaments in tauopathies. *Neuropathology* 26(5): 475–483. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2006.00669.x>
31. *Vaquero-Alicea J, Diamond MI, Joachimiak LA* (2021) Tau strains shape disease. *Acta Neuropathol* 142(1): 57–71. <https://doi.org/10.1007/s00401-021-02301-7>
32. *Kesika P, Suganthi N, Sivamaruthi BS, Chaiyasut C* (2021) Role of gut-brain axis, gut microbial composition, and probiotic intervention in Alzheimer's disease. *Life Sci* 264: 118627. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118627>
33. *Breijyeh Z, Karaman R* (2020) Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules* 25: 24. <https://doi.org/10.3390/molecules25245789>
34. *Armstrong RA* (2019) Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol* 57(2): 87–105. <https://doi.org/10.5114/fn.2019.85929>
35. *Lamb R, Rohrer JD, Lees AJ, Morris HR* (2016) Progressive Supranuclear Palsy and Corticobasal Degeneration: Pathophysiology and Treatment Options. *Curr Treat Options Neurol*

- 18(9): 42.
<https://doi.org/10.1007/s11940-016-0422-5>
36. Herrmann N, Black SE, Chow T, Cappell J, Tang-Wai DF, Lancôt KL (2012) Serotonergic function and treatment of behavioral and psychological symptoms of frontotemporal dementia. *Am J Geriatr Psychiatry* 20(9): 789–797.
<https://doi.org/10.1097/JGP.0b013e31823033f3>
 37. Alam S, Lingenfelter KS, Bender AM, Lindsley CW (2017) Classics in Chemical Neuroscience: Memantine. *ACS Chem Neurosci* 8(9): 1823–1829.
<https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.7b00270>
 38. Ni R, Chen Z, Gerez JA, Shi G, Zhou Q, Riek R, Nilsson KPR, Razansky D, Klohs J (2020) Detection of cerebral tauopathy in P301L mice using high-resolution large-field multifocal illumination fluorescence microscopy. *Biomed Opt Express* 11(9): 4989–5002.
<https://doi.org/10.1364/boe.395803>
 39. Belfiore R, Rodin A, Ferreira E, Velazquez R, Branca C, Caccamo A, Oddo S (2019) Temporal and regional progression of Alzheimer's disease-like pathology in 3xTg-AD mice. *Aging Cell* 18(1): e12873.
<https://doi.org/10.1111/accel.12873>
 40. Dey M, Singh RK (2022) Chronic oral exposure of aluminum chloride in rat modulates molecular and functional neurotoxic markers relevant to Alzheimer's disease. *Toxicol Mech Methods* 32(8): 616–627.
<https://doi.org/10.1080/15376516.2022.2058898>
 41. Tozlu Ö, Türkez H, Okay U, Ceylan O, Bayram C, Hacımuftuoğlu A, Mardinoğlu A (2022) Assessment of the neuroprotective potential of d-cycloserine and l-serine in aluminum chloride-induced experimental models of Alzheimer's disease: *In vivo* and *in vitro* studies. *Front Nutr* 9: 981889.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2022.981889>
 42. Lu Y, Dong Y, Tucker D, Wang R, Ahmed ME, Brann D, Zhang Q (2017) Treadmill Exercise Exerts Neuroprotection and Regulates Microglial Polarization and Oxidative Stress in a Streptozotocin-Induced Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis* 56(4): 1469–1484.
<https://doi.org/10.3233/jad-160869>
 43. Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Guerrero-Munoz MJ, Kiritoshi T, Neugebauer V, Jackson GR, Kaye R (2012) Alzheimer brain-derived tau oligomers propagate pathology from endogenous tau. *Sci Rep* 2: 700.
<https://doi.org/10.1038/srep00700>
 44. Moe JG, Chatterjee I, Puzzo D, Agnieszka S, Fa M, Davidowitz EJ, Arancio O (2010) P1-361: Extracellular oligomeric tau inhibits memory formation in mice. *Alzheimers* 6(4S)(Part9): S277.
<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2010.05.915>
 45. Gistelink M, Lambert JC, Callaerts P, Deraut B, Dourlen P (2012) Drosophila models of tauopathies: what have we learned? *Int J Alzheimers Dis* 2012: 970980.
<https://doi.org/10.1155/2012/970980>
 46. Giong HK, Subramanian M, Yu K, Lee JS (2021) Non-Rodent Genetic Animal Models for Studying Tauopathy: Review of *Drosophila*, Zebrafish, and *C. elegans* Models. *Int J Mol Sci* 22: 16.
<https://doi.org/10.3390/ijms22168465>
 47. Кротова НА, Лакстыгал АМ, Таранов АС, Ильин НП, Бытов МВ, Волгин АД, Амстиславская ТГ, Демин КА, Калыев АВ (2019) Зебраданио (zebrafish) как новая перспективная модель в трансляционной нейробиологии. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 105: 1417–1435. [Krotova NA, Lakstygala AM, Taranov AS, Ilyin NP, Bytov MV, Volgin AD, Amstislavskaya TG, Demin KA, Kalueff AV (2019) Zebrafish as a promising new model in translational neurobiology. *Russ J Physiol* 105: 1417–1435. (In Russ)].
<https://doi.org/10.1134/S0869813919110062>
 48. Галстян ДС, Колесникова ТО, Косицын ЮМ, Забегалов КН, Губайдуллина МА, Маслов ГО, Демин КА, Калыев АВ (2022) Моделирование и оценка судорожной активности у зебраданио (*Danio rerio*). *Обзоры клин фармакол лекарств терапии* 20: 193–199. [Galstyan DS, Kolesnikova TO, Kositsyn YM, Zabegalov KN, Gubaidullina MA, Maslov GO, Demin KA, Kalueff AV (2022) Modeling and assaying seizure activity in zebrafish (*Danio rerio*). *Rev Clin Pharmacol Drug Ther* 20: 193–199. (In Russ)].
<https://doi.org/10.17816/RCF202193-199>
 49. Державина КА, Ильин НП, Серединская МВ, Неруш МО, Захарченко КВ, Сорокин ДВ, Демин КА, Калыев АВ (2022) Зебраданио (zebrafish) как модель редких (орфанных) заболеваний нервной системы. *Рос журн персонал мед* 2: 17–32. [Derzhavina KA, Ilyin NP, Seredinskaya MV, Nerush MO, Zakharchenko KV, Sorokin DV, Demin KA, Kalueff AV (2022) Zebrafish as a model organism for rare diseases of nervous system. *Russ J Person Med* 2: 17–32. (In Russ)].
<https://doi.org/10.18705/2782-3806-2022-2-2-17-32>

50. Калугев АВ (2022) Принципы моделирования заболеваний мозга и их терапии на зебра-дании (zebrafish). Обзоры клин фармакол лекарств терапии 20: 119–122. [Kalueff AV (2022) Principles of modeling brain diseases and their therapy based on zebrafish studies. Rev Clin Pharmacol Drug Ther 20: 119–122. (In Russ)]. <https://doi.org/10.17816/RCF202119-122>
51. Horzmann KA, Freeman JL (2016) Zebrafish Get Connected: Investigating Neurotransmission Targets and Alterations in Chemical Toxicity. *Toxics* 4(3): 19. <https://doi.org/10.3390/toxics4030019>
52. Wasel O, Freeman JL (2020) Chemical and Genetic Zebrafish Models to Define Mechanisms of and Treatments for Dopaminergic Neurodegeneration. *Int J Mol Sci* 21(17): 5981. <https://doi.org/10.3390/ijms21175981>
53. Roberts A, Bill B, Glanzman D (2013) Learning and memory in zebrafish larvae. *Front Neural Circuits* 7: 126. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00126>
54. Shenoy A, Banerjee M, Upadhyay A, Bagwe-Parab S, Kaur G (2022) The Brilliance of the Zebrafish Model: Perception on Behavior and Alzheimer's Disease. *Front Behav Neurosci* 16: 861155. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.861155>
55. Chakraborty C, Hsu CH, Wen ZH, Lin CS, Agoramoorthy G (2009) Zebrafish: a complete animal model for in vivo drug discovery and development. *Curr Drug Metab* 10(2): 116–124. <https://doi.org/10.2174/138920009787522197>
56. Kalueff AV, Stewart AM, Gerlai R (2014) Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends Pharm Sci* 35(2): 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.12.002>
57. Burgess HA, Burton EA (2023) A critical review of zebrafish neurological disease models—1. The premise: neuroanatomical, cellular, and genetic homology, and experimental tractability. *Oxford Open Neurosci* 2: kvac018. <https://doi.org/10.1093/oons/kvac018>
58. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, Collins JE, Humphray S, McLaren K, Matthews L, McLaren S, Sealy I, Caccamo M, Churcher C, Scott C, Barrett JC, Koch R, Rauch GJ, White S, Chow W, Kilian B, Quintais LT, Guerra-Assunção JA, Zhou Y, Gu Y, Yen J, Vogel JH, Eyre T, Redmond S, Banerjee R, Chi J, Fu B, Langley E, Maguire SF, Laird GK, Lloyd D, Kenyon E, Donaldson S, Sehra H, Almeida-King J, Loveland J, Trevanion S, Jones M, Quail M, Willey D, Hunt A, Burton J, Sims S, McLay K, Plumb B, Davis J, Clee C, Oliver K, Clark R, Riddle C, Elliot D, Threadgold G, Harden G, Ware D, Begum S, Mortimore B, Kerry G, Heath P, Phillimore B, Tracey A, Corby N, Dunn M, Johnson C, Wood J, Clark S, Pelan S, Griffiths G, Smith M, Glithero R, Howden P, Barker N, Lloyd C, Stevens C, Harley J, Holt K, Panagiotidis G, Lovell J, Beasley H, Henderson C, Gordon D, Auger K, Wright D, Collins J, Raisen C, Dyer L, Leung K, Robertson L, Ambbridge K, Leongamornlert D, McGuire S, Gilderthorp R, Griffiths C, Manthravadi D, Nichol S, Barker G, Whitehead S, Kay M, Brown J, Murnane C, Gray E, Humphries M, Sycamore N, Barker D, Saunders D, Wallis J, Babbage A, Hammond S, Mashreghi-Mohammadi M, Barr L, Martin S, Wray P, Ellington A, Matthews N, Ellwood M, Woodmansey R, Clark G, Cooper J, Tromans A, Grafham D, Skuce C, Pandian R, Andrews R, Harrison E, Kimberley A, Garnett J, Fosker N, Hall R, Garner P, Kelly D, Bird C, Palmer S, Gehring I, Berger A, Dooley CM, Ersan-Ürün Z, Eser C, Geiger H, Geisler M, Karotki L, Kirn A, Konantz J, Konantz M, Oberländer M, Rudolph-Geiger S, Teucke M, Lanz C, Raddatz G, Osoegawa K, Zhu B, Rapp A, Widaa S, Langford C, Yang F, Schuster SC, Carter NP, Harrow J, Ning Z, Herrero J, Searle SM, Enright A, Geisler R, Plasterk RH, Lee C, Westerfield M, de Jong PJ, Zon LI, Postlethwait JH, Nüsslein-Volhard C, Hubbard TJ, Roest Crolius H, Rogers J, Stemple DL (2013) The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496(7446): 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>
59. Tomasiewicz HG, Flaherty DB, Soria JP, Wood JG (2002) Transgenic zebrafish model of neurodegeneration. *J Neurosci Res* 70(6): 734–745. <https://doi.org/10.1002/jnr.10451>
60. Paquet D, Bhat R, Sydow A, Mandelkow EM, Berg S, Hellberg S, Fälting J, Distel M, Köster RW, Schmid B, Haass C (2009) A zebrafish model of tauopathy allows in vivo imaging of neuronal cell death and drug evaluation. *J Clin Invest* 119(5): 1382–1395. <https://doi.org/10.1172/jci37537>
61. Köster RW, Fraser SE (2001) Tracing transgene expression in living zebrafish embryos. *Dev Biol* 233(2): 329–346. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0242>
62. Lopez A, Lee SE, Wojta K, Ramos EM, Klein E, Chen J, Boxer AL, Gorno-Tempini ML, Geschwind DH, Schlotawa L, Ogryzko NV, Bigio EH, Rogalski E, Weintraub S, Mesulam MM, Fleming A, Coppola G, Miller BL, Rubinsztein DC (2017) A152T tau allele causes neurodegen-

- eration that can be ameliorated in a zebrafish model by autophagy induction. *Brain* 140(4): 1128–1146.
<https://doi.org/10.1093/brain/awx005>
63. Bai Q, Garver JA, Hukriede NA, Burton EA (2007) Generation of a transgenic zebrafish model of Tauopathy using a novel promoter element derived from the zebrafish *eno2* gene. *Nucleic Acids Res* 35 (9): 6501–6516.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkm608>
 64. Wu BK, Yuan RY, Lien HW, Hung CC, Hwang PP, Chen RP, Chang CC, Liao YF, Huang CJ (2016) Multiple signaling factors and drugs alleviate neuronal death induced by expression of human and zebrafish tau proteins in vivo. *J Biomed Sci* 23: 25.
<https://doi.org/10.1186/s12929-016-0237-4>
 65. Cosacak MI, Bhattarai P, Bocova L, Dzewas T, Mashkaryan V, Papadimitriou C, Brandt K, Hol-lak H, Antos CL, Kizil C (2017) Human TAU(P301L) overexpression results in TAU hyper-phosphorylation without neurofibrillary tangles in adult zebrafish brain. *Sci Rep* 7(1): 12959.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-13311-5>
 66. Ghetti B, Oblak AL, Boeve BF, Johnson KA, Dickerson BC, Goedert M (2015) Invited review: Frontotemporal dementia caused by microtubule-associated protein tau gene (MAPT) muta-tions: a chameleon for neuropathology and neuroimaging. *Neuropathol Appl Neurobiol* 41(1): 24–46.
<https://doi.org/10.1111/nan.12213>
 67. Nada SE, Williams FE, Shah ZA (2016) Development of a Novel and Robust Pharmacological Model of Okadaic Acid-induced Alzheimer's Disease in Zebrafish. *Drug Targets in CNS Neurol. Disord* 15(1): 86–94.
<https://doi.org/10.2174/1871527314666150821105602>
 68. Bhattarai P, Thomas AK, Cosacak MI, Papadimitriou C, Mashkaryan V, Zhang Y, Kizil C (2017) Modeling Amyloid- β 42 Toxicity and Neurodegeneration in Adult Zebrafish Brain. *J Vis Exp* 128: 56014.
<https://doi.org/10.3791/56014>
 69. Bhattarai P, Thomas AK, Zhang Y, Kizil C (2017) The effects of aging on Amyloid- β 42-induced neurodegeneration and regeneration in adult zebrafish brain. *Neurogenesis* 4(1): e1322666.
<https://doi.org/10.1080/23262133.2017.1322666>
 70. Nery LR, Eltz NS, Hackman C, Fonseca R, Altenhofen S, Guerra HN, Freitas VM, Bonan CD, Vianna MR (2014) Brain intraventricular injection of amyloid- β in zebrafish embryo impairs cognition and increases tau phosphorylation, effects reversed by lithium. *PloS One* 9(9): e105862.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105862>
 71. Stewart AM, Kalueff AV (2012) The developing utility of zebrafish models for cognitive en-hancers research. *Curr Neuropsychopharmacol* 10(3): 263–271.
<https://doi.org/10.2174/157015912803217323>
 72. Галстян ДС, Колесникова ТО, Косицын ЮМ, Забегалов КН, Губайдуллина МА, Маслов ГО, Демин КА, Калуев АВ (2022) Оценка общей двигательной активности и тревожности зейбраданию (*Danio rerio*) с использованием тестов незнакомого аквариума, открытого поля, черно-белого аквариума и построения косяка. *Обзоры клин фармакол лекарств терапии* 20: 123–133. [Galstyan DS, Kolesnikova TO, Kositsyn YM, Zabegalov KN, Gubaidullina MA, Maslov GO, Demin KA, Kalueff AV (2022) Assessment of general locomotor activity and anxiety in zebrafish (*Danio rerio*) in the light-dark box (tank), the shoaling test, in the novel tank and the open field tests. *Rev Clin Pharmacol Drug Ther* 20: 123–133. (In Russ)].
<https://doi.org/10.17816/RCF202123-133>
 73. Levin ED, Bencan Z, Cerutti DT (2007) Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiol Behav* 90(1): 54–58.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.08.026>
 74. Галстян ДС, Колесникова ТО, Косицын ЮМ, Забегалов КН, Губайдуллина МА, Маслов ГО, Калуев АВ (2022) Когнитивные тесты зейбраданию (*Danio rerio*): Т- и Y-образные лабиринты. *Обзоры клин фармакол лекарств терапии* 20: 163–168. [Galstyan DS, Kolesnikova TO, Kositsyn YM, Zabegalov KN, Gubaidullina MA, Maslov GO, Kalueff AV (2022) Cognitive tests in zebrafish (*Danio rerio*): T- and Y-mazes. *Rev Clin Pharmacol Drug Ther* 20: 163–168. (In Russ)].
<https://doi.org/10.17816/RCF202163-168>
 75. Grossman L, Stewart A, Gaikwad S, Utterback E, Wu N, Dileo J, Frank K, Hart P, Howard H, Kalueff AV (2011) Effects of piracetam on behavior and memory in adult zebrafish. *Brain Res Bull* 85(1-2): 58–63.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.02.008>

76. *Lalonde R* (2002) The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neurosci Biobehav Rev* 26(1): 91–104.
[https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(01\)00041-0](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(01)00041-0)
77. *Lee Y, Lee S, Park JW, Hwang JS, Kim SM, Lyoo IK, Lee CJ, Han IO* (2018) Hypoxia-Induced Neuroinflammation and Learning-Memory Impairments in Adult Zebrafish Are Suppressed by Glucosamine. *Mol Neurobiol* 55(11): 8738–8753.
<https://doi.org/10.1007/s12035-018-1017-9>
78. *Lee Y, Kim D, Kim YH, Lee H, Lee CJ* (2010) Improvement of pentylentetrazol-induced learning deficits by valproic acid in the adult zebrafish. *Eur J Pharmacol* 643(2-3): 225–231.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.06.041>
79. *Kim YH, Lee Y, Kim D, Jung MW, Lee CJ* (2010) Scopolamine-induced learning impairment reversed by physostigmine in zebrafish. *Neurosci Res* 67:2:156–161.
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2010.03.003>
80. *Rajesh V, Mridhulmohan M, Jayaseelan S, Sivakumar P, Ganesan V* (2018) Mefenamic Acid Attenuates Chronic Alcohol Induced Cognitive Impairment in Zebrafish: Possible Role of Cholinergic Pathway. *Neurochem Res* 43(7): 1392–1404.
<https://doi.org/10.1007/s11064-018-2554-3>
81. *de Castro MR, Lima JV, Salomão de Freitas DP, de Souza Valente R, Dummer NS, de Aguiar RB, dos Santos LC, Marins LF, Geracitano LA, Monserrat JM, Barros DM* (2009) Behavioral and neurotoxic effects of arsenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*, Teleostei: Cyprinidae). *Comp Biochem Physiol PtC Toxicol Pharmacol* 150(3): 337–342.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.05.017>
82. *Zelenchuk TA, Brusés JL* (2011) In vivo labeling of zebrafish motor neurons using an mnx1 enhancer and Gal4/UAS. *Genesis* 49(7): 546–554.
<https://doi.org/10.1002/dvg.20766>
83. *Imamura S, Yabu T, Yamashita M* (2012) Protective role of cell division cycle 48 (CDC48) protein against neurodegeneration via ubiquitin-proteasome system dysfunction during zebrafish development. *J Biol Chem* 287(27): 23047–23056.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.332882>
84. *Mathai BJ, Meijer AH, Simonsen A* (2017) Studying Autophagy in Zebrafish. *Cells* 6(3): 21.
<https://doi.org/10.3390/cells6030021>
85. *Jester HM, Gosrani SP, Ding H, Zhou X, Ko MC, Ma T* (2022) Characterization of Early Alzheimer's Disease-Like Pathological Alterations in Non-Human Primates with Aging: A Pilot Study. *J Alz Dis* 88(3): 957–970.
<https://doi.org/10.3233/jad-215303>
86. *Plucińska G, Paquet D, Hruscha A, Godinho L, Haass C, Schmid B, Misgeld T* (2012) In vivo imaging of disease-related mitochondrial dynamics in a vertebrate model system. *J Neurosci* 32(46): 16203–16212.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.1327-12.2012>
87. *Barbureau C, Yehya A, Silhol M, Cubedo N, Verdier JM, Maurice T, Rossel M* (2020) Neuroprotective brain-derived neurotrophic factor signaling in the TAU-P301L tauopathy zebrafish model. *Pharmacol Res* 158: 104865.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104865>
88. *Giustiniani J, Chambraud B, Sardin E, Dounane O, Guillemeau K, Nakatani H, Paquet D, Kamah A, Landrieu I, Lippens G, Baulieu EE, Tawk M* (2014) Immunophilin FKBP52 induces Tau-P301L filamentous assembly *in vitro* and modulates its activity in a model of tauopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(12): 4584–4589.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1402645111>
89. *Hassan-Abdi R, Brenet A, Bennis M, Yanicostas C, Soussi-Yanicostas N* (2019) Neurons Expressing Pathological Tau Protein Trigger Dramatic Changes in Microglial Morphology and Dynamics. *Front Neurosci* 13: 1199.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01199>
90. *Smith DG, Buffet M, Fenwick AE, Haigh D, Ife RJ, Saunders M, Slingsby BP, Stacey R, Ward RW* (2001) 3-Anilino-4-arylmaleimides: potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3). *Bioorgan Med Chem Lett* 11(5): 635–639.
[https://doi.org/10.1016/s0960-894x\(00\)00721-6](https://doi.org/10.1016/s0960-894x(00)00721-6)
91. *Alavi Naini SM, Yanicostas C, Hassan-Abdi R, Blondeel S, Bennis M, Weiss RJ, Tor Y, Esko JD, Soussi-Yanicostas N* (2018) Surfen and oxalyl surfen decrease tau hyperphosphorylation and mitigate neuron deficits in vivo in a zebrafish model of tauopathy. *Transl Neurodegener* 7: 6.
<https://doi.org/10.1186/s40035-018-0111-2>
92. *Wu BK, Yuan RY, Chang YP, Lien HW, Chen TS, Chien HC, Tong TS, Tsai HP, Fang CL, Liao YF, Chang CC, Chen RP, Huang CJ* (2016) Epicatchin isolated from *Tripterygium wilfordii* extract reduces tau-GFP-induced neurotoxicity in zebrafish embryo through the activation of Nrf2.

- Biochem Biophys Res Commun 477(2): 283–289.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.06.058>
93. Sáiz-Vázquez O, Gracia-García P, Ubillos-Landa S, Puente-Martínez A, Casado-Yusta S, Olaya B, Santabàrbara J (2021) Depression as a Risk Factor for Alzheimer's Disease: A Systematic Review of Longitudinal Meta-Analyses. *J Clin Med*. 10: 9.
<https://doi.org/10.3390/jcm10091809>
 94. Brendel M, Sauerbeck J, Greven S, Kotz S, Scheiwein F, Blautzik J, Delker A, Pogarell O, Ishii K, Bartenstein P, Rominger A (2018) Serotonin Selective Reuptake Inhibitor Treatment Improves Cognition and Grey Matter Atrophy but not Amyloid Burden During Two-Year Follow-Up in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease Patients with Depressive Symptoms. *J Alz Dis* 65(3): 793–806.
<https://doi.org/10.3233/jad-170387>
 95. Матвеева МВ, Самойлова ЮГ, Жукова НГ, Олейник ОА, Ротканк МА (2017) Таупатия и когнитивные нарушения при экспериментальном сахарном диабете. *Сахарн диабет* 20(3): 181–184. [Matveeva MV, Samoilova YG, Zhukova NG, Oleynik OA, Rotkank MA (2017) Tauopathy and cognitive impairment in experimental diabetes mellitus. *Diabetes mellitus* 20(3): 181–184. (In Russ)].
 96. Denver P, English A, McClean PL (2018) Inflammation, insulin signaling and cognitive function in aged APP/PS1 mice. *Brain Behav Immun* 70: 423–434.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.03.032>
 97. Di Domenico F, Tramutola A, Foppoli C, Head E, Perluigi M, Butterfield DA (2018) mTOR in Down syndrome: Role in Aβ and tau neuropathology and transition to Alzheimer disease-like dementia. *Free Radic Biol Med* 114 :94–101.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.08.009>
 98. Morawe MP, Liao F, Amberg W, van Bergeijk J, Chang R, Gulino M, Hamilton C, Hoft C, Lumpkin C, Mastis B, McGlame E, Nuber J, Plaas C, Ravikumar B, Roy K, Schanzenbächer M, Tierno J, Lakics V, Dellovade T, Townsend M (2022) Pharmacological mTOR-inhibition facilitates clearance of AD-related tau aggregates in the mouse brain. *Eur J Pharmacol* 934: 175301.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.175301>
 99. Megur A, Baltriukienė D, Bukelskienė V, Burokas A (2020) The Microbiota–Gut–Brain Axis and Alzheimer's Disease: Neuroinflammation Is to Blame? *Nutrients* 13(1): 37.
<https://doi.org/10.3390/nu13010037>
 100. Seo DO, O'Donnell D, Jain N, Ulrich JD, Herz J, Li Y, Lemieux M, Cheng J, Hu H, Serrano JR, Bao X, Franke E, Karlsson M, Meier M, Deng S, Desai C, Dodiya H, Lelwala-Guruge J, Handley SA, Kipnis J, Sisodia SS, Gordon JI, Holtzman DM (2023) ApoE isoform- and microbiota-dependent progression of neurodegeneration in a mouse model of tauopathy. *Science* 379: 6628: eadd1236.
<https://doi.org/10.1126/science.add1236>
 101. Cornuault JK, Byatt G, Paquet ME, De Koninck P, Moineau S (2022) Zebrafish: a big fish in the study of the gut microbiota. *Curr Opin Biotechnol* 73: 308–313.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.09.007>
 102. Grieciuc A, Tanzi RE (2021) The role of innate immune genes in Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurol* 34(2): 228–236.
<https://doi.org/10.1097/wco.0000000000000911>
 103. Schmidt R, Strähle U, Scholpp S (2013) Neurogenesis in zebrafish - from embryo to adult. *Neural Dev* 8: 3.
<https://doi.org/10.1186/1749-8104-8-3>
 104. Schindler SE, Karikari TK (2022) Comorbidities confound Alzheimer's blood tests. *Nat Med* 28(7): 1349–1351.
<https://doi.org/10.1038/s41591-022-01875-3>
 105. Mahali S, Martinez R, King M, Verbeck A, Harari O, Benitez BA, Horie K, Sato C, Temple S, Karch CM (2022) Defective proteostasis in induced pluripotent stem cell models of frontotemporal lobar degeneration. *Transl Psychiatry* 12(1): 508.
<https://doi.org/10.1038/s41398-022-02274-5>
 106. Johnson NR, Yuan P, Castillo E, Lopez TP, Yue W, Bond A, Rivera BM, Sullivan MC, Hirouchi M, Giles K, Aoyagi A, Condello C (2023) CSF1R inhibitors induce a sex-specific resilient microglial phenotype and functional rescue in a tauopathy mouse model. *Nat Commun* 14(1): 118.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-35753-w>
 107. Tai C, Chang CW, Yu GQ, Lopez I, Yu X, Wang X, Guo W, Mucke L (2020) Tau Reduction Prevents Key Features of Autism in Mouse Models. *Neuron* 106(3): 421–437.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.01.038>

Modeling Taupathies in Zebrafish (*Danio rerio*)**M. M. Kotova^a, T. O. Kolesnikova^a, and A. V. Kalueff^{a, b, c, d, e, *}**^a*Division of Neurobiology, Sirius University of Science and Technology, Federal Territory Sirius, Russia*^b*Institute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*^c*Ural Federal University, Ekaterinburg, Russia*^d*Almazov National Medical Research Center, Ministry of Healthcare of Russian Federation, St. Petersburg, Russia*^e*Granov Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies, Ministry of Healthcare of Russian Federation, St. Petersburg, Russia***e-mail: avkalueff@gmail.com*

Taupathies are a group of neurodegenerative diseases characterized by the accumulation of tau-protein in the brain, causing clinical dementia. Tau protein stabilizes microtubules and regulates axonal transport, however, when hyper-phosphorylated, aggregates in the brain. Taupathies can be divided into primary and secondary (e.g., Alzheimer's disease). Experimental animal models are an important tool to study taupathies. Here, we discuss molecular mechanisms of taupathies and their existing experimental models in both rodents and novel alternative organisms, zebrafish (*Danio rerio*), as well as future novel directions of research in this field.

Keywords: zebrafish, taupathies, animal model, neurodegeneration, tau protein

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ НАРУШЕНИЙ ЦНС
ПРИ РАЗВИТИИ БОЛЕЗНЕЙ ЛИЗОСОМАЛЬНОГО НАКОПЛЕНИЯ

© 2023 г. А. С. Лебедев^{1, 2, 3}, М. М. Котова², Т. О. Колесникова²,
Д. С. Галстян^{1, 3, 4}, А. В. Калуев^{1, 2, 3, 4, 5, 6, *}

¹Научный центр мирового уровня “Центр персонализированной медицины”,
Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова МЗ РФ,
Санкт-Петербург, Россия

²Направление “Нейробиология”, Научный центр генетики и наук о жизни,
Научно-технологический университет “Сириус”, Федеральная территория Сириус, Россия

³Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия

⁴Российский научный центр радиологии и хирургических технологий
им. акад. А.М. Гранова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

⁵Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия

⁶НИИ нейронаук и медицины, Новосибирск, Россия

*E-mail: avkalueff@gmail.com

Поступила в редакцию 27.03.2023 г.

После доработки 09.08.2023 г.

Принята к публикации 09.08.2023 г.

Болезни лизосомального накопления (БЛН) представляют собой группу орфанных заболеваний, вызванных недостаточностью ферментов лизосом, в результате чего происходит накопление непереваренного материала в клетках и повреждаются ткани. Различаясь по типу накопленного материала (белки, липиды или углеводы), БЛН также чрезвычайно разнообразны по своей клинической картине. При этом наиболее частым проявлением БЛН является повреждение мозга, приводящее к различным неврологическим дисфункциям. К настоящему моменту известно более 70 БЛН, для которых практически не существует эффективной терапии. Настоящий обзор посвящен обсуждению существующих БЛН, их последствий для мозга, а также значению экспериментальных (животных) моделей для выяснения механизмов их патогенеза и поиска новых средств терапии.

Ключевые слова: болезни лизосомального накопления, лизосомы, ферментопатии, нарушения ЦНС, животные модели

DOI: 10.31857/S0869813923110080, **EDN:** GNDEZV

ВВЕДЕНИЕ

Болезни лизосомального накопления (БЛН) представляют собой группу редких генетических заболеваний (табл. 1), вызванных дисфункцией лизосомальных ферментов клетки [1]. В результате этих дисфункций нарушается аутофагия и происходит накопление непереваренного клеточного материала (белков, углеводов или липидов), вызывая повреждение различных тканей, в том числе центральной нервной системы (ЦНС) [2]. БЛН представляют собой обширный кластер заболеваний, объединенных общей этиологией (нарушением работы клеточных лизосом), которые классифицируются в зависимости от природы накапливаемого ве-

Таблица 1. Отдельные болезни лизосомального накопления (БЛН) и их встречаемость в общей популяции

Заболевания	Частота встречаемости
Болезнь Гоше	1 : 40 000—1 : 60 000
Болезнь Фабри	1 : 40 000—1 : 120 000
Метахроматическая лейкодиistroфия	1 : 40 000—1 : 160 000
Болезнь Помпе	1 : 60 000—1 : 140 000
Нейрональные цероидные липофусцинозы	1 : 100 000
Болезнь Краббе	1 : 100 000
Синдром Германски—Пудлака	1 : 500 000
Аспартилглюкозаминурия	Менее 1 : 500 000

щества на мукополисахаридозы, сфинголипидозы, ганглиозидозы, гликогенозы, липофусцинозы и гликопротеинозы [1]. К настоящему моменту известно более 70 БЛН, для которых практически не существует эффективной терапии. При этом возраст манифестации заболевания, тяжесть его течения и типичная клиническая картина могут меняться в зависимости от типа болезни. Практически для всех БЛН характерны органомегалия (особенно селезенки и печени), акромегалия, проблемы с опорно-двигательной системой, а также нарушения функционирования почек, органов пищеварения, сердца и проблемы со зрением [3, 4]. В целом, для БЛН характерна крайне высокая степень инвалидизации пациентов, а также высокая смертность (часто в раннем возрасте) и прогрессирующее течение заболевания [1].

Несмотря на то, что БЛН различаются по природе накапливающихся продуктов обмена и имеют различные клинические проявления, у них также есть множество общих симптомов. Например, при БЛН часто наблюдаются нарушения ЦНС разной степени тяжести, а также проблемы в психоэмоциональной сфере, деменция и моторные дефициты [3, 4]. Частыми признаками пациентов с БЛН являются также задержка психомоторного развития, умственная отсталость, а также различные неврологические симптомы, в том числе судороги, гипотония, атаксии и гиперрефлексия [4]. В совокупности, эти данные указывают на то, что ЦНС является важной мишенью при патогенезе БЛН, и что на нее также может быть направлена терапия данных заболеваний.

КЛИНИКА И МЕХАНИЗМЫ ПАТОГЕНЕЗА БЛН

Болезнь Гоше является наиболее распространенной БЛН, и вызвана мутацией гена *GBA*, кодирующего β -глюкоцереброзидазу, что приводит к неконтрольному накоплению глюкоцереброзида и вызывает органомегалию, поражение почек и легких, а также прогрессирующее поражение ЦНС [2]. Болезнь Гоше является наследственным заболеванием, передающимся по аутосомно-рецессивному типу. Тип 1 болезни — самый распространенный и тяжелый, характеризуется полным дефицитом данного фермента и вызывает увеличение печени и селезенки, костные деформации, нарушение нервной системы и задержку развития [5]. Тип 2 болезни Гоше характеризуется преждевременным летальным исходом и связан с дефицитом фермента. Его симптомы развиваются в раннем возрасте и прогрессируют быстро, обычно приводя к смерти в возрасте до двух лет [6]. Тип 3 болезни также

имеет раннее начало, характеризуется частичным дефицитом глюкоцереброзидазы и вызывает задержку развития, костные деформации, нарушение двигательных функций, атаксии и слабоумие [5].

При болезни Краббе происходит поражение миелиновой оболочки нервных клеток, приводя к прогрессирующей демиелинизации, что, в свою очередь, вызывает когнитивные и психомоторные нарушения, проблемы со зрением, гиперактивность и снижение интеллекта [7]. Болезнь Краббе вызвана мутацией гена *GALC*, кодирующего цереброзид- β -галактозидазу, фермент синтеза цереброзидов [2]. В результате в клетке накапливается галактозилцерамид, моногалактозилдиглицерид и галактозилсфингозин, что приводит к демиелинизации, нейротоксичности, гибели олигодендроцитов и появлению глобоидных клеток в нейроглии. Также из-за отсутствия фермента и неконтролируемого накопления в лизосомах клеток белого вещества неразрушенных молекул, возрастает количество лизосом, что приводит к разрушению и смерти клеток ЦНС [7]. Симптомы болезни Краббе могут варьировать в зависимости от формы заболевания и возраста его появления. Основные признаки данной БЛН включают задержку психомоторного развития, проблемы с двигательными функциями, мышечную слабость, спастичность мышц, нарушения зрения и слуха, а также прогрессирующую потерю когнитивных способностей [2, 7]. У некоторых пациентов симптомы могут начаться уже в раннем детстве и быстро прогрессируют, приводя к смерти в течение первых нескольких лет жизни (ранняя инфантильная форма). У других симптомы болезни могут начаться позже и прогрессировать медленнее, что позволяет им жить дольше (поздняя инфантильная или ювенильная форма) [2, 7]. На данный момент отсутствуют эффективные методы лечения болезни Краббе.

Болезнь Фабри представляет собой гликофинголипидоз, наследуемый сцепленно с X-хромосомой, и вызванный дефицитом кодируемой геном *GLA* α -галактозидазы А. Это приводит к прогрессирующему накоплению глоботриаозилцерамида внутри лизосом, неспецифически повреждая различные системы органов [2, 8]. Симптомы болезни Фабри варьируют в зависимости от формы заболевания и возраста ее манифестации и обычно включают хроническую боль, нарушения функции почек и сердечно-сосудистой системы, изменения в нервной системе, а также прогрессирующую потерю когнитивных способностей. На данный момент для болезни Фабри нет терапии, хотя определенную пользу приносит заместительная терапия α -галактозидазой А [9].

Болезнь Помпе (гликогеноз типа II) является редким наследственным заболеванием, вызванным мутацией *GAA* и дефицитом α -глюкозидазы, необходимой для разрушения гликогена, в результате чего он накапливается в лизосомах клеток различных тканей и органов [2]. Симптомы болезни Помпе могут быть различными. У новорожденных детей с ранней формой болезни Помпе наблюдаются серьезные проблемы с дыханием, мышечная гипотония, нарушения пищеварения и сердечной деятельности. У пациентов с поздней формой болезни симптомы могут начаться позже в жизни и прогрессировать медленнее [10]. При данной болезни применяется заместительная терапия α -глюкозидазой, помогающая частично метаболизировать патологически отложенный гликоген [11].

Нейрональные цероидные липофусцинозы (НЦЛ) представляют собой группу редких генетических заболеваний, которые характеризуются накоплением токсичного пигмента липофусцина в клетках различных органов, включая нервную систему [12]. НЦЛ вызваны мутациями в генах, кодирующих различные (как гидролитические, так и структурные) лизосомальные белки. Общим для всех расстройств данной группы является атрофия тканей и неврологические нарушения [12]. У паци-

ентов с НЦЛ также отмечают судорожные припадки эпилептического типа, снижение зрения, атаксию, микроцефалию, галлюцинации и психомоторную дегенерацию [2]. НЦЛ обычно проявляются в детском или подростковом возрасте и прогрессируют со временем. Как и для других БЛН, в настоящее время отсутствуют эффективные методы лечения данных заболеваний.

Мукополисахаридозы являются редкими генетическими заболеваниями, вызванные мутациями генов ферментов метаболизма мукополисахаридов [4]. При этом происходит накопление мукополисахаридов в различных тканях и органах, особенно в ЦНС [2]. Все формы мукополисахаридозов являются хроническими и прогрессирующими заболеваниями, которые могут оказывать серьезное воздействие на качество жизни пациентов. Лечение данных расстройств включает поддерживающую терапию и управление симптомами. Некоторые формы мукополисахаридозов также могут корректироваться специфической ферментной заместительной терапией или трансплантацией костного мозга [13, 14].

Метахроматическая лейкодистрофия представляет собой наследственное заболевание, вызванное дефицитом арилсульфатазы А, который приводит к накоплению цереброзид-3-сульфата в миелиновых оболочках нервных волокон. Это способствует разрушению миелина и ухудшению функционирования нервной системы [15]. Симптомы болезни могут начаться в детском или взрослом возрасте и включают в себя изменения поведения, задержку психомоторного развития, потерю моторных навыков и проблемы со зрением и слухом [16]. Лечение метахроматической лейкодистрофии включает в себя трансплантацию костного мозга и генетическую терапию [15].

Болезнь Данона затрагивает различные системы органов в результате мутации гена *LAMP2*, необходимого для нормальной работы клеток [17]. Болезнь Данона проявляется у мужчин в раннем детстве и может привести к задержке психомоторного развития, мышечной слабости, сердечной недостаточности, повышенному содержанию ферментов печени и другим проблемам. У женщин с мутацией гена *LAMP2* болезнь может проявляться в более легкой или асимптоматичной форме [17]. Лечение болезни Данона преимущественно направлено на устранение симптомов. При болезни Санфилиппо, в силу нехватки специфических лизосомальных ферментов, в организме повышается концентрация продуктов распада гепарансульфата, оказывающих токсическое воздействие на ЦНС. Метаболиты накапливаются в нейронах мозга, приводя к увеличению размеров лизосом, дистрофии отростков и истончению миелиновой оболочки нейронов [27]. При болезни Ниманна–Пика (тип С) пациенты (а также мыши с нокаутом гена *NPC1*, ассоциированного с данной БЛН) формируют лизосомальные запасы холестерина и других липидов, а также мембраны с измененным липидным составом. Динамика содержания липидов в мембранах при болезни Ниманна–Пика может способствовать изменению функционирования рецепторов глутамата, поскольку холестерин играет важную роль в организации и функционировании липидных рафтов [32, 33].

Некоторые БЛН, особенно мукополисахаридозы и гликогенозы, имеют относительно высокую встречаемость (табл. 1). В целом, на каждые 5000–8000 новорожденных в мире приходится примерно один случай БЛН. Однако частота возникновения каждой отдельной БЛН сильно варьирует [1, 8]. Распространенность БЛН (например, болезни Фабри) может также различаться по полу – 1 : 40000 у мужчин и 1 : 20000 у женщин [8, 9, 18]. Болезнь Гоше встречается у 1 : 40000–1 : 60000 новорожденных, а у евреев-ашкенази ее частота встречаемости – 1 : 800 [5]. В США частота болезни Краббе составляет 1 случай на 100000 [19], в скандинавских странах – на 50000 [20], а среди палестинских арабов – на 6000 новорожденных [7, 21].

Метахроматическая лейкодистрофия встречается с частотой 1 : 40000–160000, однако среди евреев-хаббанитов — на порядок чаще [15]. Частота встречаемости болезни Помпе — 1 : 60000 с поздним началом, и 1 : 140000 у пациентов с классической инфантильной формой [22]. Распространенность различных НЦЛ также варьирует в зависимости от популяции и этноса, глобально оцениваясь как 1 : 100000 [1], 1.6–2.4 в США и 2–7 в Скандинавии [12], см. также [23, 24] и табл. 1. Обычно БЛН наследуются по аутосомно-рецессивному механизму [2], за исключением сцепленных с X-хромосомой БЛН (болезни Данона [17], Фабри [25] и синдром Хантера [26]). Одной из главных особенностей всех БЛН является выраженная мультисистемность наносимого ими повреждения, почти всегда затрагивающая ЦНС [3].

НАРУШЕНИЯ ЦНС ПРИ БЛН

Следствием мультисистемности влияния БЛН на организм пациента является поражение ЦНС (в результате накопления токсичных веществ в нейронах или нейроглии), нарушение нейротрансмиссии, либо опосредованное воздействие на ЦНС. Например, при болезни Санфилиппо прогрессирующее накопление продуктов распада гепарансульфата провоцирует не только гибель нейронов, но и другие патологические процессы в ЦНС, в том числе нейровоспаление, нейродегенерацию и окислительный стресс [27]. При этом также наблюдаются нарушения и в работе нейромедиаторных систем: например, в модели данной БЛН у мышей наблюдается аксональная дистрофия дофамин- и холинергических, а также содержащих гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК) нейронов [28]. Наконец, дефицит или недостаточная активность определенного лизосомального фермента при БЛН также может вызвать вторичные повреждения и дисфункцию ЦНС [2]. Наиболее часто поражаются базальные ядра головного мозга, гипофиз, а также нервы глаз и спинного мозга, вызывая задержку психомоторного развития, судороги, мотосенсорные нарушения, проблемы с координацией и множественные другие неврологические дисфункции [7].

Поскольку лизосомный аппарат нейронов прямым образом вовлечен в оборот нейромедиаторов при проведении нервного импульса, БЛН влияют и на этот аспект ЦНС. В частности, дисфункция лизосом приводит к повреждению нейронов за счет дисбаланса нейромедиаторов в сторону эксайтотоксичности [29]. Лизосомы также играют роль в транспорте нейромедиаторов внутри нейрона, доставляя их к дендритам шипиков в нейронах, а также в деградации рецепторов, например ГАМК [29, 30]. Нарушение работы лизосомного аппарата нервной клетки может нарушить глутаматергическую нейротрансмиссию, оказывая влияние и на астроциты, которые также являются важным звеном в нейротрансмиссии. Это приводит к нарушению гомеостаза глутамата в астроцитах, и негативно сказывается на астроцитарных переносчиках глутамата [31], например, при болезни Ниманна–Пика [32, 33].

Наконец, влияние БЛН на ЦНС также характеризуется косвенным воздействием патологических процессов в обход метаболических путей самих нейронов, вместо которых страдают клетки и ткани, обеспечивающие их деятельность (например, эпителиальные клетки сосудов мозга при болезни Фабри, при которой нарушается мозговое кровообращение и возникают инсульты и ишемия мозга) [25]. Нарушения ЦНС при этом во многом связаны с сильными болями, которые часто приводят к развитию депрессии и тревоги у пациентов. Эффективность утилизации глюкозы нейронами мозга также снижена у пациентов с болезнью Фабри, позволяя

предположить, что нарушение энергетического обмена способствует неврологическим нарушениям при данной БЛН [34].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ БЛН

Модели на животных широко используются для изучения БЛН. Так, число исследований БЛН с использованием грызунов с каждым годом стремительно растет благодаря возможности создания нокаутов по известным таргетным генам-ортологам. Например, существуют многочисленные модели болезни Гоше на основе генетически модифицированных мышей. В частности, мутанты по гену *GBA* при рождении демонстрируют недостаточную массу тела, цианоз, аномальное дыхание, проблемы с питанием и сниженную двигательную активность, умирая в течение 24 ч после рождения [35]. У животных с генетически сниженной активностью глюкоцереброзидазы в мозге (до 25%) в разных органах и тканях появляются клетки Гоше (макрофаги, насыщенные липидами) и отмечается прогрессирующее накопление глюкозилцерамида [36, 37].

Подобные подходы применяются и для моделирования болезни Краббе, одной из лучших моделей которой являются мыши линии “Twitcher”, демонстрирующие практически идентичные неврологические проявления, наблюдаемые у людей с данным заболеванием. В тканях мозга и печени этих мышей наблюдается недостаток активности галактозилцерамидазы и лактозилцерамидазы I, как и при болезни Краббе человека [38]. И хотя они фенотипически нормальны при рождении, уже к 3 неделям эти мыши развивают генерализованный тремор и ослабление мышечного тонуса, приводящее к истощению и смерти (к 3 месяцам) в связи с прогрессирующей демиелинизацией нейронов [39], представляя собой биохимически и клинически валидный аналог болезни Краббе человека [38].

Как и при метахроматической лейкодиетрофии человека, линия мышей с дефицитом цереброзидсульфатазы накапливает сфинголипиды в различных тканях организма, включая нервную [16]. Хотя у больных людей наблюдаются сходные характеристики накопления, грубые дефекты белого вещества не выявлялись до достижения двухлетнего возраста. При этом годовалые мыши демонстрируют астроглиоз, уменьшение поперечного сечения аксонов, а также изменение морфологии дендритов клеток Пуркинье на фоне нарушений нейромоторной координации [16].

Для создания экспериментальной модели болезни Помпе у мышей нокаутирован ген кислой α -глюкозидазы в эмбриональных стволовых клетках [40]. Гомозиготные мыши с нокаутом по этому гену демонстрируют лизосомы, содержащие гликоген, вскоре после рождения в клетках сердечной ткани, печени и скелетных мышц. К возрасту 13 нед. у них формируются крупные очаговые отложения гликогена, а вакуолярные пространства окрашиваются положительно на кислую фосфатазу, что является характерным признаком лизосомальной патологии [40]. При нокауте к возрасту трех с половиной недель наблюдается значительное снижение подвижности и мышечной силы, развивающиеся позже в атрофию [41]. Для моделирования модели Данона создана линия мышей-нокаутов по гену, кодирующему LAMP2, из-за дефицита которого и обусловлена данная БЛН у человека [42]. Отсутствие LAMP2 в мышечном мозге вызывает реакции нейровоспаления, психомоторные нарушения и снижение обучения, что указывает на нарушение функционирования гиппокампа, вызванное неправильной работой лизосом и патологическим накоплением липидных молекул в его клетках [42].

НЦЛ также успешно смоделированы на грызунах. Например, в качестве модели НЦЛ первого типа используют мышей с нокаутом гена пальмитоил-протеин тиоэстеразы 1 — фермента, отсутствие которого обуславливает данный подтип НЦЛ у человека. Полученные нокаутные мыши повторяют многие патологические признаки, наблюдаемые у пациентов — накопление аутофлуоресцентных отложений в нейронах, тяжелые и прогрессирующие нейродегенеративные процессы в мозге, психомоторные нарушения, судороги и короткая продолжительность жизни [43]. Для создания моделей НЦЛ типов 2 и 3 используются линии мышей, нокаутные по генам *CLN2* и *CLN3*, ответственные за синтез ферментов, недостаток которых ассоциирован с данными подтипами БЛН человека. Например, мыши, нокаутные по гену *CLN3*, проявляют патологические признаки, которые имеют сходство с клиническими проявлениями НЦЛ: нарушение поведения, накопление лизосомных аутофлуоресцентных запасующих телец, повреждение сетчатки и сокращение продолжительности жизни [44]. У мышей-нокаутов по гену *CLN3*, также наблюдаются характерные аутофлуоресцентные отложения в тканях, отклонения неврологического характера, прогрессирующие со временем, снижение двигательной активности и судороги [45].

Использование грызунов в исследованиях БЛН, несомненно, имеет свои ограничения, которые могут повлиять на общую интерпретацию результатов. Например, не все БЛН могут быть полностью смоделированы у грызунов, поскольку некоторые аспекты патологии и симптомы, характерные для конкретной формы БЛН, могут быть недоступными для воссоздания у крыс и мышей или проявляться недостаточно четко. Функциональные и метаболические характеристики лизосом грызунов также могут отличаться от человеческих лизосом, влияя на метаболические пути и обработку молекул внутри клеток. Несмотря на это, грызуны являются ценными модельными организмами для исследования БЛН, способствуя развитию как фундаментальных знаний о механизмах этих заболеваний, так и разработке более эффективных методов диагностики и терапии.

МОДЕЛИРОВАНИЕ БЛН НА РЫБАХ ЗЕБРАДАНИО

Важным лабораторным животным для эффективного моделирования болезней ЦНС является зебраданио (*Danio rerio*) — вид пресноводных рыб, который широко используется в биомедицинских исследованиях [46]. Имея лизосомную систему, сходную с системой лизосом человека, зебраданио также подвержены различным заболеваниям, связанными с дисфункцией лизосом, что делает их потенциально ценным модельным организмом для изучения БЛН [47]. Например, на зебраданио можно изучать как генетические факторы, так и факторы окружающей среды, влияющие на функционирование лизосом, а также обнаруживать новые гены и биомаркеры БЛН. В частности, моделируя модель Гоше на зебраданио, нокаутируют ген *GBA*, частичная или полная утрата функций которого нарушает дифференцировку остеобластов и минерализацию костей [48], но при этом не наблюдаются неврологические нарушения.

Для создания модели болезни Краббе на рыбах созданы линии, нокаутные по генам, аналогичным человеческому гену *GALC*. У данных рыб отмечен повышенный апоптоз в нервной ткани, но не замечено накопления галактозилцерамида, что отличается от данных, полученных на человеке и грызунах, и позволяет изучать патогенез болезни Краббе в обход неконтролируемого накопления галактозилцерамида и вытекающей из этого нейротоксичности [49]. Модель болезни Помпе на зебраданио использует мутацию гена кислой α -глюкозидазы, что приводит к избыточному

накоплению гликогена в клетках печени, мозга и мышц, в целом напоминая клинический фенотип болезни [45, 50].

При моделировании болезни Данона у рыб с нокаутом по гену *LAMP2* описан кардиологический фенотип, в том числе нарастание плотности вакуолей в клетках сердечной мышцы (характерный признак аутофагии), сердечная недостаточность (снижение переносимости физической нагрузки, увеличение размеров предсердий и притупление β -адренергической сократительной реакции), а также ряд неврологических нарушений (нервно-мышечные дефекты, выражающиеся в учащенном поворачивании и кружении) [51]. Модель НЦЛ второго типа базируется на нехватке пальмитоил-протеинтиоэстеразы 1 в организме зебраданио. Рыбы-мутанты по гену данного фермента демонстрируют выраженную нейродегенерацию, микроцефалию, апоптоз в сетчатке и мозжечке, сокращением продолжительности жизни и аномальным увеличением лизосом [52]. Аналогично, для создания модели НЦЛ типа 3 на зебраданио использован нокаут гена *CLN3*, воспроизводящий патологические признаки этого заболевания человека — снижение продолжительности жизни, аксонопатию, моторные нарушения вплоть до полной потери подвижности, смерть нервных клеток, ретинопатию, и судороги [53].

В целом, зебраданио являются привлекательным модельным объектом для изучения БЛН. Дополнительным их преимуществом являются прозрачные эмбрионы, которые позволяют легко визуализировать процессы развития организма и повреждение отдельных органов и тканей. Также к настоящему моменту существует широкий спектр поведенческих и токсикологических тестов как на взрослых особях зебраданио, так и на личинках. Существуют также валидированные цитотоксические тесты на эмбрионах, которые позволяют оценить целостность лизосомальных мембран [54]. Все это является основой, позволяющей проводить высокоэффективный скрининг различных препаратов на модели зебраданио, в частности при поиске терапевтических средств. Так, к настоящему моменту уже существует ряд молекул, изученных на зебраданио и дошедших до стадии клинических испытаний. К таким веществам относятся модификация молекулы PROTO-1 (которая может использоваться для профилактики ототоксичности), клемизол (потенциальный терапевтический препарат при генетической эпилепсии) и вемурафениб (который может использоваться при артериовенозной малформации) [55]. Данные примеры иллюстрируют успешное применение модели зебраданио при поиске потенциальных терапевтических препаратов, что особенно актуально для БЛН.

В модели сфинголипидоза на зебраданио показано, что потеря миелина сопровождается нейровоспалением и усилением передачи через NF κ B и Jak-Stat путь. Таким образом, ингибиторы NF κ B/Jak-Stat могут рассматриваться в качестве потенциальных терапевтических агентов при данных патологиях [56]. Релевантность моделей БЛН на зебраданио в целом подтверждается воспроизведением симптоматики болезней, наблюдаемой у человека. Так, например, гепатомегалию и нарушение работы почек можно проследить в модели синдрома Чедиака—Хигаси, в которой нокаутируется ген регулятора переноса лизосом. Также гепатомегалия и нарушение опорно-двигательной системы наблюдаются в модели мукополисахаридоза, а нарушения в работе зрительной системы в модели муколипидоза типа IV. При этом, как и в клинике, большинство экспериментальных моделей БЛН демонстрируют нарушение развития нервной системы и поведения зебраданио [57].

Модель зебраданио также подходит для изучения метаболизма липидов, поскольку у рыб наблюдается экспрессия консервативных генов метаболизма липидов, например, кодирующих микросомальный белок-переносчик триглицери-

дов, липопротеина, холестерина и аполипопротеина С2 [58–60]. Кроме того, существуют модели нарушений обмена липидов у зебраданио, в частности раннего атеросклероза [61]. Тот факт, что зебраданио является хорошей моделью для изучения метаболизма липидов увеличивает применимость данного модельного объекта и при изучении БЛН, так как значительная часть этих болезней связана с нарушением липидного обмена, в частности при сфинголипидозах, муколипидозах и НЦЛ [57].

Зебраданио также успешно применяются для изучения роли микроглии в патогенезе ЛБН, например, муколипидоза IV типа, который при окрашивании мозга пациентов проявляется гистологически как аномальная морфология микроглии. Интересно, что другие модельные объекты не всегда подходят для исследования данного феномена. В частности, у мутантных мышей с моделью муколипидоза, которым трансплантировали клетки костного мозга дикого типа, отмечается уменьшение выраженности симптомов (двигательной недостаточности), но эффективность восстановления микроглии оказалась низкой [62]. Подобные работы проводились и на плодовых мушках, однако отсутствие у них микроглии осложняет интерпретацию полученных фенотипов [63]. Наоборот, у зебраданио модель муколипидоза обнаруживает не только фенотипы патологии, но и ухудшение взаимодействия между микроглией и нейронами [64].

Интересным вопросом при моделировании БЛН является функционирование митохондриально-лизосомальной оси. Известно, что лизосомы участвуют в аутофагии, необходимой для избавления от дисфункциональных митохондрий, при нарушении которой в клетке происходит накопление дефектных митохондрий [65]. При БЛН наблюдается изменение не только числа, но и морфологии митохондрий, в частности, их фрагментация или удлинение, а также нарушение функционирования мембраны и дыхательной цепи, что, в свою очередь, приводит к нарушению синтеза АТФ [66]. Подобные изменения показаны в модели нокаута сульфатазо-модифицирующего фактора 1 [67] и в модели ганглиозидоза на мышах [68]. При болезни Гоше у человека также наблюдается нарушение работы электрон-транспортной цепи митохондрий и снижение синтеза АТФ [69]. Соответственно восстановление митохондриальной функции уменьшает дефекты β -глюкоцереброзидазы при болезни Гоше [69]. Зебраданио могут успешно использоваться в качестве модельного объекта при изучении функционирования митохондриально-лизосомной оси. Например, существует модель трангенных зебраданио с флуоресцентно помеченными митохондриями (MitoFish), что позволяет визуализировать митохондриальную динамику [70].

Тем не менее, изучение БЛН на зебраданио имеет свои ограничения. Например, при коморбидности заболеваний мозга, поскольку часто мутации в генах, ассоциированных с БЛН, параллельно могут быть связаны и с нейродегенеративными расстройствами. В частности, болезнь Гоше часто ассоциирована с болезнью Паркинсона, которая проявляется не только у людей, страдающих БЛН, но и у бессимптомных носителей [71]. С одной стороны, подобное неспецифическое перекрывание патогенеза и признаков различных БЛН также может осложнить моделирование отдельных заболеваний на зебраданио. С другой стороны, не исключена возможность изучения клинически важных и потенциально синергичных процессов при коморбидности БЛН и нейродегенеративных расстройств ЦНС.

Еще одной биологической особенностью зебраданио является высокий уровень нейрогенеза и нейрорегенерации, и преобладание радиальной глии [72], что может создать определенные проблемы при моделировании БЛН у рыб и интерпретации полученных результатов. Тем не менее, ряд коморбидных заболеваний модель зеб-

раданию успешно воспроизводит, например, при нокауте генов ортологов, ассоциированных с болезнями Гоше, Тея—Сакса и метахроматической лейкодистрофии, получается фенотип, который имеет повышенную чувствительность к *Mycobacterium marinum*, возбудителю туберкулезо-подобной инфекции у рыб. Такая чувствительность объясняется снижением миграции макрофагов и микроглии вследствие дисфункции лизосом и накопления в них непереваренного материала. Возможно, этот механизм связан и с патогенезом других заболеваний при БЛН, включая нейродегенерацию и злокачественные образования [73].

Данный пример поднимает еще одну проблему — важность создания валидированных фармакологических моделей БЛН в дополнение к генетическим. Например, повышение вакуализированности макрофагов и их аномальной миграции может быть достигнуто инъекцией непереваренных лизосомами гранул [73]. Создание фармакологических моделей возможно и для болезни Гоше. Так, воздействие ксилозида циклофеллитолла на эмбрионы зебраданию вызывает накопление глюкозилсфингозина, что является признаком данной БЛН [74]. Тем не менее необходимость создания таких моделей остается дискуссионной. С одной стороны, фармакологические модели сильно экономят время, затрачиваемое на создание генетической модели [57]. С другой стороны, генетические модели лучше подходят как для изучения механизмов, так и для подбора терапии БЛН, поскольку причины их возникновения у человека носят генетический характер и присутствуют с самого рождения.

Дополнительно необходимо отметить дупликацию генома, специфичную для костистых рыб, благодаря которой 6 из 23 генов, ассоциированных с БЛН у зебраданию, представлены несколькими ортологами [57]. Например, для экспериментального муколипидоза, тяжелая патология на зебраданию наблюдается только в случае двойной мутации [75]. Таким образом, с одной стороны, процесс создания моделей таких БЛН усложняется, поскольку необходимо понимать биологическую роль ко-ортологов гена, ассоциированного с БЛН в организме зебраданию, чтобы определить какой мутант, одиночный или двойной, будет наиболее точно воспроизводить патологию. С другой стороны, это может стать и уникальным преимуществом моделей БЛН на зебраданию, позволяющим подробнее изучить патологию в широком диапазоне проявлений, в том числе в более мягких ее формах — например, если у двойных мутантов наблюдается летальность или высокая токсичность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Существующие экспериментальные модели БЛН на животных, прежде всего основанные на создании нокаутов у мышей, успешно воспроизводят патологию ряда БЛН, в том числе вызываемые ими нарушения ЦНС. Новые альтернативные модельные организмы, например, рыбы зебраданию, являются перспективным объектом для высокоэффективного фармакологического скрининга и уже используются для поиска потенциальных лекарственных агентов. Их дальнейшее более широкое применение позволит улучшить трансляционную значимость изучения патологии и подбора терапии БЛН, а также новые эффективные генетические (нокаутные или трансгенные) модели данных заболеваний. Наконец, многие из существующих открытых вопросов в области изучения центральных механизмов патогенеза БЛН (табл. 2) могут быть успешно решены при помощи широкого использования экспериментальных моделей данных патологий.

Таблица 2. Отдельные открытые вопросы, связанные с изучением патогенеза и моделированием патогенеза болезней лизосомального накопления (БЛН)

	Вопросы
•	Почему при БЛН так сильно варьирует возраст начала заболевания [1]?
•	Так как фенотип болезней варьирует у близнецов, предполагается участие не только генетических факторов [76]. Какой вклад вносят эпигенетические факторы в патогенез БЛН?
•	Какой вклад вносят экологические факторы в патогенез БЛН?
•	Высокий уровень нейрорегенерации у зебраданио является плюсом, который помогает изучать патологии нервной системы, или мешающим фактором при изучении состояний, ассоциированных с нейрорегенерацией?
•	Создание генетических моделей зебраданио занимает около 6 месяцев, что сопоставимо с созданием генетических моделей грызунов [57]. Каким образом можно увеличить скорость создания генетических моделей БЛН на зебраданио?
•	Как можно выявить генетические детерминанты именно <i>траектории</i> протекания БЛН?
•	Можно ли создать дополнительные фармакологические модели БЛН на грызунах и зебраданио?
•	При изменении уровня экспрессии NMDA-рецептора изменяется продолжительность жизни грызунов в модели болезни Гоше [77]. Какова роль глутаматергической системы в патогенезе болезни Гоше?
•	Каким образом можно преодолеть ограничения, связанные с коморбидностью заболеваний в модели БЛН на зебраданио?
•	Какую роль при развитии БЛН играют нейровоспаление и нейроапоптоз?
•	Уменьшаются ли симптомы патологии при БЛН в случае снижения нейровоспаления в результате терапевтического воздействия?
•	Можно ли скорректировать БЛН путем воздействия на микроглию, учитывая ее активацию при патологиях ЦНС?
•	Показано, что астроглиоз может играть важную роль при развитии ганглиозидозов [78]. Может ли воздействие на астроциты рассматриваться в качестве перспективной терапевтической стратегии этой и других БЛН?
•	Можно ли на модели зебраданио изучить генную терапию в качестве терапевтического подхода при БЛН?
•	Какой из терапевтических подходов при БЛН имеет наибольшую перспективу: ферментозаместительная или генная терапия?
•	Быстрое обнаружение заболевания играет важную роль, особенно в случае болезней ассоциированных с нейрорегенерациями [79]. Какие новые маркеры можно использовать для наиболее раннего обнаружения заболевания?
•	На грызунах показано, что изменение аутофагии при БЛН может быть тканеспецифичным, в одних тканях нарушаясь, а в других усиливаясь [80]. Присутствует ли аналогичное тканеспецифичное изменение аутофагии в организме грызунов и зебраданио?
•	Каким образом можно подобрать терапию БЛН при нарушении аутофагии в одних тканях и усилении в других?
•	Можно ли на модели зебраданио изучить трансплантации гемопоэтических стволовых клеток в качестве терапевтического подхода при БЛН?
•	Могут ли ингибиторы путей NFκB/Jak-Stat использоваться в качестве терапевтических агентов при сфинголипидозах?
•	Каким образом разработать новые антитела, специфичные к белкам аутофагии у зебраданио [81]?
•	Можно ли уменьшить симптомы БЛН путем воздействия на мишень рапамицина млекопитающих (mTOR) и mTOR-сигналинг?
•	Какие методы можно использовать, чтобы исследовать состояние лизосом отдельного человека?

Таблица 2. Окончание

	Вопросы
•	Лизосомы гетерогенны по составу и активности в нормальных условиях. Каким образом разные лизосомы вовлечены в процесс аутофагии?
•	Аналогична ли гетерогенность лизосом у человека гетерогенности лизосом у зебраданио?
•	Каким образом регулируется экспрессия лизосомальных белков-переносчиков и есть ли в данном процессе особенности у зебраданио? Если они есть, могут ли они повлиять на механизмы БЛН или действие терапевтических факторов?
•	Каким образом можно преодолеть доставку лекарств через гемато-энцефалический барьер при терапии БЛН, ассоциированных с нейродегенерацией?
•	Существует ли взаимосвязь между аномальной миграцией макрофагов и возникновением нейродегенераций при БЛН?
•	Болезнь Ниманна–Пика типа С вызвана мутациями в генах лизосомальных белков NPC1 или NPC2, которые участвуют в оттоке холестерина из лизосомального компартмента. В моделях зебраданио мутации этого белка приводят к снижению экспрессии <i>notch3</i> [82]. Какова связь между биодоступностью холестерина и нарушением передачи <i>notch3</i> и может ли <i>notch3</i> быть терапевтической мишенью?
•	LAMP2PA – белок, который перемещает целевые белки цитоплазмы через мембрану при шаперон-опосредованной аутофагии, дефект которого приводит к лизосомальной дисфункции и может являться целью для терапии [83]. Каким образом регулируется работа этого белка в организме зебраданио?

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана субсидией Министерства науки и высшего образования РФ, соглашение № 075-15-2021-301 от 20.04.2022. Коллаборация А.В.К. поддержана Санкт-Петербургским государственным университетом (проект 93020614).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Общая идея работы (А.В.К.), написание и редактирование манускрипта (А.В.К., А.С.Л., М.М.К., Т.О.К., Д.С.Г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Platt FM, d'Azzo A, Davidson BL, Neufeld EF, Tiffet CJ (2018) Lysosomal storage diseases. Nat Rev Dis Primer 4: 27. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0025-4>
2. Marques ARA, Saffig P (2019) Lysosomal storage disorders – challenges, concepts and avenues for therapy: beyond rare diseases. J Cell Sci 132: jcs221739. <https://doi.org/10.1242/jcs.221739>
3. Martina JA, Raben N, Puertollano R (2020) SnapShot: Lysosomal Storage Diseases. Cell 180: 602–602. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.01.017>
4. McKenna MC, Schuck PF, Ferreira GC (2019) Fundamentals of CNS energy metabolism and alterations in lysosomal storage diseases. J Neurochem 148: 590–599. <https://doi.org/10.1111/jnc.14577>
5. Stirmemann J, Belmatoug N, Camou F, Serratrice C, Froissart R, Caillaud C, Levade T, Astudillo L, Serratrice J, Brassier A, Rose C, Billette de Villemeur T, Berger MG (2017) A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments. Int J Mol Sci 18: 441. <https://doi.org/10.3390/ijms18020441>

6. *Rosenbloom BE, Weinreb NJ* (2013) Gaucher disease: a comprehensive review. *Crit Rev Oncog* 18: 163–175.
<https://doi.org/10.1615/critrevoncog.2013006060>
7. *Bradbury AM, Bongarzone ER, Sands MS* (2021) Krabbe disease: New hope for an old disease. *Neurosci Lett* 752: 135841.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135841>
8. *Chan B, Adam DN* (2018) A Review of Fabry Disease. *Skin Ther Lett* 23: 4–6.
9. *Mahmud HM* (2014) Fabry's disease – a comprehensive review on pathogenesis, diagnosis and treatment. *J Pak Med Assoc* 64: 189–194.
10. *Dasouki M, Jawdat O, Almadhoun O, Pasnoor M, McVey AL, Abuzinadah A, Herbelin L, Barohn RJ, Dimachkie MM* (2014) Pompe disease: literature review and case series. *Neurol Clin* 32: 751–776.
<https://doi.org/10.1016/j.ncl.2014.04.010>
11. *Kohler L, Puertollano R, Raben N* (2018) Pompe Disease: From Basic Science to Therapy. *Neurother J* 15: 928–942.
<https://doi.org/10.1007/s13311-018-0655-y>
12. *Nita DA, Mole SE, Minassian BA* (2016) Neuronal ceroid lipofuscinoses. *Epileptic Disord Int Epilepsy J* 18: 73–88.
<https://doi.org/10.1684/epd.2016.0844>
13. *Parini R, Deodato F* (2020) Intravenous Enzyme Replacement Therapy in Mucopolysaccharidoses: Clinical Effectiveness and Limitations. *Int J Mol Sci* 21: 2975.
<https://doi.org/10.3390/ijms21082975>
14. *Tomatsu S, Alméciga-Díaz CJ, Montañó AM, Yabe H, Tanaka A, Dung VC, Giugliani R, Kubaski F, Mason RW, Yasuda E, Sawamoto K, Mackenzie W, Suzuki Y, Orii KE, Barrera LA, Sly WS, Orii T* (2015) Therapies for the bone in mucopolysaccharidoses. *Mol Genet Metab* 114: 94–109.
<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2014.12.001>
15. *van Rappard DF, Boelens JJ, Wolf NI* (2015) Metachromatic leukodystrophy: Disease spectrum and approaches for treatment. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 29: 261–273.
<https://doi.org/10.1016/j.beem.2014.10.001>
16. *Hess B, Saftig P, Hartmann D, Coenen R, Lüllmann-Rauch R, Goebel HH, Evers M, von Figura K, D'Hooge R, Nagels G, De Deyn P, Peters C, Gieselmann V* (1996) Phenotype of arylsulfatase A-deficient mice: relationship to human metachromatic leukodystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 14821–14826.
<https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14821>
17. *Cenacchi G, Papa V, Pegoraro V, Marozzo R, Fanin M, Angelini C* (2020) Review: Danon disease: Review of natural history and recent advances. *Neuropathol Appl Neurobiol* 46: 303–322.
<https://doi.org/10.1111/nan.12587>
18. *Mehta A, Ricci R, Widmer U, Dehout F, Garcia de Lorenzo A, Kampmann C, Linhart A, Sunder-Plassmann G, Ries M, Beck M* (2004) Fabry disease defined: baseline clinical manifestations of 366 patients in the Fabry Outcome Survey. *Eur J Clin Invest* 34: 236–242.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2004.01309.x>
19. *Lantos JD* (2011) Dangerous and expensive screening and treatment for rare childhood diseases: the case of Krabbe disease. *Dev Disabil Res Rev* 17: 15–18.
<https://doi.org/10.1002/ddrr.133>
20. *Hult M, Darin N, von Döbeln U, Månsson J-E* (2014) Epidemiology of lysosomal storage diseases in Sweden. *Acta Paediatr* (103): 1258–1263.
<https://doi.org/10.1111/apa.12807>
21. *Zlotogora J* (1997) Autosomal recessive diseases among Palestinian Arabs. *J Med Genet* 34: 765–766.
<https://doi.org/10.1136/jmg.34.9.765>
22. *Ausems MG, Verbiest J, Hermans MP, Kroos MA, Beemer FA, Wokke JH, Sandkuijl LA, Reuser AJ, van der Ploeg AT* (1999) Frequency of glycogen storage disease type II in The Netherlands: implications for diagnosis and genetic counselling. *Eur J Hum Genet* 7: 713–716.
<https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200367>
23. *De Jesus Rojas W, Young LR* (2020) Hermansky-Pudlak Syndrome. *Semin Respir Crit Care Med* 41: 238–246.
<https://doi.org/10.1055/s-0040-1708088>
24. *Aronson NN* (1999) Aspartylglycosaminuria: biochemistry and molecular biology. *Biochim Biophys Acta* 1455: 139–154.
[https://doi.org/10.1016/s0925-4439\(99\)00076-9](https://doi.org/10.1016/s0925-4439(99)00076-9)
25. *Chan B, Adam DN* (2018) A Review of Fabry Disease. *Skin Ther Lett* 23: 4–6.
26. *Tylki-Szymańska A* (2014) Mucopolysaccharidosis type II, Hunter's syndrome. *Pediatr Endocrinol Rev* 12 Suppl 1: 107–113.
27. *Andrade F, Aldámiz-Echevarría L, Llerena M, Couce ML* (2015) Sanfilippo syndrome: Overall review. *Pediatr Int* 57: 331–338.
<https://doi.org/10.1111/ped.12636>

28. *Beard H, Luck AJ, Hassiotis S, King B, Trim PJ, Snel MF, Hopwood JJ, Hemsley KM* (2015) Determination of the role of injection site on the efficacy of intra-CSF enzyme replacement therapy in MPS IIIA mice. *Mol Genet Metab* 115: 33–40.
<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2015.03.002>
29. *Zemoura K, Ralvenius WT, Malherbe P, Benke D* (2016) The positive allosteric GABAB receptor modulator rac-BHFF enhances baclofen-mediated analgesia in neuropathic mice. *Neuropharmacology* 108: 172–178.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.04.028>
30. *Goo MS, Sancho L, Slepak N, Boassa D, Deerinck TJ, Ellisman MH, Bloodgood BL, Patrick GN* (2017) Activity-dependent trafficking of lysosomes in dendrites and dendritic spines. *J Cell Biol* 216: 2499–2513.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201704068>
31. *Sidoryk-Wegrzynowicz M, Wegrzynowicz M, Lee E, Bowman AB, Aschner M* (2011) Role of astrocytes in brain function and disease. *Toxicol Pathol* 39: 115–123.
<https://doi.org/10.1177/0192623310385254>
32. *D'Arcangelo G, Grossi D, De Chiara G, de Stefano MC, Cortese G, Citro G, Rufini S, Tancredi V, Merlo D, Frank C* (2011) Glutamatergic neurotransmission in a mouse model of Niemann-Pick type C disease. *Brain Res* 1396: 11–19.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.04.020>
33. *Vance JE* (2006) Lipid imbalance in the neurological disorder, Niemann-Pick C disease. *FEBS Lett* 580: 5518–5524.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.06.008>
34. *Lou HO, Reske-Nielsen E* (1971) the central nervous system in Fabry's disease. A clinical, pathological, and biochemical investigation. *Arch Neurol* 25: 351–359.
<https://doi.org/10.1001/archneur.1971.00490040077009>
35. *Tybulewicz VL, Tremblay ML, LaMarca ME, Willemsen R, Stubblefield BK, Winfield S, Zablocka B, Sidransky E, Martin BM, Huang SP* (1992) Animal model of Gaucher's disease from targeted disruption of the mouse glucocerebrosidase gene. *Nature* 357: 407–410.
<https://doi.org/10.1038/357407a0>
36. *Xu Y-H, Quinn B, Witte D, Grabowski GA* (2003) Viable mouse models of acid beta-glucosidase deficiency: the defect in Gaucher disease. *Am J Pathol* 163: 2093–2101.
[https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)63566-3](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)63566-3)
37. *Enquist IB, Lo Bianco C, Ooka A, Nilsson E, Månsson J-E, Ehinger M, Richter J, Brady RO, Kirik D, Karlsson S* (2007) Murine models of acute neuronopathic Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 17483–17488.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0708086104>
38. *Kobayashi T, Yamanaka T, Jacobs JM, Teixeira F, Suzuki K* (1980) The Twitcher mouse: an enzymatically authentic model of human globoid cell leukodystrophy (Krabbe disease). *Brain Res* 202: 479–483.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(80\)90159-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(80)90159-6)
39. *Duchen LW, Eicher EM, Jacobs JM, Scaravilli F, Teixeira F* (1980) Hereditary leucodystrophy in the mouse: the new mutant twitcher. *Brain J Neurol* 103: 695–710.
<https://doi.org/10.1093/brain/103.3.695>
40. *Bijvoet AG, van de Kamp EH, Kroos MA, Ding JH, Yang BZ, Visser P, Bakker CE, Verbeet MP, Oostra BA, Reuser AJ, van der Ploeg AT* (1998) Generalized glycogen storage and cardiomegaly in a knockout mouse model of Pompe disease. *Hum Mol Genet* 7: 1.53
<https://doi.org/10.1093/hmg/7.1.53>
41. *Raben N, Nagaraju K, Lee E, Kessler P, Byrne B, Lee L, LaMarca M, King C, Ward J, Sauer B, Plotz P* (1998) Targeted disruption of the acid alpha-glucosidase gene in mice causes an illness with critical features of both infantile and adult human glycogen storage disease type II. *J Biol Chem* 273.
<https://doi.org/10.1074/jbc.273.30.19086>
42. *Rothaug M, Stroobants S, Schweizer M, Peters J, Zunke F, Allerding M, D'Hooge R, Saftig P, Blanz J* (2015) LAMP-2 deficiency leads to hippocampal dysfunction but normal clearance of neuronal substrates of chaperone-mediated autophagy in a mouse model for Danon disease. *Acta Neuropathol Commun* 3.
<https://doi.org/10.1186/s40478-014-0182-y>
43. *Gupta P, Soyombo AA, Atashband A, Wisniewski KE, Shelton JM, Richardson JA, Hammer RE, Hofmann SL* (2001) Disruption of PPT1 or PPT2 causes neuronal ceroid lipofuscinosis in knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13566–13571.
<https://doi.org/10.1073/pnas.251485198>
44. *Katz ML, Johnson GS* (2001) Mouse gene knockout models for the CLN2 and CLN3 forms of ceroid lipofuscinosis. *Eur J Paediatr Neurol* 5: 109–114.
<https://doi.org/10.1053/ejpn.2000.0445>

45. Eliason SL, Stein CS, Mao Q, Tecedor L, Ding S-L, Gaines DM, Davidson BL (2007) A knock-in reporter model of Batten disease. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 27: 9826–9834.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1710-07.2007>
46. Kalueff AV, Stewart AM, Gerlai R (2014) Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends Pharmacol Sci* 35: 63–75.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.12.002>
47. Zhang T, Peterson RT (2020) Modeling Lysosomal Storage Diseases in the Zebrafish. *Front Mol Biosci* 7: 82.
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00082>
48. Zancan I, Bellesso S, Costa R, Salvalaio M, Stroppiano M, Hammond C, Argenton F, Filocamo M, Moro E (2015) Glucocerebrosidase deficiency in zebrafish affects primary bone ossification through increased oxidative stress and reduced Wnt/ β -catenin signaling. *Hum Mol Genet* 24: 1280–1294.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddu538>
49. Zizjoli D, Guarienti M, Tobia C, Gariano G, Borsani G, Bresciani R, Ronca R, Giacomuzzi E, Preti A, Gaudenzi G, Belleri M, Di Salle E, Fabrias G, Casas J, Ribatti D, Monti E, Presta M (2014) Molecular cloning and knockdown of galactocerebrosidase in zebrafish: new insights into the pathogenesis of Krabbe's disease. *Biochim Biophys Acta* 1842: 665–675.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.01.008>
50. Wu J, Yang Y, Sun C, Sun S, Li Q, Yao Y, Fei F, Lu L, Chang Z, Zhang W, Wang X, Luo F (2017) Disruption of the gaa Gene in Zebrafish Fails to Generate the Phenotype of Classical Pompe Disease. *DNA Cell Biol* 36: 10–17.
<https://doi.org/10.1089/dna.2016.3459>
51. Dvornikov AV, Wang M, Yang J, Zhu P, Le T, Lin X, Cao H, Xu X (2019) Phenotyping an adult zebrafish lamp2 cardiomyopathy model identifies mTOR inhibition as a candidate therapy. *J Mol Cell Cardiol* 133: 199–208.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2019.06.013>
52. Mahmood F, Fu S, Cooke J, Wilson SW, Cooper JD, Russell C (2013) A zebrafish model of CLN2 disease is deficient in tripeptidyl peptidase 1 and displays progressive neurodegeneration accompanied by a reduction in proliferation. *Brain J Neurol* 136: 1488–1507.
<https://doi.org/10.1093/brain/awt043>
53. Wager K, Zdebek AA, Fu S, Cooper JD, Harvey RJ, Russell C (2016) Neurodegeneration and Epilepsy in a Zebrafish Model of CLN3 Disease (Batten Disease). *PloS One* 11: e0157365.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157365>
54. Rodrigues de Souza I, Wilke Sivek T, Vaz de Oliveira JB, Di Pietro Micali Canavez A, de Albuquerque Vita N, Cigaran Schuck D, Rodrigues de Souza I, Cestari MM, Lorencini M, Leme DM (2023) Cytotoxicity Assays with Zebrafish Cell Lines. *J Vis Exp*.
<https://doi.org/10.3791/64860>
55. Patton EE, Zon LI, Langenau DM (2021) Zebrafish disease models in drug discovery: from pre-clinical modelling to clinical trials. *Nat Rev Drug Discov* 20: 611–628.
<https://doi.org/10.1038/s41573-021-00210-8>
56. Zhang T, Alonzo I, Stubben C, Geng Y, Herdman C, Chandler N, Doane KP, Pluimer BR, Trauger SA, Peterson RT (2023) A zebrafish model of combined saposin deficiency identifies acid sphingomyelinase as a potential therapeutic target. *Dis Model Mech* 16: dmm049995.
<https://doi.org/10.1242/dmm.049995>
57. Zhang T, Peterson RT (2020) Modeling Lysosomal Storage Diseases in the Zebrafish. *Front Mol Biosci* 7: 82.
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00082>
58. Marza E, Barthe C, André M, Villeneuve L, Hérou C, Babin PJ (2005) Developmental expression and nutritional regulation of a zebrafish gene homologous to mammalian microsomal triglyceride transfer protein large subunit. *Dev Dyn* 232: 506–518.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.20251>
59. Clifton JD, Lucumi E, Myers MC, Napper A, Hama K, Farber SA, Smith AB, Huryn DM, Diamond SL, Pack M (2010) Identification of novel inhibitors of dietary lipid absorption using zebrafish. *PloS One* 5: e12386.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012386>
60. Pickart MA, Klee EW, Nielsen AL, Sivasubbu S, Mendenhall EM, Bill BR, Chen E, Eckfeldt CE, Knowlton M, Robu ME, Larson JD, Deng Y, Schimmenti LA, Ellis LBM, Verfaillie CM, Hammer-schmidt M, Farber SA, Ekker SC (2006) Genome-wide reverse genetics framework to identify novel functions of the vertebrate secretome. *PloS One* 1: e104.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000104>
61. Stoletov K, Fang L, Choi S-H, Hartvigsen K, Hansen LF, Hall C, Pattison J, Juliano J, Miller ER, Almazan F, Crosier P, Witztum JL, Klemke RL, Miller YI (2009) Vascular lipid accumulation, lipoprotein oxidation, and macrophage lipid uptake in hypercholesterolemic zebrafish. *Circ Res* 104: 952–960.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.189803>

62. Walker MT, Montell C (2016) Suppression of the motor deficit in a mucopolipidosis type IV mouse model by bone marrow transplantation. *Hum Mol Genet* 25: 2752–2761.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddw132>
63. Venkatachalam K, Long AA, Elsaesser R, Nikolaeva D, Broadie K, Montell C (2008) Motor deficit in a Drosophila model of mucopolipidosis type IV due to defective clearance of apoptotic cells. *Cell* 135: 838–851.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.041>
64. Jin W, Dai Y, Li F, Zhu L, Huang Z, Liu W, Li J, Zhang M, Du J, Zhang W, Wen Z (2019) Dysregulation of Microglial Function Contributes to Neuronal Impairment in Mcoln1a-Deficient Zebrafish. *Science* 13: 391–401.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.02.031>
65. Kiselyov K, Jennigs JJ, Rbaibi Y, Chu CT (2007) Autophagy, mitochondria and cell death in lysosomal storage diseases. *Autophagy* 3: 259–262.
<https://doi.org/10.4161/auto.3906>
66. Jolly RD, Brown S, Das AM, Walkley SU (2002) Mitochondrial dysfunction in the neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). *Neurochem Int* 40: 565–571.
[https://doi.org/10.1016/s0197-0186\(01\)00128-0](https://doi.org/10.1016/s0197-0186(01)00128-0)
67. Settembre C, Fraldi A, Jahreiss L, Spampanato C, Venturi C, Medina D, de Pablo R, Tacchetti C, Rubinsztein DC, Ballabio A (2008) A block of autophagy in lysosomal storage disorders. *Hum Mol Genet* 17: 119–129.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddm289>
68. Takamura A, Higaki K, Kajimaki K, Otsuka S, Ninomiya H, Matsuda J, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E (2008) Enhanced autophagy and mitochondrial aberrations in murine G(M1)-gangliosidosis. *Biochem Biophys Res Commun* 367: 616–622.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.12.187>
69. de la Mata M, Cotán D, Oropesa-Ávila M, Garrido-Maraver J, Cordero MD, Villanueva Paz M, Delgado Pavón A, Alcocer-Gómez E, de Laveria I, Ybot-González P, Paula Zaderenko A, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Sánchez-Alcázar JA (2015) Pharmacological Chaperones and Coenzyme Q10 Treatment Improves Mutant β -Glucocerebrosidase Activity and Mitochondrial Function in Neuronopathic Forms of Gaucher Disease. *Sci Rep* 5: 10903.
<https://doi.org/10.1038/srep10903>
70. Plucińska G, Paquet D, Hruscha A, Godinho L, Haass C, Schmid B, Misgeld T (2012) *In vivo* imaging of disease-related mitochondrial dynamics in a vertebrate model system. *J Neurosci* 32: 16203–16212.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1327-12.2012>
71. Riboldi GM, Di Fonzo AB (2019) GBA, Gaucher Disease, and Parkinson's Disease: From Genetic to Clinic to New Therapeutic Approaches. *Cells* 8: 364.
<https://doi.org/10.3390/cells8040364>
72. Schmidt R, Strähle U, Scholpp S (2013) Neurogenesis in zebrafish - from embryo to adult. *Neural Develop* 8: 3.
<https://doi.org/10.1186/1749-8104-8-3>
73. Meijer AH, Aerts JM (2016) Linking Smokers' Susceptibility to Tuberculosis with Lysosomal Storage Disorders. *Dev Cell* 37: 112–113.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.04.004>
74. Su Q, Schröder SP, Lelieveld LT, Ferraz MJ, Verhoek M, Boot RG, Overkleeft HS, Aerts JMFG, Artola M, Kuo C-L (2021) Xylose-Configured Cyclophellitols as Selective Inhibitors for Glucocerebrosidase. *Chembiochem Eur J Chem Biol* 22: 3090–3098.
<https://doi.org/10.1002/cbic.202100396>
75. Li H, Pei W, Vergarajauregui S, Zerfas PM, Raben N, Burgess SM, Puertollano R (2017) Novel degenerative and developmental defects in a zebrafish model of mucopolipidosis type IV. *Hum Mol Genet* 26: 2701–2718.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddx158>
76. Platt FM (2018) Emptying the stores: lysosomal diseases and therapeutic strategies. *Nat Rev Drug Discov* 17: 133–150.
<https://doi.org/10.1038/nrd.2017.214>
77. Klein AD, Ferreira N-S, Ben-Dor S, Duan J, Hardy J, Cox TM, Merrill AH, Futerman AH (2016) Identification of Modifier Genes in a Mouse Model of Gaucher Disease. *Cell Rep* 16: 2546–2553.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.085>
78. Ogawa Y, Sano T, Irisa M, Kodama T, Saito T, Furusawa E, Kaizu K, Yanagi Y, Tsukimura T, Togawa T, Yamanaka S, Itoh K, Sakuraba H, Oishi K (2017) FcR γ -dependent immune activation initiates astrogliosis during the asymptomatic phase of Sandhoff disease model mice. *Sci Rep* 7: 40518.
<https://doi.org/10.1038/srep40518>

79. Udayar V, Chen Y, Sidransky E, Jagasia R (2022) Lysosomal dysfunction in neurodegeneration: emerging concepts and methods. *Trends Neurosci* 45: 184–199.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2021.12.004>
80. Li B, Wang F, Schall N, Muller S (2018) Rescue of autophagy and lysosome defects in salivary glands of MRL/lpr mice by a therapeutic phosphopeptide. *J Autoimmun* 90: 132–145.
<https://doi.org/10.1016/j.jaut.2018.02.005>
81. Mathai BJ, Meijer AH, Simonsen A (2017) Studying Autophagy in Zebrafish. *Cells* 6: 21.
<https://doi.org/10.3390/cells6030021>
82. Tseng W-C, Johnson Escauriza AJ, Tsai-Morris C-H, Feldman B, Dale RK, Wassif CA, Porter FD (2021) The role of Niemann-Pick type C2 in zebrafish embryonic development. *Dev Camb Engl* 148: dev194258.
<https://doi.org/10.1242/dev.194258>
83. Bonam SR, Wang F, Muller S (2019) Lysosomes as a therapeutic target. *Nat Rev Drug Discov* 18: 923–948.
<https://doi.org/10.1038/s41573-019-0036-1>

Experimental Models of CNS Deficits in Lysosomal Storage Diseases

A. S. Lebedev^{a, b, c}, M. M. Kotova^b, T. O. Kolesnikova^b,
D. S. Galstyan^{a, c, d}, and A. V. Kalueff^{a, b, c, d, e, f, *}

^aWorld-class Scientific Research Center “Center of Personalized Medicine”,
Almazov National Medical Research Center, Ministry of Healthcare of Russian Federation,
St. Petersburg, Russia

^bNeurobiology Department, Research Center for Genetics and Life Sciences,
Sirius University of Science and Technology, Sirius Federal Territory, Russia

^cInstitute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

^dGranov Russian Scientific Center for Radiology and Surgical Technologies,
Ministry of Healthcare of Russian Federation, St. Petersburg, Russia

^eUral Federal University, Yekaterinburg, Russia

^fScientific Research Institute of Neurosciences and Medicine, Novosibirsk, Russia

*e-mail avkalueff@gmail.com

Lysosomal storage diseases are characterized by enzyme deficiency in the lysosomal apparatus of the cell, triggering a pathological accumulation of undigested cellular material (proteins, lipids or carbohydrates) and tissue damage. Clinically and etiologically diverse, this group includes over 70 presently recognized hereditary conditions with no known effective therapy. Thus, the search for therapeutic strategies directed at these disorders represents an urgent unmet biomedical task, also necessitating the use of appropriate and valid experimental (animal) models. Here, we discuss the existing models of lysosomal storage diseases and the applicability of rodent and zebrafish as model organisms for probing these diseases.

Keywords: lysosomal storage diseases, lysosomes, enzymopathies, CNS disorders, animal models

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

РОЛЬ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ ГЕНОВ МОНОАМИНОВЫХ ТРАНСПОРТЕРОВ
ЧЕЛОВЕКА В СПОРТИВНОЙ ФИЗИОЛОГИИ

© 2023 г. А. В. Черепанова¹, Я. Р. Бравый¹, А. В. Карабельский¹, М. М. Котова¹,
Т. О. Колесникова¹, А. В. Калуев^{1, 2, 3, 4, 5, *}

¹Научно-технологический университет “Сириус”,
Федеральная территория Сириус, Россия

²Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия

³Институт экспериментальной медицины, Национальный медицинский научный центр
им. В.А. Алмазова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

⁴Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия

⁵Российский научный центр радиологии и хирургических технологий
им. акад. А.М. Гранова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: avkalueff@gmail.com

Поступила в редакцию 12.07.2023 г.

После доработки 10.10.2023 г.

Принята к публикации 10.10.2023 г.

Моноаминовые транспортеры (МАТ) отвечают за обратный захват дофамина, серотонина и норадреналина, модулируя концентрацию этих важнейших мозговых нейромедиаторов и регулируя поведение, настроение и когнитивные функции. Изучение роли различных генов в сложных физиологических процессах является перспективным направлением нейробиологии и физиологии спорта. В работе анализируются данные о взаимосвязи между генетическими особенностями генов МАТ и спортивной эффективностью. Отмечается связь аллели 10-го гена дофаминального транспортера (*DAT*), аллели L гена серотонинового транспортера (*SERT*) и однонуклеотидного полиморфизма rs1805065 (Thr99Ile) гена норадреналинового транспортера (*NET*) с большей эффективностью у спортсменов, обусловленной устойчивостью к стрессам, поддержанию мотивации и когнитивных поведенческих компетенций — качеств, необходимых для достижения успехов в соревнованиях. Таким образом, физиологическая эффективность в различных видах спорта может быть частично генетически детерминирована и контролироваться вариабельностью в генах МАТ.

Ключевые слова: мозговые моноамины, моноаминовые транспортеры, полиморфизмы, физиология спорта

DOI: 10.31857/S086981392311002X, **EDN:** HNOZWA

ВВЕДЕНИЕ: ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ГЕНОВ
МОНОАМИНОВЫХ ТРАНСПОРТЕРОВ

Биологическая роль моноаминовых транспортеров

Моноаминовые транспортеры (МАТ) играют важную роль в нейротрансмиссии, регулируя обратный захват серотонина, дофамина и норадреналина [1–3]. МАТ обладают достаточной селективностью к собственным специфическим нейромедиаторам, но также могут частично захватывать другие моноамины [3, 4]. Гены МАТ

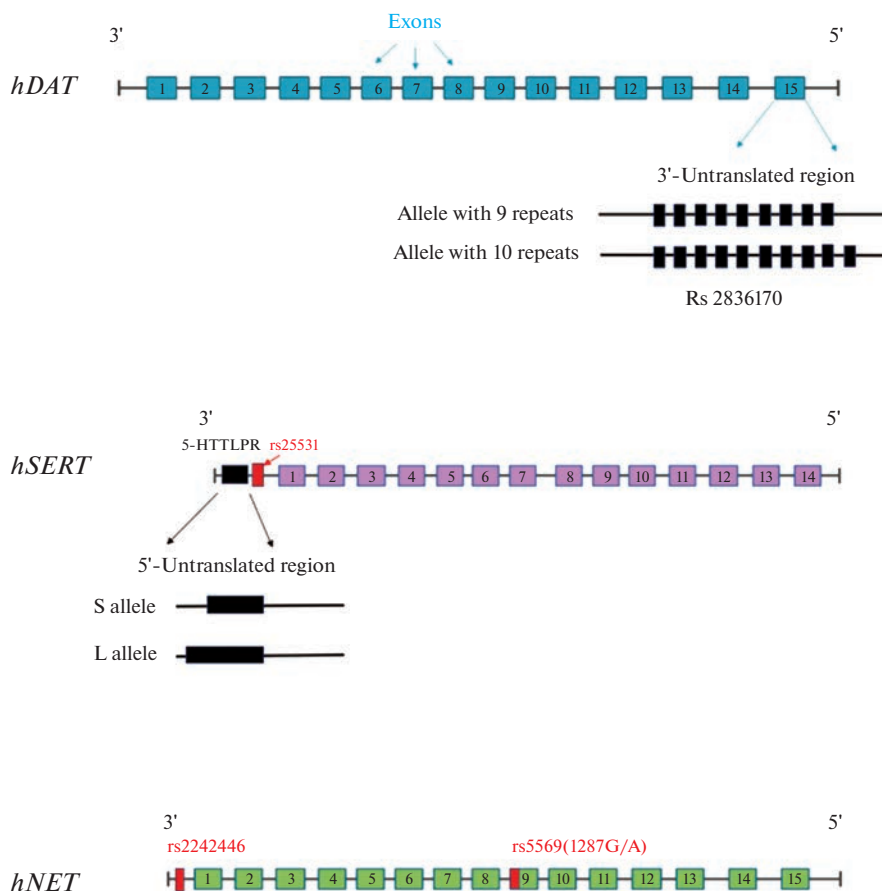


Рис. 1. Общая структура и расположение наиболее известных однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs) и переменного числа tandemных повторов в генах дофамина (*hDAT*), серотонинового (*hSERT*) и норадреналинового (*hNET*) транспортеров.

включают гены транспортеров серотонина (*SERT*, *SLC6A4*), дофамина (*DAT*, *SLC6A3*) и норадреналина (*NET*, *SLC6A2*) [4] (рис. 1). Белковая структура, общая для всех MAT, состоит из трансмембранного домена из 12 α -трансмембранных сегментов и N- и C-концов. MAT представляют собой мультидоменные структуры с отдельными функциональными компартментами, механизм работы которых реализуется последовательными конформационными изменениями белка [5]. Между III и IV сегментами располагается дополнительная петля, несущая сайты N-гликозилирования. Длины аминокислотных последовательностей SERT, NET и DAT составляют 630, 617 и 620 аминокислот соответственно [2]. Экспрессия MAT происходит в окончаниях соответствующих моноаминергических нейронов [3, 6]. Механизм обратного захвата молекул медиатора определяет продолжительность и интенсивность передаваемого сигнала, являясь таким образом основным механизмом регуляции синаптической передачи [3].

Биологическая роль MAT включает регуляцию уровня и поддержание гомеостаза моноаминов в нервной системе [3], что необходимо для реализации основных физиологических нейроэндокринных и поведенческих функций [4, 7, 8]. Измене-

ния в структуре, эффективности транспорта моноаминов или уровне экспрессии МАТ в нейронах, причинами которых могут быть мутации или наличие полиморфных аллелей, имеют значительное влияние на работу ЦНС, в том числе регулируя настроение, эмоции, поведение и когнитивные процессы [1]. В свою очередь, нарушения в работе системы моноаминовой нейротрансмиссии ответственны за проявление ряда распространенных заболеваний нервной системы, таких как депрессия, синдром дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ), синдром Туретта, а также различных когнитивных и поведенческих нарушений [8]. Поэтому МАТ являются ценными терапевтическими мишенями для действия нейроактивных лекарственных препаратов [4]. Например, селективные ингибиторы обратного захвата серотонина (СИОЗС) обладают антидепрессантными свойствами и являются наиболее применяемыми в мире лекарствами [9, 10].

Помимо клинических данных, связь патофизиологических состояний и дисфункциональных МАТ продемонстрирована на мышах с использованием генетического нокаута. В частности, нокаут *DAT*, *SERT* и *NET* приводит к увеличению внеклеточной концентрации соответствующих моноаминов и нарушениям гомеостаза, а также уменьшению количества внутриклеточного нейротрансмиттера [8]. Эффекты функциональных нарушений МАТ на ЦНС также показаны на животных моделях. Например, мыши с нокаутом по гену *DAT* демонстрируют гиперактивность, снижение когнитивной и сенсомоторной функции [11], а также нарушение реакций в тестах на новизну [12], напоминая клинические проявления гипердофаминергического состояния и СДВГ [3]. Нокаутирование гена *SERT* у мышей и крыс приводит к повышенной тревожности, снижению реакции на окружающую среду, исследовательского и социального поведения, а также к меньшей стрессоустойчивости [13–15]. В частности, мыши-нокауты по гену *SERT* меньше времени проводят в зонах открытого лабиринта, а также демонстрируют меньше интереса к исследованию ярко освещенных зон [13]. Другие фенотипические отклонения у этих мышей включают увеличение продолжительности фазы быстрого сна, склонность к ожирению в половозрелом возрасте, нарушения моторики желудочно-кишечного тракта. Гетерозиготы-нокауты по гену *SERT* проявляют зависимое от уровня экспрессии гена изменение гомеостаза серотонина [13], снижение двигательной активности, тревогу и нарушения социального поведения [15]. При этом повышенная экспрессия *SERT* демонстрирует снижение внеклеточного серотонина и тревожного поведения [3]. Нокаут *NET* у мышей сопровождается снижением двигательной активности в ответ на новизну среды, повышенной чувствительностью к психостимуляторам, а также изменением работы сердечно-сосудистой системы (приводя к гипертонии и тахикардии) [3]. Кроме того, мыши с дефицитом *NET* характеризуются повышенным болевым порогом, меньшими размерами и более низкой температурой тела [16].

Генетические особенности МАТ

Гены *DAT*, *SERT* и *NET* человека (*hDAT*, *hSERT*, *hNET*) являются однокопийными, расположены на 5-й [17], 17-й [18] и 16-й [19] хромосомах соответственно и имеют сходную интрон-экзонную структуру с высокой консервативностью нуклеотидных последовательностей (рис. 1). Большинство отдельных экзонов кодируют аминокислотные последовательности индивидуальных белковых доменов [20]. Предположительно, различные типы МАТ возникли в ходе дупликации генов в процессе естественной эволюции [21]. При этом наибольшее сходство наблюдается в последовательностях *DAT* и *NET*, однако для каждого из МАТ характерны различная субстратная селективность и чувствительность к разнообразным ингибиторам [22].

hDAT, локализованный на коротком плече 5-й хромосомы (5q15.3) [17, 23], представляет собой последовательность размером более 64 кб и включает в себя 15 экзонов и 14 интронных областей между ними [20]. Экзоны 1, 2 и 15 содержат некодирующие последовательности, а экзоны 2–15 представляют собой последовательность, по которой идет синтез белка-транспортера (рис. 1). 3'-некодирующий регион характеризуется варьирующим количеством tandemных повторов, консенсусная последовательность каждого из которых насчитывает 40 пар нуклеотидов [24]. Альтернативного сплайсинга для данного гена не описано [21].

hSERT располагается на 17-й хромосоме (17q11.2), имеет протяженность 37.8 кб и состоит из 14 экзонов [25]. Последовательность и экзон-интронная организация этого гена у человека и мыши очень похожи, что подтверждает высокий уровень консервативности данного гена и общее эволюционное происхождение [18]. Для гена *hSERT* было описано несколько сайтов альтернативного сплайсинга в 5'-некодирующей области первого экзона, варианты которого отличаются вставкой или делецией экзона 1B [9, 21, 26]. Продуктами альтернативного сплайсинга являются 2 вида мРНК: *SERT-1A* и *SERT-1AB* [9, 27]. Данные о функциональных отличиях между альтернативными вариантами неизвестны [27]. Кроме того, *SERT* может подвергаться другим посттрансляционным модификациям (фосфорилированию, гликозилированию, серотонилированию и образованию дисульфидных мостиков), которые могут влиять на эффективность транспортера [9, 28]. Посттрансляционные изменения обеспечивают правильную укладку аминокислотной последовательности, трансмембранный перенос и сборку на плазматической мембране [28].

hNET локализован на длинном плече 16-й хромосомы (16q12.2) [19], состоит из 15 экзонов и имеет длину порядка 48 кб. Для его последовательности известны 5 вариантов транскриптов, которые являются продуктами альтернативного сплайсинга [29]. Предполагается, что полиморфизмы, которые определяют тип сплайсинга, влияют на экспрессию *hNET*. Для этого гена описаны два потенциальных TATA-бокса выше начала транскрипции и наличие последовательности в промоторной области, обогащенной GC нуклеотидами [30].

Полиморфизмы, представленные однонуклеотидными заменами (SNPs), приводят к несинонимичным заменам аминокислот и могут оказывать качественное и количественное влияние на экспрессию гена. Например, замена одной аминокислоты на другую может отразиться на стабильности конформации белка-транспортера, или на изменении кинетики взаимодействия и характера связывания с нейромедиатором, в результате чего транспортер обладает повышенной, либо пониженной активностью [21]. Помимо однонуклеотидных замен, некоторые регионы гена подвержены к изменению числу tandemных повторов (VNTR). Такие замены обычно встречаются чаще, чем несинонимичные полиморфизмы, однако их влияние на функцию транспортера менее однозначно [21].

Интерес к изучению полиморфизмов MAT в первую очередь обусловлен их хорошо изученной связью с различными психическими и поведенческими расстройствами. Среди полиморфизмов *hDAT* наиболее исследован rs28363170 – 3'-концевой полиморфизм VNTR, число повторов которого может достигать 3–13 [31]. Наиболее распространенные аллельные варианты по данному полиморфизму содержат 9 или 10 tandemных повторов [32], каждый из которых в длину составляет 40 пар нуклеотидов. Считается, что полиморфизм по числу tandemных повторов последовательности является наиболее важным полиморфизмом в гене *DAT* и влияет на риск нейропсихических расстройств [24], контролируя экспрессию и время жизни транскрибируемой мРНК [31].

Вариабельность, представленная полиморфизмами гена *hSERT*, описана для повторов последовательности в 5'-нетранслируемой области, которая располагается несколько выше места начала транскрипции, занимая участок между –1396 и

–1440 нуклеотидами, и называется *SERT/5HTT*-сцепленной промоторной полиморфной областью (*5HTTLPR*) [25], а также наличием однонуклеотидной замены rs25531, расположенной рядом с *5HTTLPR* [33] (рис. 1). Полиморфизм *5HTTLPR* относится к *VNTR* [34] и представляет собой вариант наличия инсерции длиной 44 п.н. (“длинная” аллель *L*) или делеции по данному локусу (“короткая” аллель *S*), с сочетанием аллелей в гомозиготном (*L/L*, *S/S*) и гетерозиготном (*L/S*) генотипах. Базальная транскрипционная активность у промотора *L*-аллели примерно в 3 раза выше чем у *S*-аллели [34]. Показана связь *S*-аллели с проявлением депрессии, тревожности и склонности к суициду [35, 36]. Оценка связи полиморфизма *5HTTLPR* и результатов теста *FFM* (пятифакторный тест, оценивающий открытость к опыту, экстраверсию, невротизм, добросовестность и уступчивость) населения Швеции, не выявила значимых ассоциаций между наличием определенных аллелей гена *SERT* и отклонениями по оцениваемым характеристикам личности [37]. Полиморфизм rs25531 приводит к снижению уровня транскрипции *S*-аллели *5HTTLPR*. Могут быть и другие однонуклеотидные замены, которые влияют на транскрипционную активность *SERT*, но они являются редкими и требуют дополнительных исследований на больших выборках [33].

Полиморфизмы гена *NET* (рис. 1) являются причиной функциональных нарушений в работе норадренергической системы. Например, *NET* влияет на особенности проявления когнитивно-психологических характеристик (темперамента, импульсивности, восприятия и способности переносить боль), а также на вегетативные функции организма, в том числе на артериальное давление и частоту сердечных сокращений [38, 39]. Полиморфные варианты *NET* рассматривают как фактор развития не только разнообразных нейрологических расстройств, но также и заболеваний сердечно-сосудистой системы [39]. Для *NET* известен ряд однонуклеотидных полиморфизмов, которые, предположительно, могут влиять на эффективность транскрипции [40]. Одним из наиболее изучаемых полиморфизмов *NET* является однонуклеотидная замена 182С/Т (rs2242446), полиморфный вариант *C* которого ассоциирован с устойчивостью к клинической депрессии [41]. Данный полиморфизм локализован в промоторной области и может отвечать за регуляцию транскрипционной активности белка изменением аффинности факторов транскрипции к ДНК [42]. Другой однонуклеотидный полиморфизм этого гена (*1287G/A*), расположенный в 9-ом экзоне, также связан с эффективностью *NET* и, возможно, риском развития СДВГ [43]. Тем не менее противоречивость имеющихся данных может означать либо отсутствие значимой связи между исследуемыми полиморфизмами и фенотипическими проявлениями, либо более сложную взаимосвязь между различными адаптивными и дезадаптивными характеристиками ЦНС, а также отмечается возможность неравновесного сцепления между однонуклеотидными полиморфизмами гена *NET* и их влияния на фенотип [42].

СПОРТИВНАЯ ФИЗИОЛОГИЯ КАК ОБЛАСТЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЛИЯНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

Профессиональная спортивная деятельность — комплексное биосоциальное явление, эффективность в котором зависит от множества факторов различной природы [38]. Физиологические особенности индивида, такие как сила, выносливость, скорость [44, 45], накладываются на особенности работы его ЦНС и психофизиологических характеристик: быстроты принятия решения, устойчивости к психологическому стрессу, воли к победе, агрессивности, состязательности, общей лабильности, темперамента и многих других [38]. Важными параметрами являются также психологические черты личности — адаптация к среде, сосредоточенность и уверенность [46]. Особую роль в физиологии спорта играют также конкретные его разновидности. Например, для командных видов спорта важны быстрота приня-

тия решения и высокая социабельность членов команды [45], а для боевых видов спорта (борьба, бокс) — агрессивность и темпераментность спортсмена [45, 47, 48]. Каждая из данных психотипических характеристик, безусловно, по-разному контролируется мозговыми медиаторами, и соответственно роль последних в различных видах спорта также может быть неодинаковой.

В последнее время возрос интерес к пониманию того, насколько значителен вклад в успех спортивной карьеры, привнесенный наследственностью и врожденными особенностями [49]. Например, наследственность может обуславливать от 20 до 90% различий антропометрических и физиологических характеристик, имеющих отношение к спортивной деятельности [38], в то время как наследственность фенотипической изменчивости черт личности оценивается в 30–60% [50]. Также описана корреляция высокой результативности в спорте (например, у спортсменов-олимпийцев и чемпионов мира) и взаимодействия эндогенных генетических детерминант с экзогенными факторами окружающей среды, таких как диета, регулярные тренировки и состояние здоровья [51–53]. В то же время проводить прямые ассоциации конкретных аллельных вариантов с фенотипическими проявлениями в спорте сложно в силу его многофакторной природы, полигенного наследования сложных признаков [38, 53] и небольшого числа уже установленных генетических детерминант [54]. При этом наличие одиночных полиморфизмов может не иметь влияния на спортивную эффективность, но в сочетании с полиморфизмами других генов приводит к синергичным эффектам [53]. Поэтому крайне важно изучение не только отдельных полиморфизмов, но и полногеномного профиля спортсмена.

С другой стороны, в спорте различия в эффективности того или иного индивида могут быть опосредованы не только отличиями в программах индивидуальной спортивной подготовки и степенью натренированности, но и различиями в последовательностях генов, ответственных за синтез ключевых белков и ферментов, а также эпигенетических процессов [55]. Это подводит к необходимости поиска генетических вариаций, которые могут быть положительно ассоциированы с преимуществами в спортивной карьере: например, выносливостью [56], скоростью на короткие дистанции [57], силой [58], быстрым восстановлением после тренировок или травм [59, 60], психологической устойчивостью к постоянным стрессам, “самодисциплиной” и мотивацией продолжать занятия спортом [53].

На данный момент известно порядка 200 генов и их маркеров, которые связаны с физическими характеристиками спортсменов [44, 47, 52]. Однако генов, потенциально связанных с физиологией нервной системы, особенностями восприятия и психики в контексте спортивной физиологии, известно значительно меньше. При этом, как уже указывалось, когнитивные характеристики, такие как память, внимание, стрессоустойчивость, скорость реакции и время принятия решения — являются факторами, определяющими развитие спортивного таланта. Самыми распространенными подходами к исследованиям являются “случай—контроль”, направленный на выявление вариантов аллелей, которые больше распространены среди группы профессиональных спортсменов в сравнении с контрольной группой, не занимающейся спортом, а также ассоциативные исследования между генотипом и фенотипом [45]. Однако данные методы не могут выявить значимые полиморфизмы, расположенные вне кодирующей последовательности, к примеру, регуляторной [55]. Генотипирование спортсменов, в том числе их полногеномное секвенирование [55], становится не только необходимым инструментом молекулярной диагностики для выявления задатков и физиологической предрасположенности к спортивной карьере, но и важным этапом анализа, по результатам которого будут составляться персонализированные программы тренировок — необходимые меры индивидуального подхода к достижению максимальной эффективности спортсменов.

Анализ физических и физиологических характеристик спортсменов выявил, что результативность в одних спортивных дисциплинах может отрицательно коррелировать с успехами в других [53]. Так, если спортсмен показывает высокие результаты в видах спорта, где требуется выносливость, то в дисциплинах, рассчитанных на силовые показатели, он будет менее конкурентен. Это указывает на возможность изначальной предрасположенности к результатам профессионального высококвалифицированного спорта [61]. В то же время может быть и “базовый” уровень общефизических способностей, имеющих общие генетические детерминанты, позволяющий добиваться результатов сразу в нескольких спортивных дисциплинах причем как в близких, так и в достаточно различающихся [52]. При этом анализ когнитивных и личностных качеств спортсменов показал соответствие между наличием определенных психологических черт и предрасположенностью к тем или иным типам спорта. Так, для видов спорта, рассчитанных на выносливость, характерны интроверсия, пластичность мышления, стратегическое и тактическое мышление, низкие показатели эмоциональности и тревожности [45]. Для сравнения, спортсмены командных видов спорта должны обладать высоким эмоциональным интеллектом, коммуникабельностью и эмоциональным контролем [45]. При этом для спортсменов боевых искусств важны аналитическое и оперативное мышление, повышенное внимание и так называемая “склонность к самовыражению”, тогда как силовые виды спорта предполагают наличие напористости, самоконтроля, сдержанности, экстраверсии и склонности к рискам [45].

Выявление “успешных” для спортивной карьеры генов является сложной задачей, так как каждый ген по отдельности приносит лишь небольшой вклад в итоговый фенотип. В первую очередь поиск корреляций генотип—фенотип проводился среди генов, потенциально связанных с особенностями выносливости, мышечной производительности, качества состояния сухожилий, связок а также психологического состояния спортсменов. В частности, большинство (порядка 165 генов) [61] относятся к аутосомным генам количественных признаков (QTLs), среди которых отдельно выделяют генетические локусы, связанные с метаболизмом (mQTLs), изучение которых важно для понимания взаимосвязи метаболизма и спортивных характеристик, к примеру, выносливости и физической производительности [54]. Кроме них идентифицированы 5 генов на X хромосоме и 17 митохондриальных генов, непосредственно влияющих на фенотип более успешного физического развития и результативности [61]. Проводя классификацию обнаруженных генов, можно отметить следующие их функциональные кластеры: гемодинамика и особенности сердечно-сосудистой системы (частота сердечных сокращений, артериальное давление), метаболизм (в частности, глюкозы и инсулина), а также антропометрические характеристики, особенности строения мышечных волокон и эффективности скелетной мускулатуры [61].

Помимо характеристик, непосредственно определяемых генами и влияющих на параметры силы и выносливости, успех в соревнованиях связан с психологическим благополучием и особенностями эмоционального восприятия, в частности с устойчивостью к продолжительным стрессам, депрессии и тревожным расстройствам, способностью быстро запоминать и использовать уже приобретенный опыт, мотивацией придерживаться нормированных графиков и ограничений, накладываемых особенностями программы тренировок, настойчивостью и мотивированностью [38]. Однако взаимосвязи между генетикой, спортивной психологией, физиологией и нейробиологией остаются все еще недостаточно хорошо изученными. Изучение генетической составляющей, связанной с умственными способностями, мотивацией и способностью переносить боль, показало возможный разброс дисперсии на уровне 35–83% [61]. Несмотря на явный характер наследуемости, только недавно стало проводится изучение генов, имеющих связь с наличием мотивации

Таблица 1. Наиболее известные полиморфизмы генов моноаминовых транспортеров, среди которых ведется поиск ассоциаций со спортивными достижениями

Ген	Полиморфизмы	Локализация
<i>DAT</i> (SLC6A3)	40-нуклеотидный полиморфизм числа tandemных повторов	3'-конец последовательности
<i>SERT</i> (SLC6A4)	44-нуклеотидная инсерция/делеция	5НТТ-сцепленная полиморфная промоторная область (5НТТLPR) между –1396 и –1440 п.н.
<i>NET</i> (SLC6A2)	SNP Thr99Ile	+296 н.

и дисциплинированности или с поддержанием стабильного психологического фона. К таким генам-кандидатам, помимо *SERT*, *DAT* и *NET*, также относят гены *BDNF* (нейротрофического фактора мозга), *UCP2* (митохондриального разобщающего белка 2) [47, 51, 61], *COMT* (катехол-О-метилтрансферазы) [48, 62], *MAO-A* (моноаминоксидазы-А) [48], *ACE* (ангиотензин-превращающего фермента) [52, 63, 64], *NK1R* (рецептора нейрокина 1) [63], *CRF-BP* (белка, связывающего фактор высвобождения кортикотропина) [63], *DRD4* (дофаминавого рецептора D4) [47] и генов серотониновых 5-HT1 [63] и 5-HT2 [45] рецепторов. При этом данные гены могут находиться в сложных взаимодействиях друг с другом. Например, плейотропные отношения показаны для *SERT* и *BDNF* [65], *COMT* и *DAT* [66], а также *NET* и *MAO-A* [67]. Поэтому вариабельность одного из взаимодействующих генов может также влиять на вклад другого гена в физиологический фенотип.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ МОНОАМИНОВЫХ ТРАНСПОРТЕРОВ В СПОРТИВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

Наиболее известные полиморфизмы генов МАТ, среди которых ведется поиск ассоциаций со спортивными достижениями, суммированы в табл. 1 и рис. 1.

Дофаминовую систему традиционно ассоциируют с мозговой системой вознаграждения, стимуляцией когнитивных способностей через лимбические структуры мозга, локомоцией и общим контролем поведения, мотивации и эмоциональности [68]. Большинство исследований перспективных генов-кандидатов, регулирующих гомеостаз моноаминов и ассоциированных с поведением, которое способствует занятиям физическими нагрузками, и спортивной эффективностью, сосредоточено на изучении дофаминавой системы [66, 68]. Однако, хотя описаны ассоциации различных полиморфных вариантов *DAT* среди исследуемых групп спортсменов, в разных популяциях результаты оказались противоположными. Например, дефицит дофамина положительно коррелирует с предрасположенностью к экстремальным видам спорта [23]. На группе спортсменов, занимающихся смешанными боевыми искусствами, показана корреляция частоты встречаемости генотипа 9/9 *DAT* с повышенной “контролируемой агрессией” и экстремальным поведением, что, вероятно, помогает достигать больших успехов в экстремальных и травмоопасных видах спорта, например, в смешанных единоборствах [23]. Физиологически это может объясняться пониженным уровнем свободного дофамина, который возникает из-за повышенной активности *DAT* [23]. В исследовании профессиональных спортсменов также подтверждается высокая ассоциация генотипа 9/9 с профессиональным успехом [51], однако в популяции египетских спортсменов генотип 9/9 *DAT* встречался чаще в контрольной группе, а не у спортсменов (у которых самым распространенным генотипом был вариант 10/10) [68]. При этом опросник Freiburg Personality Inventory-Revised для оценки черт личности выявил, что для

генотипа 9/9 наиболее характерными чертами являются подверженность депрессии и эмоциональности, а для генотипа 10/10 – агрессивность, возбудимость и самоконтроль [68].

Многие гены ЦНС изменяют уровень экспрессии на протяжении жизни, в частности посредством эпигенетических механизмов, одним из которых является метилирование ДНК, преимущественно по цитозину CpG-островков. Промоторная последовательность *DAT* может метилироваться по 33 позициям, что влияет на регуляцию транскрипции *DAT* [69] и в итоге на эффективность дофаминергической системы. Исследования спортсменов по боевым искусствам (ММА, дзюдо, бокс, карате, кикбоксинг, борьба) показали корреляцию между гипо- или гиперметилением CpG-островков и результатами пятифакторного личностного опросника, оценивающего невротизм, экстраверсию, открытость опыту, сотрудничество и добросовестность. Например, имеются ассоциации между метилированием 3 CpG-островка и низкой открытостью, метилированием 13 CpG-островка и высоким невротизмом, а также гипометилением 22 CpG-островка и низкой открытостью [69].

Спортивные мероприятия, в особенности международного и мирового уровня, отличаются особым набором стрессорных факторов [70], таких как тренировки, получение травм, низкая результативность на соревнованиях, взаимодействие с тренерами и другими спортсменами [71]. При этом выявление тревожных расстройств у спортсменов может быть затруднено из-за субсиндромальных проявлений депрессии и тревоги [71] на фоне уникальности спортивной среды и стигматизации проблем с психическим здоровьем [72]. Предрасположенность и восприимчивость к тревоге – сложный признак, определяемый условиями среды, наличием генетических детерминантов, а также их сочетанием. Учитывая тесную связь серотонинергической системы с тревожностью, депрессией или компульсивным поведением, *SERT* является важным кандидатом для оценки предрасположенности стрессу на спортивных мероприятиях и успешности спортивной карьеры. В частности, структура L и S аллелей *SERT* оказывает влияние на восприимчивость к стрессовым событиям, к которым в полной мере относятся спортивные мероприятия. В этом случае S аллель, ассоциированная с большей подверженностью к тревожно-депрессивному поведению из-за недостаточной экспрессии *SERT*, у профессиональных спортсменов должна встречаться реже, а L аллель, особенно ее LL генотип, – ассоциироваться с успехами в спорте [70]. Независимыми исследованиями профессиональных спортсменов разных национальностей, занимающихся различными видами спорта, данная гипотеза подтверждается [70, 71, 73, 74]. Так, на выборке спортсменов-мужчин из Италии обнаружена связь наличия хотя бы одной короткой аллели S и повышенной тревожности в тесте для оценки психоэмоционального состояния и (на фоне сниженного эмоционального контроля) по психологическому опроснику спортивных результатов. При этом носители двух копий S-аллели *SERT* имеют высокий невротизм по сравнению с носителями генотипа L/S [71]. И хотя неизвестно точное влияние полиморфизма *5-HTTLPR* на метаболизм и физиологию [74], оно может быть связано с отличиями в функционировании миндалины у носителей L и S аллелей *SERT* [75].

NET играет важную роль в проявлениях особенностей физиологии нервной системы, таких как импульсивность, обучаемость, восприимчивость к болевым ощущениям [38], а также когнитивные и нейроэндокринные функции [76]. Подверженность тревожности и неспособность поддерживать высокий уровень концентрации негативно влияют на результативность спортсменов. Кроме ЦНС, норадреналин влияет на функциональность вегетативной нервной системы, в частности на регуляцию артериального давления [77]. Наличие аллельных вариантов, ассоциированных с определенными психологическими и физическими характеристиками, дает основания для поиска генетически детерминированной предрасположенно-

сти к успехам в спортивной деятельности [38]. Одним из известных и изучаемых однонуклеотидных полиморфизмов *NET* является rs1805065 (Thr99Ile) — точечная замена С на Т в 296-ом положении, которая встречается у $\approx 1\%$ у популяций Европы и Америки, и потенциально снижает транспорт норадреналина [78]. Исследования, посвященные поискам ассоциаций между полиморфными вариантами *NET* и спортивными успехами, на данный момент дают неоднозначную картину. Так, минорный аллельный вариант Т обнаружил отрицательную ассоциацию с достижениями в силовых видах спорта выборки атлетов из Бразилии, для которых важна выносливость и преобладал генотип Т/С [78]. При этом выборка спортсменов-атлетов из Польши не подтвердила обнаруженную ассоциацию, а минорный аллельный вариант Т коррелировал с успехами в спортивных единоборствах у высококвалифицированных спортсменов [38]. При этом как среди спортсменов, так и в контроле, не был обнаружен гомозиготный генотип Т/Т. Таким образом, необходимы дальнейшие исследования связи генетики и психофизиологии данного аллельного варианта *NET* и эффективности в спорте.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Несмотря на то, что спорт является важнейшей частью социальной деятельности человека, спортивная генетика и анализ ее физиологических аспектов как самостоятельное направление представляет собой достаточно новую область, в связи с чем возникает необходимость в поиске и изучении наследственных факторов, важных для успешной спортивной работы. В спортивной генетике накапливаются новые данные, указывающие на ассоциации определенных генов со спортивными достижениями, например, спортивной выносливостью [79]. Как правило, такие данные описывают ассоциации по отношению к различным физиологическим аспектам, но мало ориентируются на особенности ЦНС. На данный момент имеются весьма фрагментарные сведения о наличии ассоциаций определенных полиморфных вариантов среди генов *MAT*. Поскольку эффективность в спорте представляет собой результат сложного полигенного взаимодействия, изучение влияния полиморфизмов генов *MAT* обычно проводится на выборке определенного гена транспортера, не рассматривая возможное взаимодействие между полиморфными вариантами генов разных транспортеров одновременно. Подтверждение наличия или отсутствия синергических или плейотропных эффектов между генами *MAT*, а также генами других нейромедиаторных систем, может помочь в более точном генотипическом профилировании спортсменов.

Кроме того, возможные различия в распределении полиморфизмов среди спортсменов разного происхождения могут быть результатом неодинаковой представленности аллельных вариантов среди народностей, в результате чего исследования ассоциаций определенных полиморфизмов, проведенные на одной популяции, могут не воспроизводиться на популяции другого происхождения. В особенности это важно учитывать по отношению к высокогетерогенным популяциям, в историческом формировании которых происходили множественные миграции [80]. Изучение генотипического распределения, обусловленного принадлежностью к определенному этносу, может объяснить различия в данных, полученных на спортсменах разных национальностей. Возможно, существует корреляция между частотой встречаемости определенных аллелей и предрасположенностью к определенным видам спорта у спортсменов различного происхождения. Поскольку для разных видов спорта важны разные характеристики (силовые показатели, выносливость, внимание, время реакции и т.д.), эффект, обусловленный генными полиморфизмами, на них может быть различен. Неизвестно, могут ли носители “плохих” аллелей, не преуспевая в одних видах спорта, оказаться более подходящими

кандидатами для других типов спортивной деятельности, и есть ли прочные ассоциации между различными генными полиморфизмами, обеспечивающими успех в том или ином виде спорта. Необходимо также исследовать не только каждый отдельно взятый признак, но и их результирующий вклад в общий фенотип, в частности изучая, как могут наследоваться и проявляться совместно признаки, связанные с когнитивными характеристиками, памятью и стрессоустойчивостью относительно физических параметров спортсмена.

На сегодня недостаточно исследован вопрос распределения полиморфизмов, обусловленных половыми различиями и различиями в фенотипических проявлениях между мужчинами и женщинами, занимающимися теми или иными видами спорта. Недостаточно данных о влиянии исследуемых полиморфизмов на метаболизм организма, который подвергается постоянным систематическим тренировкам, и на совместимость с лекарственными препаратами, в частности антидепрессантами. Данный вопрос важен для разработки индивидуальных программ тренировок элитных спортсменов, а также для изучения эффектов полиморфизмов у людей, не занимающихся профессиональными видами спорта, но поддерживающими здоровый образ жизни.

Кроме того, для многих фенотипов ЦНС описан феномен взаимодействия генов со средой (Gene $\times$ Environment interaction, GE) [81]. Например, депрессия синергично усиливается при сочетании S аллели гена *SERT* и наличием критического количества (>3) сильных жизненных стрессоров [35]. Поэтому спортивная генетика должна учитывать не только конкретные генетические маркеры (например, полиморфизмы генов MAT, рассмотренные выше), но и в рамках изучения GE оценивать наличие сильных стрессоров у спортсменов (эквивалентами таковых, к примеру, могут быть поражения на важных чемпионатах).

Более того, важной современной концепцией в генетике сложных признаков является анализ корреляции генов со средой (Gene $\times$ Environment correlation, rGE) [82]. Ведущим фактором развития фенотипа то тому или иному пути при rGE признается поведение окружения, в свою очередь вызванное генетически детерминированными особенностями поведения самого испытуемого. Например, в случае генетически обусловленной высокой агрессии еще в раннем детстве формируется осторожно-субординантное поведение социального окружения спортсмена, которое, в свою очередь, непрямым образом (в силу rGE) способствует закреплению его высокой агрессивности, и в итоге способствуя высокой результативности в боевых видах спорта. При этом попадание такого же пробанда в слаженный коллектив или к требовательному жесткому тренеру вызвало бы подавление его волевых качеств, тем самым снижая будущую эффективность как спортсмена, даже несмотря на изначальное наличие всех генетических детерминант спортивного успеха. С этой точки зрения более сложной практически, но крайне интересной задачей было бы проведение генетических исследований в области нейробиологии и физиологии спорта не только на самом спортсмене, но также и в парах “тренер—спортсмен”. Наконец, важной задачей является разработка системы исследований на модельных животных объектах. На данный момент тест-системы на животных широко применяются в исследованиях ассоциаций полиморфизмов, в том числе генов MAT, и психических заболеваний, а также при изучении эффективности лекарственных препаратов. Однако для исследований спортивной физиологии такие подходы в настоящее время отсутствуют.

В целом, несмотря на то, что изучение спортивной физиологии с применением методов генетических исследований остается достаточно новой и мало исследованной областью, оно является перспективным направлением трансляционных работ по выявлению значимых для спортивной деятельности полиморфизмов, генетических маркеров, а также оценки их плейотропии, GE и rGE. Поскольку приведенные данные указывают на существование аллельных вариантов генов MAT,

способствующих успехам в тех или иных видах спорта, их идентификация является важной задачей для развития спорта. Исследования физиологии спорта и сложной, нелинейной роли наследственности и среды в ней поможет улучшить результативность в профессиональных соревнованиях мирового уровня.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Физиологические показатели, характерные для успешного спортсмена, являются результатом воздействия множества внешних средовых и внутренних (в первую очередь наследственных) факторов, основой которых является сложный полигенный характер взаимодействия. Однако вклад генетической составляющей на уровне МАТ в физиологию спорта на данный момент исследован недостаточно. Несмотря на то, что решающим фактором в эффективности спортсменов остается внешняя среда, изучение генетически детерминированных признаков для спортивной карьеры является чрезвычайно важным по ряду причин. Во-первых, это необходимо для проведения генотипической оценки подходящих спортсменов в профессиональную сферу элитного спорта, а также для определения возможной физиологической предрасположенности к определенным видам спорта у конкретного человека. Во-вторых, это поможет разработке более эффективных программ тренировок, в том числе с учетом индивидуальных физиологических различий между спортсменами. Поскольку моноаминергическая система ЦНС является ключевой в регуляции когнитивных функций и поведения, изучение ее роли и вклада генетической вариабильности в спортивную физиологию является логичным и перспективным направлением, требующим как трансляционных подходов в исследованиях на человеке, так и более широкого использования экспериментальных животных моделей.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана Научно-технологическим университетом “Сириус”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликтов интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы (Я.Р.Б., А.В.К.), проведение исследования (А.В.Ч., Т.О.К., А.В.К.), обсуждение результатов (А.В.Ч., Я.Р.Б., Т.О.К., М.М.К., А.В.К., А.В.К.), написание и редактирование манускрипта (А.В.Ч., М.М.К., Т.О.К., А.В.К.), одобрение финальной версии (А.В.Ч., Я.Р.Б., М.М.К., Т.О.К., А.В.К., А.В.К.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Torres GE, Gainetdinov RR, Caron MG* (2003) Plasma membrane monoamine transporters: Structure, regulation and function. *Nat Rev Neurosci* 4: 13–25.
<https://doi.org/10.1038/nrn1008>
2. *Kristensen AS, Andersen J, Jorgensen TN, Sorensen L, Eriksen J, Loland CJ, Stromgaard K, Gether U* (2011) SLC6 neurotransmitter transporters: Structure, function, and regulation. *Pharmacol Rev* 63: 585–640.
<https://doi.org/10.1124/pr.108.000869>
3. *Benarroch EE* (2013) Monoamine transporters: Structure, regulation, and clinical implications. *Neurology* 81: 761–768.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182a1ab4a>
4. *Aggarwal S, Mortensen OV* (2017) Overview of monoamine transporters. *Curr Protoc Pharmacol* 2017: 12.16.1–12.16.17.
<https://doi.org/10.1002/cpph.32>

5. *Manepalli S, Surratt CK, Madura JD, Nolan TL* (2012) Monoamine transporter structure, Function, Dynamics, and Drug discovery: A computational perspective. *AAPS J* 14: 820–831. <https://doi.org/10.1208/s12248-012-9391-0>
6. *Wimalasena K* (2011) Vesicular monoamine transporters: Structure-function, pharmacology, and medicinal chemistry. *Med Res Rev* 31: 483–519. <https://doi.org/10.1002/med.20187>
7. *Greengard P* (2001) The Neurobiology of Slow Synaptic Transmission. *Science* 294: 1024–1030. <https://doi.org/10.1126/science.294.5544.1024>
8. *Gainetdinov RR, Caron MG* (2003) Monoamine Transporters: From Genes To Behavior. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43: 261–284. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.43.050802.112309>
9. *Latorre E, Mesonero JE, Harries LW* (2019) Alternative splicing in serotonergic system: Implications in neuropsychiatric disorders. *J Psychopharmacol* 33: 1352–1363. <https://doi.org/10.1177/0269881119856546>
10. *Edinoff AN, Akuly HA, Hanna TA, Ochoa CO, Patti SJ, Ghaffar YA, Kaye AD, Viswanath O, Urits I, Boyer AG, Cornett EM, Kaye AM* (2021) Selective serotonin reuptake inhibitors and adverse effects: A narrative review. *Neurol Int* 13: 387–401. <https://doi.org/10.3390/neurolint13030038>
11. *Ralph RJ, Paulus MP, Fumagalli F, Caron MG, Geyer MA* (2001) Prepulse Inhibition Deficits and Perseverative Motor Patterns in Dopamine Transporter Knock-Out Mice: Differential Effects of D1 and D2 Receptor Antagonists. *J Neurosci* 21: 305–313. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-01-00305.2001>
12. *Zhuang X, Oosting RS, Jones SR, Gainetdinov RR, Miller GW, Caron MG, Hen R* (2000) Hyperactivity and impaired response habituation in hyperdopaminergic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 1982–1987. <https://doi.org/10.1073%2Fpnas.98.4.1982>
13. *Holmes A, Murphy DL, Crawley JN* (2003) Abnormal behavioral phenotypes of serotonin transporter knockout mice: Parallels with human anxiety and depression. *Biol Psychiatry* 54: 953–959. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2003.09.003>
14. *Olivier J, Cools A, Ellenbroek B, Cuppen E, Homberg J* (2010) The serotonin transporter knockout rat: A review. In: *Experimental Models in Serotonin Transporter Research*. Cambridge University Press. 170–213. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511729935.007>
15. *Shoji H, Ikeda K, Miyakawa T* (2023) Behavioral phenotype, intestinal microbiome, and brain neuronal activity of male serotonin transporter knockout mice. *Mol Brain* 16: 32. <https://doi.org/10.1186/s13041-023-01020-2>
16. *Carson RP, Robertson D* (2002) Genetic Manipulation of Noradrenergic Neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 301: 410–417. <https://doi.org/10.1124/jpet.301.2.410>
17. *Giros B, El S, Bertrand ML, Caron MG* (1991) Cloning and functional characterization of a cocaine-sensitive dopamine transporter. *FEBS Lett* 295: 149–154. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)81406-x](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)81406-x)
18. *Lesch K-P, Bailing U, Gross J, Strauss K, Wolozin BL, Murphy DL, Riederer P* (1994) m Journal of Neural Transmission Organization of the human serotonin transporter gene Rapid Communication. *J Neural Transm Gen Sect* 95: 157–162. <https://doi.org/10.1007/bf01276434>
19. *Kim CH, Waldman ID, Blakely RD, Kim KS* (2008) Functional gene variation in the human nor-epinephrine transporter: Association with attention deficit hyperactivity disorder. *Ann N Y Acad Sci* 1129: 256–260. <https://doi.org/10.1196/annals.1417.023>
20. *Kawarai T, Kawakami H, Yamamura Y, Nakamura S* (1997) Structure and organization of the gene encoding human dopamine transporter. *Gene* 195: 11–18. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(97\)00131-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(97)00131-5)
21. *Hahn MK, Blakely RD* (2002) Monoamine transporter gene structure and polymorphisms in relation to psychiatric and other complex disorders. *Pharmacogenom J* 2: 217–235. <https://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500106>
22. *Amara SG, Park J* (1995) Monoamine Transporters: Basic Biology with Clinical Implications. *The Neuroscientist* 1: 259–267. <https://doi.org/10.1177/107385849500100503>
23. *Cherepkova E V, Maksimov VN, Kushnarev AP, Shakhmatov II, Aftanas LI* (2019) The polymorphism of dopamine receptor D4 (DRD4) and dopamine transporter (DAT) genes in the men with antisocial behaviour and mixed martial arts fighters. *World J Biol Psychiatry* 20: 402–415. <https://doi.org/10.1080/15622975.2017.1366056>
24. *Bannon MJ, Michelhaugh SK, Wang J, Sacchetti P* (2001) The human dopamine transporter gene: gene organization, transcriptional regulation, and potential involvement in neuropsychi-

- atric disorders. *Eur Neuropsychopharmacol* 11: 449–455.
[https://doi.org/10.1016/s0924-977x\(01\)00122-5](https://doi.org/10.1016/s0924-977x(01)00122-5)
25. *Murphy DL, Lerner A, Rudnick G, Lesch KP* (2004) Serotonin transporter: Gene, genetic disorders, and pharmacogenetics. *Mol Interv* 4: 109–123.
<https://doi.org/10.1124/mi.4.2.8>
 26. *Bradley CC, Blakely RD* (1997) Alternative Splicing of the Human Serotonin Transporter Gene. *J Neurochem* 69: 1356–1367.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69041356.x>
 27. *Manzella C, Singhal M, Ackerman M, Alrefai WA, Saksena S, Dudeja PK, Gill RK* (2020) Serotonin transporter untranslated regions influence mRNA abundance and protein expression. *Gene Rep* 18: 100513.
<https://doi.org/10.1016/j.genrep.2019.100513>
 28. *Cooper A, Woulfe D, Kilic F* (2019) Post-translational modifications of serotonin transporter. *Pharmacol Res* 140: 7–13.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.10.018>
 29. *Belfer I, Phillips G, Taubman J, Hipp H, Lipsky RH, Enoch MA, Max MB, Goldman D* (2004) Haplotype architecture of the norepinephrine transporter gene SLC6A2 in four populations. *J Hum Genet* 49: 232–245.
<https://doi.org/10.1007/s10038-004-0140-9>
 30. *A Reith ME* (2002) Neurotransmitter Transporters Structure, Function, and Regulation. *Contemp Neurosci* 1–518.
 31. *Inoue-Murayama M, Adachi S, Mishima N, Mitani H, Takenaka O, Terao K, Hayasaka I, Ito ichi, Murayama Y* (2002) Variation of variable number of tandem repeat sequences in the 3' untranslated region of primate dopamine transporter genes that affects reporter gene expression. *Neurosci Lett* 334: 206–210.
[https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(02\)01125-4](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(02)01125-4)
 32. *Tunbridge EM, Narajos M, Harrison CH, Beresford C, Cipriani A, Harrison PJ* (2019) Which Dopamine Polymorphisms Are Functional? Systematic Review and Meta-analysis of COMT, DAT, DBH, DDC, DRD1–5, MAOA, MAOB, TH, VMAT1, and VMAT2. *Biol Psychiatry* 86: 608–620.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.05.014>
 33. *Odgerel Z, Talati A, Hamilton SP, Levinson DF, Weissman MM* (2013) Genotyping serotonin transporter polymorphisms 5-HTTLPR and rs25531 in European- and African-American subjects from the National Institute of Mental Health's Collaborative Center for Genomic Studies. *Transl Psychiatry* 3: 1–6.
<https://doi.org/10.1038/tp.2013.80>
 34. *Heils A, M6gner R, Lesch KP* (1997) The human serotonin transporter gene polymorphism-basic research and clinical implications. *J Neural Transm (Vienna)* 104: 1005–1014.
<https://doi.org/10.1007/bf01273314>
 35. *Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington HL, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton R* (2003) Influence of life stress on depression: Moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 301(5631): 386–389.
<https://doi.org/10.1126/science.1083968>
 36. *Cervilla JA, Rivera M, Molina E, Torres-González F, Bellón JA, Moreno B, De Dios Luna J, Lorente JA, De Diego-Otero Y, King M, Nazareth I, Gutiérrez B* (2006) The 5-HTTLPR s/s genotype at the serotonin transporter gene (SLC6A4) increases the risk for depression in a large cohort of primary care attendees: The PREDICT-gene study. *Am J Med Genet Part B: Neuro-psych Genet* 141: 912–917.
<https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30455>
 37. *Rahman MS, Guban P, Wang M, Melas PA, Forsell Y, Lavebratt C* (2017) The serotonin transporter promoter variant (5-HTTLPR) and childhood adversity are associated with the personality trait openness to experience. *Psychiatry Res* 257: 322–326.
<https://doi.org/10.1016/j.psychres.2017.07.071>
 38. *Fichna JP, Humińska-Lisowska K, Safranow K, Adamczyk JG, Cieszczyk P, Żekanowski C, Berdyński M* (2021) Rare variant in the slc6a2 encoding a norepinephrine transporter is associated with elite athletic performance in the polish population. *Genes (Basel)* 12: 1–7.
<https://doi.org/10.3390/genes12060919>
 39. *Marques FZ, Eikelis N, Bayles RG, Lambert EA, Straznicky NE, Hering D, Esler MD, Head GA, Barton DA, Schlaich MP, Lambert GW* (2017) A polymorphism in the norepinephrine transporter gene is associated with affective and cardiovascular disease through a microRNA mechanism. *Mol Psychiatry* 22: 134–141.
<https://doi.org/10.1038/mp.2016.40>
 40. *Zhang H, Smith GN, Liu X, A Holden JJ, Jja HA, Holden JJ* (2010) Association of MAOA, 5-HTT, and NET promoter polymorphisms with gene expression and protein activity in human placentas. *Physiol Genom* 42: 85–92.
<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00220.2009.-Monoamine>

41. Min W, Li T, Ma X, Li Z, Yu T, Gao D, Zhang B, Yun Y, Sun X (2009) Monoamine transporter gene polymorphisms affect susceptibility to depression and predict antidepressant response. *Psychopharmacology (Berl)* 205: 409–417.
<https://doi.org/10.1007/s00213-009-1550-3>
42. Zhao X, Huang Y, Ma H, Jin Q, Wang Y, Zhu G (2013) Association between major depressive disorder and the norepinephrine transporter polymorphisms T-182C and G1287A: A meta-analysis. *J Affect Disord* 150: 23–28.
<https://doi.org/10.1016/j.jad.2013.03.016>
43. Kim JW, Biederman J, McGrath CL, Doyle AE, Mick E, Fagerness J, Purcell S, Smoller JW, Sklar P, Faraone SV (2008) Further evidence of association between two NET single-nucleotide polymorphisms with ADHD. *Mol Psychiatry* 13: 624–630.
<https://doi.org/10.1038/sj.mp.4002090>
44. Pokrywka A, Kaliszewski P, Majorczyk E, Acny ZZ (2013) Genes in sport and doping. *Biol Sport* 30: 155–161.
<https://doi.org/10.5604/2F20831862.1059606>
45. Valeeva EV, Ahmetov II, Rees T (2019) Psychogenetics and sport. In: *Sports, Exercise, and Nutritional Genomics: Current Status and Future Directions*. Acad Press. 147–165.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816193-7.00007-5>
46. Blijlevens SJE, Elferink-Gemser MT, Wylleman P, Bool K, Visscher C (2018) Psychological characteristics and skills of top-level Dutch gymnasts in the initiation, development and mastery stages of the athletic career. *Psychol Sport and Exercise* 38: 202–210.
<https://doi.org/10.1016/j.psychsport.2018.07.001>
47. Youn BY, Ko SG, Kim JY (2021) Genetic basis of elite combat sports athletes: A systematic review. *Biol Sport* 38: 667–675.
<https://doi.org/10.5114/biolSport.2022.102864>
48. Bozaslan BS, Yükseloglu EH (2022) Evaluation of the Effects of Emotional and Violence-Related Genes in Athletes. *J Neurobehav Sci* 9: 68–71.
https://doi.org/10.4103/jnbs.jnbs_18_22
49. Tucker R, Collins M (2012) What makes champions? A review of the relative contribution of genes and training to sporting success. *Br J Sports Med* 46: 555–561.
<https://doi.org/10.1136/bjsports-2011-090548>
50. Zwir I, Arnedo J, Del-Val C, Pulkki-Råback L, Konte B, Yang SS, Romero-Zaliz R, Hintsanen M, Cloninger KM, Garcia D, Svrakic DM, Rozsa S, Martinez M, Lyytikäinen LP, Giegling I, Kähönen M, Hernandez-Cuervo H, Seppälä I, Raitoharju E, de Erausquin GA, Raitakari O, Rujescu D, Postolache TT, Sung J, Keltikangas-Järvinen L, Lehtimäki T, Cloninger CR (2020) Uncovering the complex genetics of human character. *Mol Psychiatry* 25: 2295–2312.
<https://doi.org/10.1038/s41380-018-0263-6>
51. Filonzi L, Franchini N, Vaghi M, Chiesa S, Marzano FN (2015) The potential role of myostatin and neurotransmission genes in elite sport performances. *J Biosci* 40: 531–537.
<https://doi.org/10.1007/s12038-015-9542-4>
52. Peplonska B, Adamczyk JG, Siewierski M, Safranow K, Maruszak A, Sozanski H, Gajewski AK, Zekanowski C (2017) Genetic variants associated with physical and mental characteristics of the elite athletes in the Polish population. *Scand J Med Sci Sports* 27: 788–800.
<https://doi.org/10.1111/sms.12687>
53. Naureen Z, Perrone M, Paolacci S, Maltese PE, Dhuli K, Kurti D, Dautaj A, Miotto R, Casadei A, Fioretti B, Beccari T, Romeo F, Bertelli M (2020) Genetic test for the personalization of sport training. *Acta Biomed* 91: 1–15.
<https://doi.org/10.23750/abm.v91i13-s.10593>
54. Al-Khelaifi F, Diboun I, Donati F, Botrè F, Abraham D, Hingorani A, Albagha O, Georgakopoulos C, Suhre K, Yousri NA, Elrayess MA (2019) Metabolic GWAS of elite athletes reveals novel genetically-influenced metabolites associated with athletic performance. *Sci Rep* 10: 10473.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-56496-7>
55. Boulygina EA, Borisov OV, Valeeva EV, Semenova EA, Kostryukova ES, Kulemin NA, Larin AK, Nabiullina RM, Mavliev FA, Akhatov AM, Andryushchenko ON, Andryushchenko LB, Zmijewski P, Generozov EV, Ahmetov II (2020) Whole genome sequencing of elite athletes. *Biol Sport* 37: 295–304.
<https://doi.org/10.5114/biolSport.2020.96272>
56. Pranckeviciene E, Gineviciene V, Jakaitiene A, Januska L, Utkus A (2021) Total genotype score modelling of polygenic endurance-power profiles in Lithuanian elite athletes. *Genes (Basel)* 12: 1067.
<https://doi.org/10.3390/genes12071067>
57. Pickering C, Suraci B, Semenova EA, Boulygina EA, Kostryukova ES, Kulemin NA, Borisov OV, Khabibova SA, Larin AK, Pavlenko AV, Lyubaeva EV, Popov DV, Lysenko EA, Vepkhvadze TF, Lednev EM, Leonska-Duniec A, Pajak B, Chycki J, Moska W, Lulinska-Kuklik E, Dornowski M, Maszczyk A, Bradley B, Kana-Ah A, Cieszczyk P, Generozov E V, Ahmetov II (2019) A Genome-Wide Association Study of Sprint Performance in Elite Youth Football Players. *J Strength Cond*

- Res 33: 2344–2351.
<https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000003259>
58. Moreland E, Borisov OV, Semenova EA, Larin AK, Andryushchenko ON, Andryushchenko LB, Generozov EV, Williams AG, Ahmetov II (2022) Polygenic Profile of Elite Strength Athletes. *J Strength and Condit Res* 36: 2509–2514.
<https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000003901>
 59. Goodlin GT, Roos AK, Roos TR, Hawkins C, Beache S, Baur S, Kim SK (2015) Applying personal genetic data to injury risk assessment in athletes. *PloS One* 10: e0122676.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122676>
 60. Baumert P, Lake MJ, Stewart CE, Drust B, Erskine RM (2016) Genetic variation and exercise-induced muscle damage: implications for athletic performance, injury and ageing. *Eur J Appl Physiol* 116: 1595–1625.
<https://doi.org/10.1007/s00421-016-3411-1>
 61. Lippi G, Longo UG, Maffulli N (2010) Genetics and sports. *Br Med Bull* 93: 27–47.
<https://doi.org/10.1093/bmb/ldp007>
 62. Leżnicka K, Niewczas M, Kurzawski M, Cięszczyk P, Safranow K, Ligocka M, Białecka M (2018) The association between COMT rs4680 and OPRM1 rs1799971 polymorphisms and temperamental traits in combat athletes. *Pers Individ Dif* 124: 105–110.
<https://doi.org/10.1016/j.paid.2017.12.008>
 63. Sanhueza JA, Zambrano T, Bahamondes-Avila C, Salazar LA (2016) Association of Anxiety-Related Polymorphisms with Sports Performance in Chilean Long Distance Triathletes: A Pilot Study. *J Sports Sci Med* 15: 554–561.
 64. Znazen H, Chtara M, Butovskaya M, Siala H, Messaoud T, Souissi N (2016) Association between angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and competitive anxiety in Tunisian athlete. *Sport Sci Health* 12: 233–238.
<https://doi.org/10.1007/s11332-016-0280-2>
 65. Bredemeier K, Beevers CG, McGeary JE (2014) Serotonin transporter and BDNF polymorphisms interact to predict trait worry. *Anxiety Stress Coping* 27: 712–721.
<https://doi.org/10.1080/10615806.2014.909928>
 66. Van Der Mee DJ, Fedko IO, Hottenga JJ, Ehli EA, Van Der Zee MD, Ligthart L, Van Beijsterveldt TCEM, Davies GE, Bartels M, Landers JG, De Geus EJC (2018) Dopaminergic Genetic Variants and Voluntary Externally Paced Exercise Behavior. *Med Sci Sports Exerc* 50: 700–708.
<https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000001479>
 67. Urwin RE, Bennetts BH, Wilcken B, Lampropoulos B, Beumont PJV, Russell JD, Tanner SL, Nunn KP (2003) Gene-gene interaction between the monoamine oxidase A gene and solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, noradrenalin) member 2 gene in anorexia nervosa (restrictive subtype). *Eur J Human Genet* 11: 945–950.
<https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201077>
 68. El-Seedy AS, Botros MH, Page G, Ladeveze V (2023) Allelic Variants on SLC6A3 Neurotransmitter Gene and Their Relationship with Personality Traits Scales in Egyptian Athletes. *Archiv Mol Biol and Genet* 2: 9–19.
<https://doi.org/10.33696/genetics.2.012>
 69. Grzywacz A, Chmielowiec K, Boroń A, Michałowska-Sawczyn M, Chmielowiec J, Trybek G, Mroczek B, Leżnicka K, Cieszczyk P, Masiak J (2021) Influence of dat1 promotor methylation on sports performance. *Genes (Basel)* 12: 1425.
<https://doi.org/10.3390/genes12091425>
 70. Corak A, Kapici S, Sercan C, Akkoç O, Ulucan K (2017) A pilot study for determination of anxiety related SLC6A4 promoter “S” and “L” alleles in healthy Turkish athletes. *Cell Mol Biol* 63: 29–31.
<https://doi.org/10.14715/cmb/2017.63.5.6>
 71. Petito A, Altamura M, Iuso S, Padalino FA, Sessa F, D’Andrea G, Margaglione M, Bellomo A (2016) The relationship between personality traits, the 5HTT polymorphisms, and the occurrence of anxiety and depressive symptoms in elite athletes. *PLoS One* 11: e0156601.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156601>
 72. Lebrun F, MacNamara A, Rodgers S, Collins D (2018) Learning from Elite Athletes’ experience of depression. *Front Psychol* 9: 2062.
<https://doi.org/10.3389/fpsyg.2018.02062>
 73. Sysoeva OV, Maluchenko NV, Timofeeva MA, Portnova GV, Kulikova MA, Tonevitsky AG, Ivanitsky AM (2009) Aggression and 5HTT polymorphism in females: Study of synchronized swimming and control groups. *Int J Psychophysiol* 72: 173–178.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2008.12.005>
 74. Ulucan K, Yalcin S, Akbas B, Uyumaz F, Konuk M (2014) Analysis of Solute Carrier Family 6 Member 4 Gene promoter polymorphism in young Turkish basketball players. *J Neurobehav Sci* 1: 37–40.
<https://doi.org/10.5455/jnbs.1403730925>
 75. Pezawas L, Meyer-Lindenberg A, Drabant EM, Verchinski BA, Munoz KE, Kolachana BS, Egan MF, Mattay VS, Hariri AR, Weinberger DR (2005) 5-HTTLPR polymorphism impacts human cingulate-

- amygdala interactions: A genetic susceptibility mechanism for depression. *Nat Neurosci* 8: 828–834.
<https://doi.org/10.1038/nn1463>
76. Bönisch H, Brüss M (2006) The Norepinephrine Transporter in Physiology and Disease. *Handb Exp Pharmacol* 175: 485–524.
https://doi.org/10.1007/3-540-29784-7_20
 77. Kohli U, Hahn MK, English BA, Sofowora GG, Muszkat M, Li C, Blakely RD, Stein CM, Kurnik D (2011) Genetic variation in the presynaptic norepinephrine transporter is associated with blood pressure responses to exercise in healthy humans. *Pharmacogenet Genomics* 21: 171–178.
<https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e328344f63e>
 78. Guilherme JPLF, Bigliassi M, Lancha Junior AH (2019) Association study of SLC6A2 gene Thr99Ile variant (rs1805065) with athletic status in the Brazilian population. *Gene* 707: 53–57.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.05.013>
 79. Varillas-Delgado D, Del Coso J, Gutiérrez-Hellín J, Aguilar-Navarro M, Muñoz A, Maestro A, Morencos E (2022) Genetics and sports performance: the present and future in the identification of talent for sports based on DNA testing. *Eur J Appl Physiol* 122: 1811–1830.
<https://doi.org/10.1007/s00421-022-04945-z>
 80. Guilherme JPLF, Bertuzzi R, Lima-Silva AE, Pereira A da C, Lancha Junior AH (2018) Analysis of sports-relevant polymorphisms in a large Brazilian cohort of top-level athletes. *Ann Hum Genet* 82: 254–264.
<https://doi.org/10.1111/ahg.12248>
 81. Dick DM (2011) Gene-environment interaction in psychological traits and disorders. *Annu Rev Clin Psychol* 7: 383–409.
<https://doi.org/10.1146/annurev-clinpsy-032210-104518>
 82. Knafo A, Jaffee SR (2013) Gene-environment correlation in developmental psychopathology. *Dev Psychopathol* 25: 1–6.
<https://doi.org/10.1017/s0954579412000855>

The Role of Variability in Monoamine Transporter Genes in Sports Physiology

A. V. Cherepanova^a, Y. R. Bravy^a, A. V. Karabelsky^a, M. M. Kotova^a,
 T. O. Kolesnikova^a, and A.V. Kalueff^{a, b, c, d, e, *}

^a*Sirius University of Science and Technology, Sirius, Russia*

^b*Institute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

^c*Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Centre,
 Ministry of Healthcare of Russian Federation, St. Petersburg, Russia*

^d*Ural Federal University, Yekaterinburg, Russia*

^e*Granov Russian Scientific Research of Center for Radiology and Surgical Technologies,
 Ministry of Healthcare of Russian Federation, St. Petersburg, Russia*

*e-mail: avkalueff@gmail.com

Monoamine transporters (MATs) are responsible for the reuptake of dopamine, serotonin, and noradrenaline, modulating the concentration of these essential brain neurotransmitters and thus regulating behavior, mood, and cognitive functions. The study of the role of various genes in complex physiological processes is a promising area of neurobiology and sport physiology. Here, we summarize mounting evidence linking specific genetic variants of MAT genes to various aspects of sport performance. For example, the allele 10 of the dopamine transporter gene (*DAT*), the allele L of the serotonin transporter gene (*SERT*) and single-nucleotide polymorphism rs1805065 (Thr99Ile) of the noradrenaline transporter gene (*NET*) appear to correlate with higher performance in athletes due to resistance to stress, maintenance of motivation and cognitive behavioral competencies – qualities necessary for achieving success in sport. Thus, physiological performance in various sports may be partially genetically determined and controlled by the MAT genes.

Keywords: brain monoamines, monoamine transporter genes, genetic variance, sport physiology

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ СИНАПТОПАТИЙ
НА ОСНОВЕ РЫБ ЗЕБРАДАНИО

© 2023 г. А. С. Лебедев^{1, 2, 3}, М. М. Котова², Н. П. Ильин^{1, 3}, Т. О. Колесникова²,
Д. С. Галстян^{1, 3, 4}, Т. В. Вьюнова⁷, Е. В. Петерсен⁵, А. В. Калусев^{1, 2, 3, 4, 6, *}

¹Научный центр мирового уровня “Центр персонализированной медицины”,
Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова МЗ РФ,
Санкт-Петербург, Россия

²Направление “Нейробиология”, Научный центр генетики и наук о жизни,
Научно-технологический университет “Сириус”, Федеральная территория Сириус, Россия

³Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия

⁴Российский научный центр радиологии и хирургических технологий
им. акад. А.М. Гранова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

⁵Московский физико-технический институт, Москва, Россия

⁶Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия

⁷Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра
“Курчатовский институт”, Москва, Россия

*E-mail: avkalueff@gmail.com

Поступила в редакцию 23.08.2023 г.

После доработки 04.10.2023 г.

Принята к публикации 04.10.2023 г.

Синаптопатии — разнородная группа неврологических заболеваний человека, вызванных нарушением структуры и функций синапсов. К распространенным синаптопатиям относятся эпилепсия, расстройства аутистического спектра, ряд аутоиммунных заболеваний и слуховые синаптопатии. Патогенез синаптопатий обусловлен различными факторами, включая генетические и средовые. Тем не менее недостаток знаний об их системных механизмах и неэффективность терапии подчеркивают актуальность дальнейших клинических и экспериментальных исследований синаптопатий. В работе обсуждаются существующие экспериментальные модели синаптопатий на животных, с акцентом на использование альтернативных модельных объектов — рыб зебраданио (*Danio rerio*, zebrafish), а также рассматриваются возможные новые направления для исследований. В целом, зебраданио служит перспективным организмом для моделирования широкого спектра синаптопатий, дополняя и расширяя существующие модели на основе грызунов.

Ключевые слова: синаптическая передача, синаптопатии, патогенез, грызуны, рыбы, экспериментальные модели

DOI: 10.31857/S0869813923110092, **EDN:** AEMSZN

ВВЕДЕНИЕ

Синаптопатии представляют собой обширную и клинически разнородную группу неврологических заболеваний, общим механизмом патогенеза которых является нарушение синаптической передачи [1]. Синаптопатии могут быть вызваны гене-

тическими мутациями, аутоиммунными процессами, воспалением, воздействием токсинов и рядом других факторов [2–4]. Клинически распространенными видами синаптопатий являются расстройства аутистического спектра [5–7], эпилепсия [8], шизофрения [9], прионные болезни [10], а также аутоиммунные [2] и слуховые (кохлеарные) синаптопатии [11]. Эти заболевания проявляются в виде дисфункций нервной системы, в том числе — задержки развития, проблем с координацией движений, мышечной слабости, судорог, а также нарушений речи и памяти [1, 5]. Главным триггером синаптопатий является нарушение высвобождения, переноса или связывания нейромедиаторов, в первую очередь ацетилхолина, гамма-аминомаслянной кислоты (ГАМК), глутамата и дофамина [1, 6, 7].

Например, к токсическим синаптопатиям относится отравление ботулотоксином и тетаноспазмом, которые нарушают холин- и ГАМК-ергическую передачу, соответственно, и приводят к параличу мышц и судорогам [12–15]. Часто встречающиеся слуховые синаптопатии представляют собой расстройства слуха, вызванные нарушенной синаптической передачей между волосковыми клетками и клетками слухового нерва — например, при старении и действии громких звуков или ототоксичных препаратов [16]. К генетическим синаптопатиям относят широкий спектр заболеваний, вызванных мутациями конкретных генов или утратой частей хромосом. Характерным их примером служит синдром кошачьего крика (синдром Лежена) — редкое генетическое заболевание, вызванное потерей части 5-й хромосомы, что вызывает неврологические нарушения, в том числе задержку развития, нарушения коммуникативных навыков и координации движений [17]. Также распространен синдром ломкой X-хромосомы (синдром Мартина—Белл) — генетическое заболевание, обусловленное мутацией в гене белка FMR1 (fragile X messenger ribonucleoprotein 1), вызывающей синаптические дефекты, умственную отсталость, дискоординацию движений, а также нарушение речи, социального и иных форм поведения [5]. Синдром Ретта — генетическая синаптопатия, вызванная мутацией гена метил-СрG-связывающего белка (*MECP2*), в результате чего на фоне синаптических нарушений происходят, замедленное мышление, потеря рукописных навыков, а также нарушения речи и социального поведения [18].

Аутоиммунные синаптопатии характеризуются атакой иммунной системы на собственные синаптические структуры [2], и включают в себя миастению гравис (МГ), синдром Ламберта—Итона, дерматомиозит и приобретенную нейромиотоию. МГ — хроническое аутоиммунное заболевание, приводящее к слабости и утомляемости мышц [19]. При ней иммунная система организма атакует ацетилхолиновые рецепторы мышц, приводя к их разрушению или ингибированию [2, 19], что вызывает нарушения речи, мышечные спазмы [20] и (в тяжелых случаях) миастенический криз, требующий немедленной медицинской помощи [21]. При синдроме Ламберта—Итона аутоиммунная атака направлена на потенциал-зависимые кальциевые каналы нервных окончаний, приводя к нарушению передачи нервно-мышечных сигналов и слабости мышц [2, 22, 23]. Его клинические симптомы включают атаксию, нарушение координации движений, измененную чувствительность и сухость во рту и глазах [22]. Дерматомиозит характеризуется воспалением мышц и кожи [24]. При этом атака иммунной системы может быть направлена на синапсы в мышцах, нарушая нервно-мышечную передачу [25] и вызывая слабость и утомляемость мышц [24]. Приобретенная нейромиотия характеризуется повышенной возбудимостью нервно-мышечных соединений [2], вызывая судороги, дрожание, нервное возбуждение и боли в мышцах. Аутоиммунная ее форма связана с наработкой антител к собственным калиевым каналам в нервно-мышечных соединениях, что повышает возбудимость этих соединений и чрезмерно активизирует мышцы [26].

ТРАДИЦИОННЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
МОДЕЛИ СИНАПТОПАТИЙ НА ГРЫЗУНАХ

Животные экспериментальные модели широко используются для изучения механизмов патогенеза синаптопатий. Например, на крысах линии Wistar разработана модель нейропатической боли, вызванной поражением тройничного нерва, которая позволяет изучать патологические изменения в синапсах, связанные с хронической болью, и тестировать новые лекарства-анальгетики [27, 28]. При моделировании генетических синаптопатий широко используются трансгенные грызуны с мутациями, нарушающими синаптическую функцию. Например, мутации гена *PSD-95*, кодирующего белок постсинаптического уплотнения (PostSynaptic Density) [29], у мышей проявляются в виде нарушений поведения — гиперактивности в открытом поле, нарушении памяти в водном лабиринте Морриса, а также снижении социального взаимодействия в трехкамерном тесте на социальное поведение [30]. Нокаут гена *SHANK3*, кодирующего белки SH3 и множественных доменов анкириновых повторов (ANK — компоненты постсинаптической плотности, обеспечивающие связь между рецепторами нейротрансмиттеров, ионными каналами и другими мембранными белками с актиновым цитоскелетом и сигнальными путями G-белков), у мышей вызывает повышенный груминг и дефицит социальных взаимодействий [31]. Еще одна модель генетических синаптопатий использует мутацию мышинового гена *rTg4510*, кодирующего форму тау-белка (функцией которого является связывание с микротрубочками, способствуя инициации и стабилизации микротрубочек (это важно для аксонального транспорта и синаптической передачи), что приводит к расстройству пространственной памяти, нейродегенерации и нарушению синаптической пластичности [32].

Другой подход к экспериментальному моделированию синаптопатий основан на аксональных повреждениях у грызунов путем нанесения черепно-мозговых травм, что приводит к патологическим кальций-индуцированным модификациям цитоскелета аксона, разрушению синапсов и в итоге гибели нейронов [33]. Использование данной модели позволяет исследовать механизмы регенерации синапсов и разрабатывать новые методы стимуляции роста нервных волокон и восстановления синаптической функции [33]. Для вызова слуховых синаптопатий грызуны подвергаются различным экспериментальным воздействиям [16, 34], например, избыточно громким звуком [11]. Эти модели широко применяются для тестирования эффектов различных фармакологических препаратов (например, дексаметазона, преднизолона, миноциклина и других) [35], а также для изучения терапевтических подходов, например, устранения или смягчения слуховой синаптопатии при помощи фотобиомодуляции [34]. На данных моделях также изучаются возрастные изменения слуха, вызванные ухудшением работы синаптического аппарата волосковых клеток [36].

На грызунах исследуется влияние различных факторов эмбрионального развития, способных привести к синаптопатиям [37, 38]. Например, асфиксия беременных крыс вызывает кислородное голодание у плода [39], приводя к нарушению функций синаптического аппарата нейронов мозга посредством нарушения фолдинга и патологической агрегации синаптических белков в нейронах полосатого тела [37]. При этом терапевтическая гипотермия, а также препараты никотинамид, эстрадиол и пальмитоилэтаноламид обладают нейропротекторными свойствами, снижая вред синаптическому аппарату нервных клеток, наносимого перинатальной гипоксией [38]. Существуют хорошо валидированные модели на грызунах для многих других распространенных синаптопатий [9, 10], в том числе эпилепсии [8] и расстройств аутистического спектра [6]. Они позволяют исследовать патологические изменения в синапсах, разрабатывать новые лекарственные препараты и те-

рапевтические подходы, а также выявлять механизмы регенерации синапсов и восстановления их функции. В то же время понимание общих, эволюционно консервативных патологий мозга невозможно без использования эволюционно-физиологического подхода с применением межтаксонного анализа и расширения спектра задействованных модельных организмов.

МОДЕЛИ СИНАПТОПАТИЙ НА ЗЕБРАДАНИО

Рыбы зебраданио (*Danio rerio*, zebrafish) широко используются как модельный организм в нейробиологических исследованиях [40, 41], и имеют множество преимуществ для исследования неврологических заболеваний, таких как синаптопатии. Например, высокая репродуктивность зебраданио [42] существенно облегчает, удешевляет и повышает репрезентативность результатов тестирования. Прозрачность эмбриона и личинок зебраданио дает возможность наблюдать и изучать процессы, происходящие внутри них с высоким разрешением, что особенно важно для изучения развития нервной системы и формирования синапсов, которые происходят на ранних стадиях эмбрионального развития. С помощью различных методик, в том числе микроскопии в реальном времени и использования генетически модифицированных зебраданио, возможно визуализировать и анализировать формирование и функциональность синапсов на молекулярном уровне и с высоким разрешением [43]. Наконец, зебраданио характеризуются достаточно хорошо изученной генетикой, поэтому на этих объектах применяется широкий набор генетических методов [44]. В частности, имеется множество генетически измененных линий зебраданио, которые позволяют исследовать различные аспекты синаптопатий. Например, генетически модифицированные зебраданио для моделирования синаптопатий могут быть созданы с помощью системы CRISPR/Cas9, для введения или изменения конкретных генетических мутаций, связанных с синаптическими расстройствами (см. далее). Такие модели обеспечивают возможность более точного изучения патологических изменений в нейронах, а также тестирования новых подходов к лечению с учетом генетической основы расстройств ЦНС.

При моделировании синаптопатий на зебраданио особое внимание стоит обратить на их способность к регенерации нервных клеток и синапсов. Например, зебраданио могут быть использованы для изучения процессов регенерации и восстановления синапсов после повреждений или заболеваний [45]. У рыб имеется большое число нейрогенных ниш и происходит активный нейрогенез в зрелом возрасте [46], что дает возможность проведения широкого спектра трансляционных исследований в сфере нейрогенеза. Так, на зебраданио изучена инициация нейрогенеза на модели вызванной гиперлокомоции, при которой активация холинергической передачи от спинальных локомоторных нейронов стимулирует спинальные нервные стволовые клетки, приводя к нейрогенезу у взрослых рыб [47]. Любопытно, что у человека наблюдаются подобные процессы активации нейрогенеза в ответ на физические упражнения [48], подтверждая важность зебраданио для создания трансляционных моделей как синаптопатий, так и нейрореабилитации. Также, в сравнении с грызунами и человеком, зебраданио обладают более высокой способностью к регенерации нервной и других тканей, что позволяет восполнять потерянные или поврежденные нервные клетки и синапсы [49]. Например, при перерезке спинного мозга у рыб (в отличие от грызунов и человека) за несколько недель восстанавливаются связи между нейронами, что позволяет нормализовать неврологические функции, утраченные после повреждения [50]. Таким образом, зебраданио является ценной и уникальной моделью для изучения процессов регенерации и восстановления нервных клеток и синапсов.

Генетические модели на основе зебраданио также широко используются для изучения синаптопатий [51]. Для этого обычно используют генетически модифицированные зебраданио, у которых методом CRISPR/Cas9 введены или изменены гены, отвечающие за функционирование синапсов [52]. К примеру, созданы модели на зебраданио посредством внесения мутаций в гены, кодирующие белки глицинергической синаптической передачи [53]. Первая модель имеет мутацию, приводящую к потере функции β -субъединицы рецептора глицина (GlyR), что проявляется в нарушении координации движений у зебраданио из-за дефекта в формировании кластеров глициновых рецепторов в синапсах, в результате чего нарушается глицинергическая синаптическая передача в мотонейронах спинного мозга [53]. Вторая модель имеет мутацию в гене глицинового транспортера 1 (GlyT1), необходимого для нормальной синаптической передачи, в результате чего мутанты реагируют на тактильные раздражители не обычным плаванием, а судорогами. Электрофизиологический анализ показывает, что тактильные стимулы вызывают аритмичную активацию мышц у них вместо ритмического возбуждения у особей дикого типа [53]. Подобные модели позволяют изучать механизмы, лежащие в основе синаптопатий, и тестировать потенциальные фармакологические и генетические методы лечения *in vivo*.

Зебраданио также удобны для визуализации и изучения подвижности синапсов в реальном времени, в том числе с использованием двухфотонной микроскопии, визуализирующей структуру и функцию синапсов *in vivo* или в интактных тканях зебраданио с высоким разрешением [54]. С помощью флуоресцентных меток (например, белков Dronpa и Kaede), в таких моделях становится возможным отслеживать движение и взаимодействие синаптических структур, а также изучать синаптическую пластичность и изменения, связанные с различными манипуляциями [54]. В частности, с использованием Dronpa показана зависимость между вкладом различных синапсов в передачу сигналов и их расстоянием от сомы нейрона. Было выяснено, что самый значительный вклад в передачу электрохимического сигнала по пути ERK (extracellular signal-regulated kinase)/MAPK (mitogen-activated protein kinase) вносят синапсы вблизи сомы, вызывая экспрессию генов в ядре, тогда как синапсы, активированные в дистальных участках нейрона, вносят вклад только в локальную передачу сигналов [55]. При помощи флуоресцентного белка Kaede изучены особенности организации синаптического аппарата клеток мозжечка и выявлены прямые и/или не прямые связи гранулярных клеток мозжечка с клетками Пуркинье и эфферентными нейронами мозжечка зебраданио [56]. Это позволяет понять функции синаптического аппарата клеток мозжечка, связей разных частей мозжечка друг с другом, а также всего мозжечка с другими областями мозга, что расширяет наше понимание природы двигательных нарушений, в том числе на фоне синаптопатий.

Для моделирования слуховых синаптопатий также активно используются модели на зебраданио [57, 58]. Например, на рыбах изучены эффекты кальция на волосковые клетки слуховой системы зебраданио, модулирующие их нейротрансмиссию, и показано, что стимуляция волосковых клеток приводит к массивному притоку кальция в афферентные окончания слухового нерва, это может повредить их вследствие эксайтотоксического воздействия [57]. Более того, воздействие чрезмерно громкого звука оказывает эксайтотоксический эффект на важнейший тип синапсов волосковых клеток рыб — ленточные синапсы, приводя к нарушению их функционирования и, как следствие, потере слуха [59]. Моделирование слуховых синаптопатий на зебраданио также возможно проводить с использованием их уникального дополнительного слухового органа — боковой линии [60]. Боковая линия — сложная сенсорная система, присутствующая у рыб и амфибий, реагирующая на изменения движения воды и участвующая во множестве поведенческих актов, от обнаружения добычи и избегания хищников до плавания в стае и полового поведения.

ния. В модели нанесения рыбам акустической травмы, используя подводную кавитацию для стимуляции волосковых клеток боковой линии, показано, что избыточная акустическая стимуляция повреждает волосковые клетки через 48–72 ч после нанесения травмы [60]. При этом волосковые клетки, уцелевшие после акустического воздействия, демонстрируют признаки синаптопатии (акустическая стимуляция статистически значимо уменьшает количество синапсов волосковых клеток), напоминая слуховые синаптопатии на млекопитающих [11, 60].

Зебраданию также широко используются для моделирования токсических воздействий на нервную систему, нарушающих работу синаптического аппарата нервных клеток. В частности, на зебрадании смоделирован патологический фенотип острого отравления акриламидом, в том числе патофизиологические признаки, схожие с проявлениями отравления им у человека (нарушение моторной функции, патологические эффекты на пресинаптических нервных окончаниях нервно-мышечных соединений) [61]. Также изменялись транскрипционные маркеры белков, участвующих в синаптической передаче сигналов — например, протеомный анализ нейронов зебраданию показал, что на цистеиновых остатках некоторых синаптических белков нейронов образуются инородные включения, меняющие их конформацию патологическим образом. Более того, анализ концентрации дофамина показал значительное влияние острого отравления акриламидом на дофаминергическую систему (рост прекурсоров дофамина, фенилаланина, тирозина и леводопы) [61].

На зебраданию также известны экспериментальные модели других распространенных синаптопатий, в том числе эпилепсии [8], расстройств аутистического спектра [6] и других нарушений социального поведения [62]. Эти нарушения у зебраданию можно эффективно регистрировать, используя стандартизированные и хорошо валидированные тесты социального предпочтения или построения косяка [62]. Также существует модель зебраданию, воссоздающая специфические особенности синдрома Ретта [18] на основе рыб с мутантным *cp2-null* (кодирующими метил-СpG-связывающий домен белка 2) и демонстрирующая аномальные сенсорные, тигмотаксические и двигательные фенотипы [18]. Кроме того, у данных рыб обнаружены изменения экспрессии белков, чье функционирование необходимо для нормального окислительно-восстановительного баланса в организме. Это свидетельствует об усилении окислительного стресса в организме зебраданию, тем самым напоминая клинический синдром Ретта и его модели на грызунах [18].

ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В целом зебраданию представляет собой важный организм для исследования синаптопатий и может помочь существенно расширить наше понимание этих нарушений и потенциальных новых молекулярных или генетических подходов к их лечению. Зебраданию является привлекательным модельным объектом в нейробиологических исследованиях, в том числе благодаря ряду биологических особенностей их организма, особенно высокой плодовитости и быстрого эмбрионального развития [42]. Это крайне важно в синаптической нейробиологии, где многие процессы развития и пластичности синапсов требуют наблюдения на разных стадиях жизни организма. Быстрое развитие зебраданию позволяет получать результаты в значительно более короткие сроки по сравнению с грызунами [63]. Дополнительным преимуществом зебраданию, как уже отмечалось, являются прозрачные эмбрионы и личинки, что позволяет визуализировать процессы развития нейронов и синапсов [64], в том числе — на критических, ранних стадиях развития [65].

Кроме того, существует широкий спектр поведенческих и токсикологических тестов, которые могут быть проведены как на взрослых особях зебрании, так и на личинках. Это позволяет исследователям оценить влияние различных факторов или потенциальных лекарственных препаратов на поведенческие функции и выявить возможные побочные эффекты. К примеру, тест нового аквариума используется для оценки локомоторных и анксиолитических/анксиогенных эффектов различных препаратов, в том числе лекарств для лечения эпилепсии и болезни Альцгеймера — расстройств, ассоциированных с синаптопатиями [66]. Для анализа пространственного обучения зебрании традиционно используют Y-образный лабиринт, показавший улучшение пространственной памяти зебрании при действии ряда препаратов [66, 67]. Помимо Y-образного лабиринта, в модели болезни Альцгеймера, вызванной хлоридом алюминия, также эффективен тест нового объекта, показавший ухудшение памяти рыб [68]. Небольшой размер и хорошо описанные формы поведения делают зебранию также удачным организмом для высокоэффективного скрининга различных препаратов с потенциальными терапевтическими свойствами [69, 70].

Модели синаптопатий на зебрании представляют собой важный инструмент для исследования, так как они позволяют достоверно воссоздать симптомы различных заболеваний человека. Это подтверждает их релевантность для изучения и понимания патологических процессов, происходящих в мозге и синапсах. Так, например, у зебрании моделируется синдром кошачьего крика [71] путем удаления гена *ctnnd2b*, ответственного за синтез дельта-катенина, который играет важную роль в дифференцировке нейронов, формировании и поддержании дендритов и синапсов, и чье отсутствие ассоциировано с данным синдромом клинически. У мутантных личинок и взрослых особей зебрании наблюдаются поведенческие и неврологические отклонения, например, гиперактивность в тесте нового аквариума [71]. Эти данные свидетельствуют о высоком физиологическом и клиническом сходстве между данной моделью и клинической картиной синдрома кошачьего крика, который также ассоциирован с нарушением синтеза дельта-катенина [72], дисфункцией синаптического аппарата нервных клеток [73] и выраженной гиперактивностью [74].

Модель зебрании хорошо подходит для изучения синдрома ломкой X-хромосомы. Так, рыбы со сниженной экспрессией гена *fmr1* (ортологичного гену человека, ассоциированного с данным синдромом), демонстрируют поведенческие нарушения, в том числе гиперчувствительность к звуковым стимулам [75], ухудшение памяти и тревожно-подобное поведение [76]. Подавление у зебрании экспрессии *fmr1*, индуцированное морфолиновыми олигонуклеотидами, связано с различными синаптическими нарушениями, например, с уменьшением числа постсинаптических дендритов [77]. Отсутствие у рыб экспрессии гена *fmr1* также влияет на транскриптом мозга зебрании — например, снижая экспрессию лизосомных генов [77], что также было показано для транскриптома мозга мышей с блокированной экспрессией *fmr1* [78]. Это позволяет допустить, что такие данные, полученные на рыбах, вполне могут быть перенесены на млекопитающих, в том числе и на человека [77].

Зебранию также успешно применяются для изучения МГ — например, на рыбах, нокаутных по гену *lrp4*, ответственному за синтез белка 4, родственного рецептору липопroteинов низкой плотности — многофункционального белка, ассоциированного с заболеваниями костей, почек, остеопорозом и неврологическими заболеваниями, в том числе МГ [51]. У эмбрионов зебрании обнаруживаются кистозные образования в плавниковых структурах и сплетении хвостовых вен, деформированные грудные плавники, дефект формирования костей и нарушения морфогенеза почек, что частично повторяет фенотип мутации гена *LRP4* человека [51].

Также LRP4 регулирует развитие нервно-мышечных синапсов, блокируя появление кластеров ацетилхолиновых рецепторов в нервно-мышечных синапсах в одних частях тела (аксиальная мускулатура) и стимулируя их появление в других (мышцы конечностей) [79], свидетельствуя о сходстве механизмов развития МГ у человека и зебранию.

Можно выделить несколько перспективных направлений в изучении синаптопатий на моделях зебранию. В частности, значительно улучшились методы генетического анализа, что позволило выявить новые генетические мутации, связанные с синаптопатиями [80]. К примеру, на смену более ранним методам молекулярной цитогенетики пришел новый подход — сравнительная геномная гибридизация. Он позволяет определять как количественные, так и качественные изменения в структуре хромосом, а также помогает обнаружить микроструктурные аномалии хромосом, что делает его эффективнее предшественников [80]. Данная методика активно применяется для исследования заболеваний, ассоциированных с хромосомными аномалиями, например, синдрома ломкой X-хромосомы [81]. Говоря об эволюции методов генетического анализа, следует отметить, что за последние десятилетия широкое распространение получила коммерческая диагностика различных генетически обусловленных заболеваний, в том числе и синаптопатий [80], что позволило значительно удешевить подобные методики и сделать их применение более удобным и доступным. Идентификация этих мутаций помогает понять механизмы развития заболеваний и их связь с синаптической функцией. Кроме того, генетические исследования также способствуют разработке более точной диагностики и прогнозированию прогрессирования синаптопатий.

В настоящее время проводятся трансляционные исследования роли развития аутизма у людей и в его моделях на грызунах [6, 82]. Также растет количество перодовых исследований, в которых делается акцент на связи редких генетических и хромосомных аномалий, нарушающих работу синаптического аппарата нервных клеток, с аутизмом [5, 30, 76].

Крайне перспективным направлением исследований в данной области является изучение на людях и животных моделях патогенеза эпилепсии [6], часто вызванной дисфункцией синаптического аппарата нейронов [8]. Исследования на животных моделях, включая секвенирование экзона при эпилепсии и протеомный анализ при аутоиммунных синаптопатиях, позволили ускорить идентификацию новых синаптических генов и белков, связанных с эпилепсией, большинство из которых играют важную роль в синаптической передаче [8]. Кроме того, данные подходы способствуют разработке противосудорожных препаратов и более глубокому пониманию механизмов синаптической передачи [8]. Среди таких препаратов, исследованных на зебранию, можно отметить вальпроовую кислоту, карбамазепин и фенитоин. Например, в модели пост-травматической эпилепсии у зебранию выявлены нарушения обучения и памяти, трудность в принятии решений и нарушение социального предпочтения [83].

В общем, использование зебранию в исследованиях синаптопатий представляет собой перспективный подход для изучения молекулярных, клеточных и функциональных аспектов этих расстройств. Зебранию являются ценной моделью, выявления ключевых генетических мутаций, взаимодействия между нейронами и синапсами и эффектов нарушений синапсов на неврологические функции.

Исследование синаптопатий сталкивается с рядом проблем и ограничений, которые затрудняют полное понимание этих заболеваний и разработку эффективных методов лечения. Прежде всего, синаптопатии — это редкие заболевания, что затрудняет набор достаточно больших выборок для проведения исследований и получения статистически значимых результатов. Во-вторых, диагностика синаптопатий осложнена тем, что их симптомы часто перекрываются, в том числе и с симп-

Таблица 1. Отдельные открытые вопросы, связанные с изучением патогенеза синаптопатий

Вопросы
• Создание генетических моделей зебраданию по времени быстрее, чем генетических моделей грызунов. Каким образом можно еще больше увеличить скорость создания генетических моделей на зебраданию? • Можно ли сократить временные затраты на исследования синаптопатий за счет создания фармакологических животных моделей вместо создания генетических, и имеет ли смысл создание таких моделей, если основная причина возникновения синаптопатий человека обусловлена генетическими механизмами? • Известно, что изменение стиля жизни (поддержание определенных диет) может помочь в лечении ряда заболеваний, в частности, при эпилепсии, несмотря на нарушенное функционирование синапсов [84]. Может ли изменение внешних факторов жизнедеятельности оказать подобный положительный эффект при других синаптопатиях? • Какую роль в патогенезе синаптопатий у зебраданию играют эпигенетические факторы? • Известно, что некоторые полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) способны модулировать функционирование синапсов, что может использоваться как терапевтическая стратегия [85]. Каков механизм воздействия ПНЖК и воспроизводится ли он у зебраданию? Может ли уровень ПНЖК использоваться как ранний физиологический биомаркер синаптопатий? • Подходит ли модель зебраданию для поиска терапевтических стратегий в случае синаптопатий при нейродегенеративных заболеваниях [86], учитывая высокий уровень нейрогенерации зебраданию, который может маскировать эффект изучаемого препарата? • Мутации генов белков NRXN–NLGN–SHANK, участвующих в функционировании синапсов, ассоциированы с расстройствами аутистического спектра (РАС), однако фенотипические проявления у грызунов с нокаутами <i>NRXN1</i> и <i>Shank3</i> несколько отличаются от клинических проявлений РАС [82]. Какой фенотип наблюдается у зебраданию при нокауте этих генов и является ли акватическая модель РАС в данном случае более релевантной? • Посредством каких механизмов нарушение пути NRXN–NLGN–SHANK влияет на проявление клинических симптомов РАС [82]? • Каким образом можно преодолеть проблему, связанную с разнообразием фенотипических проявлений, учитывая, что у людей наблюдается гетерогенность мутаций генов белков, вовлеченных в регуляцию синаптической активности (в частности, NRXN1), а при создании животных моделей проводится полный нокаут? • Известно, что искусственная среда содержания грызунов оказывает влияние на поведение животных, тем самым действуя на фенотипические проявления синаптопатий. Реализуется ли такой же эффект в модели зебраданию [87]? • Какие дополнительные неинвазивные методы изучения мозга (кроме МРТ, ПЭТ и ЭЭГ*) можно применять для анализа и межвидового сравнения синаптопатий у человека и модельных объектов? • Каков механизм причинно-следственной связи между дефектами синаптических белков и шизофренией [87]? • Важный вклад в понимание роли синаптопатий при патогенезе неврологических болезней внесло создание трехмерных культур клеток человеческого мозга [86, 88]. Насколько сопоставимы трехмерные культуры клеток мозга человека и мозга модельных животных, в частности, зебраданию? • При мозжечковых синаптопатиях, вызванных аутоантителами, возникает положительная обратная связь между глияльными клетками и глутаматом [89]. Возникает ли эта связь при синаптопатиях у зебраданию? • Может ли воздействие на астроглию или микроглию ослабить симптомы синаптопатий? • Каким образом можно разработать модель слуховой синаптопатии путем прямой стимуляции органов боковой линии рыб?

Таблица 1. Окончание

Вопросы
• Каков механизм восстановления волосковых клеток при слуховых синаптопатиях под влиянием гормонов? • Среди синаптопатий можно выделить отдельный класс иммунных нарушений, в которых модуляция состояния синапса опосредуется интерлейкином IL-1β [90]. Может ли модуляция сигналов IL-1β использоваться в качестве терапевтических стратегий? • Может ли модуляция нейровоспалительных процессов, в частности, с помощью IL-1β, быть полезной при терапии другого типа синаптогенетических болезней?

*МРТ – магнитно-резонансная томография, ЭЭГ – электроэнцефалография, ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография.

томами других неврологических и психических заболеваний. В третьих, также отсутствует единая классификация синаптопатий, что затрудняет стандартизацию исследований и сравнение результатов различных групп. В-четвертых, для изучения синаптопатий необходимы соответствующие экспериментальные модели. Однако создание подходящих моделей, особенно для редких и малоизучаемых заболеваний, проблематично. В свою очередь, моделирование сложных механизмов синаптической передачи в лаборатории может быть недостаточно точным и не отражать полную сложность этих процессов у человека. В-пятых, синаптопатии плохо изучены, и механизмы развития и прогрессирования этих болезней не вполне ясны, что затрудняет разработку эффективных методов диагностики и лечения. Наконец, в настоящее время доступных методов лечения синаптопатий нет, и эффективность их коррекции может быть переменной для разных пациентов.

Несмотря на перечисленные проблемы, трансляционные исследования синаптопатий продолжаются. Это требует мультимодального подхода, совмещения различных моделей исследований, интеграции эпидемиологических данных и совершенствования методов диагностики и обработки данных. Инновационные исследования на рыбах и других животных, направленные на поиск новых мишеней и подходов, которые могут оказаться более эффективными для коррекции дисфункции синапсов, приближают нас к пониманию этиологии и патогенеза синаптопатий, а также способствуют разработке и внедрению более совершенных методов лечения пациентов, страдающих от синаптопатий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Существующие экспериментальные модели синаптопатий, преимущественно основанные на создании генетически модифицированных грызунов, успешно воспроизводят патологические изменения, характерные для различных синаптопатий, включая нарушения центральной нервной системы. Однако новые альтернативные модельные организмы, такие как зебраданио, представляют собой перспективный подход, который может послужить для более эффективного фармакологического скрининга и уже используются для поиска новых лекарственных препаратов. Расширение использования этих моделей позволит улучшить понимание глубинных основ данных патологий и сделать более эффективным подбор лечения для пациентов с синаптопатиями. Кроме того, многие открытые вопросы в области изучения этиологии и механизмов патогенеза синаптопатий (табл. 1) могут быть успешно разрешены с помощью широкого использования экспериментальных моделей данных патологий, в том числе с использованием зебраданио.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана Национальным медицинским исследовательским центром им. В.А. Алмазова МЗ РФ (субсидия Министерства науки высшего образования РФ, соглашение № 075-15-2021-301 от 20.04.2022). Участие А.В.К. поддержано средствами Санкт-Петербургского государственного университета.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Общая идея работы, руководство и координация проекта (А.В.К.), написание чернового варианта (А.С.Л., М.М.К.), обсуждение концепции и редактирование манускрипта (А.В.К., Н.П.И., А.С.Л., М.М.К., Д.С.Г., Т.О.К., Т.В.В., Е.В.П.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grant SGN (2012) Synaptopathies: diseases of the synaptome. *Curr Opin Neurobiol* 22: 522–529. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.02.002>
2. Crisp SJ, Kullmann DM, Vincent A (2016) Autoimmune synaptopathies. *Nat Rev Neurosci* 17: 103–117. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.27>
3. Wang X, Kery R, Xiong Q (2018) Synaptopathology in autism spectrum disorders: Complex effects of synaptic genes on neural circuits. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 84: 398–415. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.09.026>
4. Fewou SN, Plomp JJ, Willison HJ (2014) The pre-synaptic motor nerve terminal as a site for antibody-mediated neurotoxicity in autoimmune neuropathies and synaptopathies. *J Anat* 224: 36–44. <https://doi.org/10.1111/joa.12088>
5. Bagni C, Zukin RS (2019) A Synaptic Perspective of Fragile X Syndrome and Autism Spectrum Disorders. *Neuron* 101: 1070–1088. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.02.041>
6. Keller R, Basta R, Salerno L, Elia M (2017) Autism, epilepsy, and synaptopathies: a not rare association. *Neurol Sci Off J Ital Neurol Soc Ital Soc Clin Neurophysiol* 38: 1353–1361. <https://doi.org/10.1007/s10072-017-2974-x>
7. Luo J, Norris RH, Gordon SL, Nithianantharajah J (2018) Neurodevelopmental synaptopathies: Insights from behaviour in rodent models of synapse gene mutations. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 84: 424–439. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.12.001>
8. Fukata Y, Fukata M (2017) Epilepsy and synaptic proteins. *Curr Opin Neurobiol* 45: 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.02.001>
9. Obi-Nagata K, Temma Y, Hayashi-Takagi A (2019) Synaptic functions and their disruption in schizophrenia: From clinical evidence to synaptic optogenetics in an animal model. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 95: 179–197. <https://doi.org/10.2183/pjab.95.014>
10. Asuni AA, Perry VH, O'Connor V (2010) Change in tau phosphorylation associated with neurodegeneration in the ME7 model of prion disease. *Biochem Soc Trans* 38: 545–551. <https://doi.org/10.1042/BST0380545>
11. Aedo C, Aguilar E (2020) Cochlear synaptopathy: new findings in animal and human research. *Rev Neurosci* 31: 605–615. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2020-0002>
12. Yeh FL, Dong M, Yao J, Tepp WH, Lin G, Johnson EA, Chapman ER (2010) SV2 mediates entry of tetanus neurotoxin into central neurons. *PLoS Pathog* 6: e1001207. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001207>
13. Figgitt DP, Noble S (2002) Botulinum toxin B: a review of its therapeutic potential in the management of cervical dystonia. *Drugs* 62: 705–722. <https://doi.org/10.2165/00003495-200262040-00011>
14. Cherington M (2004) Botulism: update and review. *Semin Neurol* 24: 155–163. <https://doi.org/10.1055/s-2004-830901>

15. Farrar JJ, Yen LM, Cook T, Fairweather N, Binh N, Parry J, Parry CM (2000) Tetanus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 69: 292–301.
<https://doi.org/10.1136/jnnp.69.3.292>
16. Liberman MC, Kujawa SG (2017) Cochlear synaptopathy in acquired sensorineural hearing loss: Manifestations and mechanisms. *Hear Res* 349: 138–147.
<https://doi.org/10.1016/j.heares.2017.01.003>
17. Rodríguez-Caballero A, Torres-Lagares D, Rodríguez-Pérez A, Serrera-Figallo M-A, Hernández-Guisado J-M, Machuca-Portillo G (2010) Cri du chat syndrome: a critical review. *Med Oral Patol Oral Cirugia Bucal* 15: e473–478.
<https://doi.org/10.4317/medoral.15.e473>
18. Kyle SM, Vashi N, Justice MJ (2018) Rett syndrome: a neurological disorder with metabolic components. *Open Biol* 8: 170216.
<https://doi.org/10.1098/rsob.170216>
19. Alfaro-Paredes K, Aguilar-Ydiáquez C, Aguirre-Flores R, Schulz-Cáceres H (2022) Myasthenia gravis and pregnancy: impact and approach. *Rev Neurol* 75: 117–122.
<https://doi.org/10.33588/rn.7505.2022207>
20. Papazian O, Alfonso I (2009) Juvenile myasthenia gravis. *Medicina (Mex)* 69:71–83
21. Claytor B, Cho S-M, Li Y (2023) Myasthenic crisis. *Muscle Nerve* 68: 8–19.
<https://doi.org/10.1002/mus.27832>
22. Kesner VG, Oh SJ, Dimachkie MM, Barohn RJ (2018) Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome. *Neurol Clin* 36: 379–394.
<https://doi.org/10.1016/j.ncl.2018.01.008>
23. Eaton LM, Lambert EH (1957) Electromyography and electric stimulation of nerves in diseases of motor unit; observations on myasthenic syndrome associated with malignant tumors. *J Am Med Assoc* 163: 1117–1124.
<https://doi.org/10.1001/jama.1957.02970480021005>
24. Li D, Tansley SL (2019) Juvenile Dermatomyositis-Clinical Phenotypes. *Curr Rheumatol Rep* 21: 74.
<https://doi.org/10.1007/s11926-019-0871-4>
25. Aggarwal R, Charles-Schoeman C, Schessl J, Bata-Csörgő Z, Dimachkie MM, Griger Z, Moiseev S, Oddis C, Schiopu E, Vencovsky J, Beckmann I, Clodi E, Bugrova O, Dankó K, Ernste F, Goyal NA, Heuer M, Hudson M, Hussain YM, Karam C, Magnolo N, Nelson R, Pozur N, Prystupa L, Sárdy M, Valenzuela G, van der Kooi AJ, Vu T, Worm M, Levine T, ProDERM Trial Group (2022) Trial of Intravenous Immune Globulin in Dermatomyositis. *N Engl J Med* 387: 1264–1278.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2117912>
26. Sonoda Y, Arimura K, Kurono A, Suehara M, Kameyama M, Minato S, Hayashi A, Osame M (1996) Serum of Isaacs' syndrome suppresses potassium channels in PC-12 cell lines. *Muscle Nerve* 19: 1439–1446.
<https://doi.org/10.1002/mus.880191102>
27. Araya EI, Carvalho EC, Andreolini R, Zamponi GW, Chichorro JG (2022) Trigeminal neuropathic pain causes changes in affective processing of pain in rats. *Mol Pain* 18: 17448069211057750.
<https://doi.org/10.1177/17448069211057750>
28. Luo Y, Xu N, Yi W, Yu T, Yang Z (2011) Study on the correlation between synaptic reconstruction and astrocyte after ischemia and the influence of electroacupuncture on rats. *Chin J Integr Med* 17:750–757.
<https://doi.org/10.1007/s11655-011-0754-7>
29. Levy AM, Gomez-Puertas P, Tümer Z (2022) Neurodevelopmental Disorders Associated with PSD-95 and Its Interaction Partners. *Int J Mol Sci* 23: 4390.
<https://doi.org/10.3390/ijms23084390>
30. Levy NS, Umanah GKE, Rogers EJ, Jada R, Lache O, Levy AP (2019) IQSEC2-Associated Intellectual Disability and Autism. *Int J Mol Sci* 20: 3038.
<https://doi.org/10.3390/ijms20123038>
31. Peça J, Feliciano C, Ting JT, Wang W, Wells MF, Venkatraman TN, Lascola CD, Fu Z, Feng G (2011) Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature* 472: 437–442.
<https://doi.org/10.1038/nature09965>
32. Hoover BR, Reed MN, Su J, Penrod RD, Kotilinek LA, Grant MK, Pitstick R, Carlson GA, Lanier LM, Yuan L-L, Ashe KH, Liao D (2010) Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron* 68: 1067–1081.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.030>
33. Palmieri M, Frati A, Santoro A, Frati P, Fineschi V, Pesce A (2021) Diffuse Axonal Injury: Clinical Prognostic Factors, Molecular Experimental Models and the Impact of the Trauma Related Oxidative Stress. An Extensive Review Concerning Milestones and Advances. *Int J Mol Sci* 22: 10865.
<https://doi.org/10.3390/ijms221910865>

34. Lee J-H, Lee MY, Chung P-S, Jung JY (2019) Photobiomodulation using low-level 808 nm diode laser rescues cochlear synaptopathy after acoustic overexposure in rat. *J Biophotonics* 12: e201900145.
<https://doi.org/10.1002/jbio.201900145>
35. Varela-Nieto I, Murillo-Cuesta S, Calvino M, Cediel R, Lassaletta L (2020) Drug development for noise-induced hearing loss. *Expert Opin Drug Discov* 15: 1457–1471.
<https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1806232>
36. Keiñhley EM (2020) Pathology and mechanisms of cochlear aging. *J Neurosci Res* 98: 1674–1684.
<https://doi.org/10.1002/jnr.24439>
37. Herrera MI, Otero-Losada M, Udovin LD, Kusnier C, Kölliker-Frers R, de Souza W, Capani F (2017) Could Perinatal Asphyxia Induce a Synaptopathy? New Highlights from an Experimental Model. *Neural Plast* 2017: 3436943.
<https://doi.org/10.1155/2017/3436943>
38. Herrera MI, Kobiec T, Kölliker-Frers R, Otero-Losada M, Capani F (2020) Synaptoprotection in Perinatal Asphyxia: An Experimental Approach. *Front Synaptic Neurosci* 12: 35.
<https://doi.org/10.3389/fnsyn.2020.00035>
39. Ortiz M, Loidl F, Vázquez-Borsetti P (2022) Transition to extrauterine life and the modeling of perinatal asphyxia in rats. *WIREs Mech Dis* 14: e1568.
<https://doi.org/10.1002/wsbm.1568>
40. Wyart C, Del Bene F (2011) Let there be light: zebrafish neurobiology and the optogenetic revolution. *Rev Neurosci* 22: 121–130.
<https://doi.org/10.1515/RNS.2011.013>
41. Key B, Devine CA (2003) Zebrafish as an experimental model: strategies for developmental and molecular neurobiology studies. *Methods Cell Sci* 25: 1–6.
<https://doi.org/10.1023/B:MICS.0000006849.98007.03>
42. Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE (2005) Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol* 86: 6–19.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi110>
43. Freifeld L, Odstcil I, Förster D, Ramirez A, Gagnon JA, Randlett O, Costa EK, Asano S, Celiker OT, Gao R, Martin-Alarcon DA, Reginato P, Dick C, Chen L, Schoppik D, Engert F, Baier H, Boyden ES (2017) Expansion microscopy of zebrafish for neuroscience and developmental biology studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: E10799–E10808.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1706281114>
44. Choe S-K, Kim C-H (2023) Zebrafish: A Powerful Model for Genetics and Genomics. *Int J Mol Sci* 24: 8169.
<https://doi.org/10.3390/ijms24098169>
45. Chen Y, Zhang S, Chai R, Li H (2019) Hair Cell Regeneration. *Adv Exp Med Biol* 1130: 1–16.
https://doi.org/10.1007/978-981-13-6123-4_1
46. Schmidt R, Strähle U, Scholpp S (2013) Neurogenesis in zebrafish – from embryo to adult. *Neural Develop* 8: 3.
<https://doi.org/10.1186/1749-8104-8-3>
47. Chang W, Pedroni A, Bertuzzi M, Kizil C, Simon A, Ampatzis K (2021) Locomotion dependent neuron-glia interactions control neurogenesis and regeneration in the adult zebrafish spinal cord. *Nat Commun* 12: 4857.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-25052-1>
48. Pedersen BK (2019) Physical activity and muscle-brain crosstalk. *Nat Rev Endocrinol* 15: 383–392.
<https://doi.org/10.1038/s41574-019-0174-x>
49. Lucini C, D’Angelo L, Cacialli P, Palladino A, de Girolamo P (2018) BDNF, Brain, and Regeneration: Insights from Zebrafish. *Int J Mol Sci* 19: 3155.
<https://doi.org/10.3390/ijms19103155>
50. Yu Y, Schachner M (2013) Syntenin-a promotes spinal cord regeneration following injury in adult zebrafish. *Eur J Neurosci* 38(2): 2280–2289.
<https://doi.org/10.1111/ejn.12222>
51. Tian J, Shao J, Liu C, Hou H-Y, Chou C-W, Shboul M, Li G-Q, El-Khateeb M, Samarah OQ, Kou Y, Chen Y-H, Chen M-J, Lyu Z, Chen W-L, Chen Y-F, Sun Y-H, Liu Y-W (2019) Deficiency of lrp4 in zebrafish and human LRP4 mutation induce aberrant activation of Jagged–Notch signaling in fin and limb development. *Cell Mol Life Sci CMLS* 76: 163–178.
<https://doi.org/10.1007/s00018-018-2928-3>
52. Shah AN, Davey CF, Whitebirch AC, Miller AC, Moens CB (2015) Rapid reverse genetic screening using CRISPR in zebrafish. *Nat Methods* 12: 535–540.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3360>
53. Ogino K, Hirata H (2016) Defects of the Glycinergic Synapse in Zebrafish. *Front Mol Neurosci* 9: 50.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00050>

54. *Aramaki S, Hatta K* (2006) Visualizing neurons one-by-one in vivo: optical dissection and reconstruction of neural networks with reversible fluorescent proteins. *Dev Dyn* 235: 2192–2199. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20826>
55. *Wiegert JS, Bengtson CP, Bading H* (2007) Diffusion and not active transport underlies and limits ERK1/2 synapse-to-nucleus signaling in hippocampal neurons. *J Biol Chem* 282: 29621–29633. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701448200>
56. *Takeuchi M, Matsuda K, Yamaguchi S, Asakawa K, Miyasaka N, Lal P, Yoshihara Y, Koga A, Kawakami K, Shimizu T, Hibi M* (2015) Establishment of Gal4 transgenic zebrafish lines for analysis of development of cerebellar neural circuitry. *Dev Biol* 397: 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.09.030>
57. *Sebe JY, Cho S, Sheets L, Rutherford MA, von Gersdorff H, Raible DW* (2017) Ca²⁺-Permeable AMPARs Mediate Glutamatergic Transmission and Excitotoxic Damage at the Hair Cell Ribbon Synapse. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 37: 6162–6175. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3644-16.2017>
58. *Kindt KS, Sheets L* (2018) Transmission Disrupted: Modeling Auditory Synaptopathy in Zebrafish. *Front Cell Dev Biol* 6: 114. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00114>
59. *Moser T, Starr A* (2016) Auditory neuropathy—neural and synaptic mechanisms. *Nat Rev Neurol* 12: 135–149. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.10>
60. *Uribe PM, Villapando BK, Lawton KJ, Fang Z, Gritsenko D, Bhandiwad A, Sisneros JA, Xu J, Coffin AB* (2018) Larval Zebrafish Lateral Line as a Model for Acoustic Trauma. *eNeuro* 5: ENEURO.0206-18.2018. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0206-18.2018>
61. *Prats E, Gómez-Canela C, Ben-Lulu S, Ziv T, Padrós F, Tornero D, Garcia-Reyero N, Tauler R, Admon A, Raldúa D* (2017) Modelling acrylamide acute neurotoxicity in zebrafish larvae. *Sci Rep* 7: 13952. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14460-3>
62. *Meshalkina DA, N Kizlyk M, V Kysil E, Collier AD, Echevarria DJ, Abreu MS, Barcellos LJG, Song C, Warnick JE, Kyzar EJ, Kalueff AV* (2018) Zebrafish models of autism spectrum disorder. *Exp Neurol* 299: 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.02.004>
63. *Bacila I, Cunliffe VT, Krone NP* (2021) Interrenal development and function in zebrafish. *Mol Cell Endocrinol* 535: 111372. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111372>
64. *Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF* (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat* 203: 253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
65. *Hoon M, Okawa H, Della Santina L, Wong ROL* (2014) Functional architecture of the retina: development and disease. *Prog Retin Eye Res* 42: 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2014.06.003>
66. *Damo JLK, Boiangiu RS, Brinza I, Kenko Djoumessi LB, Rebe RN, Kamleu BN, Guedang SDN, Camdi GW, Bouvourné P, Keugong EW, Ngatanko HHA, Cioanca O, Hancianu M, Foyet HS, Hritcu L* (2022) Neuroprotective Potential of *Guiera senegalensis* (Combretaceae) Leaf Hydroethanolic Extract against Cholinergic System Dysfunctions and Oxidative Stress in Scopolamine-Induced Cognitive Impairment in Zebrafish (*Danio rerio*). *Plants Basel Switz* 11: 1149. <https://doi.org/10.3390/plants11091149>
67. *Boiangiu RS, Mihasan M, Gorgan DL, Stache BA, Hritcu L* (2021) Anxiolytic, Promnesic, Anti-Acetylcholinesterase and Antioxidant Effects of Cotinine and 6-Hydroxy-L-Nicotine in Scopolamine-Induced Zebrafish (*Danio rerio*) Model of Alzheimer's Disease. *Antioxid Basel Switz* 10: 212. <https://doi.org/10.3390/antiox10020212>
68. *Kaur K, Narang RK, Singh S* (2022) AICl₃ induced learning and memory deficit in zebrafish. *Neurotoxicology* 92: 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2022.07.004>
69. *Kodera K, Matsui H* (2022) Zebrafish, Medaka and Turquoise Killifish for Understanding Human Neurodegenerative/Neurodevelopmental Disorders. *Int J Mol Sci* 23: 1399. <https://doi.org/10.3390/ijms23031399>
70. *Orger MB, de Polavieja GG* (2017) Zebrafish Behavior: Opportunities and Challenges. *Annu Rev Neurosci* 40: 125–147. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071714-033857>
71. *Vaz R, Edwards S, Dueñas-Rey A, Hofmeister W, Lindstrand A* (2023) Loss of *ctnnd2b* affects neuronal differentiation and behavior in zebrafish. *Front Neurosci* 17: 1205653. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1205653>

72. Donta MS, Srivastava Y, McCrea PD (2022) Delta-Catenin as a Modulator of Rho GTPases in Neurons. *Front Cell Neurosci* 16: 939143. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.939143>
73. Arikath J, Peng I-F, Ng YG, Israely I, Liu X, Ullian EM, Reichardt LF (2009) Delta-catenin regulates spine and synapse morphogenesis and function in hippocampal neurons during development. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 29: 5435–5442. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0835-09.2009>
74. Dykens EM, Clarke DJ (1997) Correlates of maladaptive behavior in individuals with 5p- (cri du chat) syndrome. *Dev Med Child Neurol* 39: 752–756. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.1997.tb07377.x>
75. Constantin L, Poulsen RE, Scholz LA, Favre-Bulle IA, Taylor MA, Sun B, Goodhill GJ, Vanwalleghe GC, Scott EK (2020) Altered brain-wide auditory networks in a zebrafish model of fragile X syndrome. *BMC Biol* 18: 125. <https://doi.org/10.1186/s12915-020-00857-6>
76. Wu Y-J, Hsu M-T, Ng M-C, Amstislavskaya TG, Tikhonova MA, Yang Y-L, Lu K-T (2017) Fragile X Mental Retardation-1 Knockout Zebrafish Shows Precocious Development in Social Behavior. *Zebrafish* 14: 438–443. <https://doi.org/10.1089/zeb.2017.1446>
77. Barthelson K, Baer L, Dong Y, Hand M, Pujic Z, Newman M, Goodhill GJ, Richards RI, Pederson SM, Lardelli M (2021) Zebrafish Chromosome 14 Gene Differential Expression in the *fmr1* h u2787 Model of Fragile X Syndrome. *Front Genet* 12: 625466. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.625466>
78. Richter JD, Zhao X (2021) The molecular biology of FMRP: new insights into fragile X syndrome. *Nat Rev Neurosci* 22: 209–222. <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00432-0>
79. Walker LJ, Roque RA, Navarro MF, Granato M (2021) Agrin/Lrp4 signal constrains MuSK-dependent neuromuscular synapse development in appendicular muscle. *Dev Camb Engl* 148: dev199790. <https://doi.org/10.1242/dev.199790>
80. Durmaz AA, Karaca E, Demkow U, Toruner G, Schoumans J, Cogulu O (2015) Evolution of Genetic Techniques: Past, Present, and Beyond. *BioMed Res Int* 2015: 461524. <https://doi.org/10.1155/2015/461524>
81. Esposito G, Tremolaterra MR, Savarese M, Spiniello M, Patrizio MP, Lombardo B, Pastore L, Salvatore F, Carsana A (2018) Unraveling unusual X-chromosome patterns during fragile-X syndrome genetic testing. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* 476: 167–172. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.11.016>
82. Molloy CJ, Cooke J, Gatford NJF, Rivera-Olvera A, Avazzadeh S, Homberg JR, Grandjean J, Fernandes C, Shen S, Loth E, Srivastava DP, Gallagher D (2023) Bridging the translational gap: what can synaptopathies tell us about autism? *Front Mol Neurosci* 27(16): 1191323. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1191323>
83. Cho S-J, Park E, Baker A, Reid AY (2021) Post-Traumatic Epilepsy in Zebrafish Is Drug-Resistant and Impairs Cognitive Function. *J Neurotrauma* 38: 3174–3183. <https://doi.org/10.1089/neu.2021.0156>
84. Spoto G, Valentini G, Saia MC, Butera A, Amore G, Salpietro V, Nicotera AG, Di Rosa G (2022) Synaptopathies in Developmental and Epileptic Encephalopathies: A Focus on Pre-synaptic Dysfunction. *Front Neurol* 13: 826211. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.826211>
85. Di Miceli M, Bosch-Bouju C, Layé S (2020) PUFA and their derivatives in neurotransmission and synapses: a new hallmark of synaptopathies. *Proc Nutr Soc* 1–16. <https://doi.org/10.1017/S0029665120000129>
86. Taoufik E, Kouroupi G, Zygianni O, Matsas R (2018) Synaptic dysfunction in neurodegenerative and neurodevelopmental diseases: an overview of induced pluripotent stem-cell-based disease models. *Open Biol* 8: 180138. <https://doi.org/10.1098/rsob.180138>
87. Clapote SJ (2022) How can we obtain truly translational mouse models to improve clinical outcomes in schizophrenia? *Dis Model Mech* 15: dmm049970. <https://doi.org/10.1242/dmm.049970>
88. Pasca SP (2018) The rise of three-dimensional human brain cultures. *Nature* 553: 437–445. <https://doi.org/10.1038/nature25032>
89. Mitoma H, Manto M (2023) Advances in the Pathogenesis of Auto-antibody-Induced Cerebellar Synaptopathies. *Cerebellum Lond Engl* 22: 129–147. <https://doi.org/10.1007/s12311-021-01359-z>
90. Pozzi D, Menna E, Canzi A, Desiato G, Mantovani C, Matteoli M (2018) The Communication Between the Immune and Nervous Systems: The Role of IL-1 β in Synaptopathies. *Front Mol Neurosci* 11: 111. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00111>

Experimental Models of Synaptopathies Based on Zebrafish

A. S. Lebedev^{a, b, c}, M. M. Kotova^b, N. P. Ilyin^{a, c}, T. O. Kolesnikova^b, D. S. Galstyan^{a, c, d},
T. V. Vyunova^g, E. V. Petersen^e, and A.V. Kalueff^{a, b, c, d, f, *}

^a*World-class Scientific Research Center “Center of Personalized Medicine”,
Almazov National Medical Research Center Ministry of Healthcare of Russian Federation,
St. Petersburg, Russia*

^b*Neurobiology Department Research Center for Genetics and Life Sciences,
Sirius University of Science and Technology, Sirius Federal Territory, Russia*

^c*Institute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

^d*Granov Russian Scientific Center for Radiology and Surgical Technologies,
Ministry of Healthcare of Russian Federation, St. Petersburg, Russia*

^e*Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russia*

^f*Ural Federal University, Yekaterinburg, Russia*

^g*Institute of Molecular Genetics, National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia*

^{*}*e-mail: avkalueff@gmail.com*

Synaptopathies include a heterogeneous group of severely debilitating neurological diseases characterized by structural and functional deficits of neuronal synapses. Common synaptopathies include epilepsy, schizophrenia, prion diseases, autism spectrum disorders, various autoimmune diseases and cochlear synaptopathies. Their pathogenesis is caused by both genetic and environmental factors. However, the relationship between the cause and clinical manifestations of each particular synaptopathy, and their therapy, remain poorly understood. Here, we discuss animal models of synaptopathies, with a specific emphasis on zebrafish (*Danio rerio*), as well as outline several lines of future research in this field. Overall, zebrafish emerge as a promising organism to mimic a wide range of synaptopathies, paralleling and complementing their existing models in rodents.

Keywords: synaptic transmission, synaptopathies, pathogenesis, rodents, fish, experimental models

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ
ДИСФУНКЦИЙ ПРИ ПАТОГЕНЕЗЕ БОЛЕЗНЕЙ ЦНС НА ЗЕБРАДАНИО

© 2023 г. Л. В. Юшко¹, М. М. Котова¹, Т. В. Вьюнова², А. В. Калувей^{1, 3, 4, 5, *}

¹Направление “Нейробиология”, Научный центр генетики и наук о жизни,
Научно-технологический университет “Сириус”, Федеральная территория Сириус, Россия

²Лаборатория технологий нейрореабилитации, Центр Life Improvement
by Future Technologies “LIFT”, Москва, Россия

³Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия

⁴Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова МЗ РФ,
Санкт-Петербург, Россия

⁵Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный
университет, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: avkalueff@gmail.com

Поступила в редакцию 09.09.2023 г.

После доработки 04.10.2023 г.

Принята к публикации 04.10.2023 г.

Нарушения функций митохондрий в клетках мозга связаны с патогенезом заболеваний различной этиологии, в том числе болезней Альцгеймера, Паркинсона и Гентингтона, бокового амиотрофического склероза, синдрома Ли, аутизма и других. Для изучения митохондриальных дисфункций и создания новых терапевтических средств большое значение имеют исследования на животных. Помимо традиционных моделей на грызунах, пресноводная костная рыба зебраданио (*zebrafish*, *Danio rerio*) представляет особый интерес как модельный объект в силу своих биологических характеристик, практичности и возможности получить большой объем экспериментальных данных. В работе обсуждаются генетические и фармакологические модели митохондриальных дисфункций и связанных с ними неврологических расстройств на грызунах и зебраданио. Приведенные данные указывают на зебраданио как эффективную трансляционную модель для изучения патогенеза различных заболеваний мозга, связанных с митохондриальными дисфункциями.

Ключевые слова: митохондрии, митохондриальные дисфункции, болезни ЦНС, модельные организмы, зебраданио

DOI: 10.31857/S0869813923110146, EDN: AFGSLI

ВВЕДЕНИЕ

Главная биологическая роль митохондрий эукариот — поддержание энергетического гомеостаза и синтез АТФ — особенно важна для мозга, потребляющего до 20% всей продуцируемой энергии организма. Митохондрии также активно вовлечены в регуляцию клеточного гомеостаза, апоптоза, биогенеза железосерных кластеров и кальция [1, 2]. Нарушение структуры и функций митохондрий приводит к снижению синтеза АТФ, продукции активных форм кислорода (АФК) и активации систем программированной гибели клетки — апоптоза, аутофагии и некроза [3], что может вызывать снижение метаболизма клеток, их дегенерацию, накопле-

ние свободных радикалов и (за счет каскада внутриклеточных реакций с ядром) изменение активности генов [4]. Гибель клеток мозга, связанная с митохондриальными дисфункциями (МД), имеет серьезные последствия для поведенческой активности, локомоции и памяти [5]. При патологиях центральной нервной системы (ЦНС), МД могут проявляться в виде локальных поражений отдельных тканей или структур (например, зрительного нерва при наследственной оптической нейропатии Лебера [6] или улитки уха при несиндромной наследственной глухоте) либо как распространенные поражения (например, при энцефаломиопатии, кардиопатии или сложных мультисистемных синдромах) на фоне атаксии, судорог, полинейропатии, пигментной ретинопатии и моторных дисфункций [7].

Нарушение синтеза АТФ и процессов окислительного фосфорилирования может быть вызвано общей дисфункцией дыхательной цепи митохондрий или дефектами ферментативных комплексов дыхательной цепи — комплексов I (НАДН: убихинонредуктаза), II (сукцинатдегидрогеназа), III (хинол-цитохром C (сyt C) редуктаза), IV (циклооксигеназа COX), V (FoF1-АТФаза) и переносчиков электронов — убихинона (кофермент Q, CoQ) и цитохрома C [2, 8]. Дыхательная цепь кодируется уникальной комбинацией двух отдельных генетических систем — ядерного и митохондриального генома. 13 ключевых структурных полипептидов, составляющих мультимерные субъединицы комплексов дыхательной цепи и АТФ-синтазы, кодируются митохондриальной ДНК (мтДНК), а также двумя рибосомальными РНК (рРНК) и 22 транспортными РНК (тРНК), необходимыми для осуществления автохтонного синтеза белка. Около 80 остальных белков, составляющих комплексы окислительного фосфорилирования, кодируются генами ядерной ДНК (ядДНК). мтДНК кодирует основной механизм синтеза белка, а также репликацию, репарацию и транскрипцию, но остается полностью зависимой от ядра в отношении снабжения ферментами и вспомогательными компонентами [9]. Таким образом, источником нарушений окислительного фосфорилирования может быть как наследуемый генотип, так и цитоплазма материнской клетки [2].

МД характеризуются гетерогенной природой, проявляясь в различных возрастах и нося мультисистемный характер поражения, не всегда соответствующий генотипу пациента, что сильно осложняет диагностику и лечение [10]. Конкретные мутации мтДНК связаны со специфическими синдромами, однако одна мутация может проявляться несколькими различными фенотипами в зависимости от сегрегации мутации и уровня гетероплазмии. Например, мутация *m.3243A>G* впервые была описана в связи с классической митохондриальной энцефалопатией с лактоацидозом и синдромом инсультоподобных эпизодов, однако она же может приводить и к хронической прогрессирующей наружной офтальмоплегии, а также к наследственной глухоте и диабету по материнской линии [10, 11].

Дефекты яДНК влияют на поддержание целостности мтДНК, сборку и структуру комплексов дыхательной цепи, а также на митохондриальную динамику. Одним из наиболее распространенных дефектов яДНК являются мутации в гене *POLG*, который кодирует полимеразу мтДНК и отвечает за репликацию митохондриального генома. Мутации *POLG* приводят к ряду различных клинических фенотипов либо с ранним началом, например, при синдроме Альперса, либо с поздним началом, как при хронической прогрессирующей наружной офтальмоплегии, миоклонической эпилепсии, миопатии, сенсорной атаксии, что связано либо с накоплением множественных делеций мтДНК, либо с истощением содержания мтДНК в отдельных нейронах [8].

МД участвуют в патогенезе различных заболеваний ЦНС, например, являясь ведущим фактором развития спорадической формы болезни Альцгеймера (БА). Снижение синтеза АТФ и окислительный стресс могут приводить к гиперпродукции β -амилоида ($A\beta$), который токсичен для митохондрий, усугубляя нейродегенера-

цию на фоне накопления АФК [12, 13]. Болезнь Паркинсона (БП) – еще одно серьезное нейродегенеративное заболевание, при котором отмечаются МД и окислительный и нитрозативный стресс [14], а АФК, повреждающие белки и липиды клеток мозга, и реактивные формы азота (РФА) усугубляют нейроапоптоз [15]. Накопление α -синуклеида может приводить к МД путем ингибирования комплекса I дыхательной цепи, повышения уровня цитохрома C, изменения гомеостаза кальция и железа, гиперпродукции оксида азота NO и усиления митохондриально-го метаболизма [13, 16].

Боковой амиотрофический склероз (БАС) связан с мутациями в более чем 25 генетических локусах, среди которых наиболее часто встречаются мутации генов *SOD1*, *TARDBP* и *C9ORF72* [17]. Развитие заболевания происходит в условиях повышенной функциональной нагрузки на мотонейроны, делая их уязвимыми в связи с высокой потребностью во внутриклеточном кальции, снижая экспрессию кальций-связывающих белков, глутаматных α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионатных (AMPA) рецепторов, а также ряда антиоксидантов и антиапоптотических факторов. В результате активации мотонейронов наблюдается глутаматная эксайтотоксичность, накопление внутриклеточного кальция, активация внутриклеточных протеолитических ферментов, выделение избытка свободных радикалов из митохондрий и повреждение ими микро- и астроглии, а также самих мотонейронов с их последующей дегенерацией [7, 13].

Ряд мутаций мтДНК увеличивает риск проявления расстройств аутистического спектра (РАС). Например, аутисты часто несут гетероплазматические мутации в непалимормфных участках митохондриального генома [18]. У детей с РАС в полтора раза больше несинонимичных мутаций (приводящих к замене аминокислот в кодируемом белке) и в 2.2 раза больше предполагаемых патогенных мутаций, чем у их здоровых братьев и сестер [19]. При биполярном расстройстве отмечается неэффективный энергетический гомеостаз в головном мозге, снижение митохондриального дыхания и внутриклеточного pH, изменения в митохондриальной морфологии, увеличение полиморфизма мтДНК, подавление молекул ядерной мРНК и белков, участвующих в митохондриальном дыхании, снижение жизнеспособности нейронов. Затрагивающая комплекс I дыхательной цепи мутация в транслокаторе адениновых нуклеотидов 1 может повышать риск развития биполярного расстройства за счет сложного взаимодействия между серотонином и функционированием митохондрий в структурах ЦНС [7].

Анализ биохимических и биосинтетических изменений клеток ЦНС при шизофрении демонстрирует морфологическую аберрацию митохондрий, нарушение окислительного фосфорилирования и регуляции экспрессии генов митохондриальных белков [7]. При шизофрении также уменьшено количество митохондрий в лобной коре, хвостом ядра и коре, снижена активность звеньев дыхательной цепи в лобной (комплекс IV) и височной коре (комплексы I, III и IV), а также в базальных ганглиях (комплексы I и III) головного мозга, что демонстрирует мульти-системный характер МД [20].

Среди основных заболеваний ЦНС с МД наиболее часто встречаются БА и БП, болезнь Гентингтона (БГ), БАС, синдром Ли, РАС, биполярное аффективное расстройство и шизофрения [21]. Например, синдром Ли (подострая некротизирующая энцефаломиелопатия) представляет собой прогрессирующее неврологическое заболевание, в результате которого поражается ствол головного мозга и базальные ганглии. Первыми симптомами являются потеря двигательных навыков, мышечная гипотония с плохим удержанием головы, повторная рвота и двигательные нарушения, затем развиваются пирамидные и экстрапирамидные нарушения, нистагм, нарушения дыхания, офтальмоплегия и периферическая нейропатия, иногда наблюдается эпилепсия [22]. Заболевание генетически гетерогенное и связано с

нарушением аэробного образования энергии, от дефектов пируватдегидрогеназного комплекса до нарушений окислительного фосфорилирования [23]. Биполярные расстройства — периодические аффективные нарушения, для которых характерна смена маниакальных и депрессивных эпизодов, в результате чего настроение и активность пациента нарушаются, что выражается в подъеме (мания или гипомания) или снижении (депрессия) [24]. Порядка 20% пациентов с МД имеют биполярное расстройство, а 0.38% пациентов с биполярным расстройством имеют мутации ДНК-полимеразы гамма (*POLG*), вызывающие МД [7].

Митохондриальные и неврологические дисфункции в моделях на грызунах

Необходимым условием разработки эффективной терапии заболеваний ЦНС с МД является понимание их патогенеза на биохимическом, клеточном и тканевом уровнях. Десятилетиями грызуны являются популярными модельными организмами для исследования патогенеза болезней ЦНС человека [13]. Например, для моделирования БА на грызунах важное значение имеет отображение патологических признаков возрастной нейродегенерации. Поэтому для изучения МД при спорадической БА широко используется линия преждевременно стареющих крыс OXYS, которые проявляют ускоренное старение мозга на фоне признаков БА — деструктивных изменений нейронов и их гибели, синаптической недостаточности, МД, гиперфосфорилирования тау-белка, повышенного накопления Аβ в мозге, а также расстройств поведения, обучения и памяти [25].

Модели мышей с усиленной экспрессией гена *DYRK1A* созданы для исследования эффективности действия препаратов, снижающих проявления признаков БА. Этот ген участвует в фосфорилировании белков, характерных для патогенеза БА [26]. Модель мышей Tg2576 создавалась для исследования терапевтические стратегий лечения БА [27]. У данных мышей сверхэкспрессирована мутантная форма гена *APP*, и отмечается образование амилоидных бляшек в раннем возрасте, а также другие нарушения ЦНС, сопровождающие БА — возрастные нарушения пространственного обучения, рабочей и аверсивной памяти [28]. Модель мышей APP23 характеризуется 7-кратной сверхэкспрессией мутантного человеческого *APP*, белка-предшественника амилоида человека [29]. У мышей развивается обширная патология Аβ уже в возрасте 6 месяцев. Амилоидные бляшки увеличиваются в размере и количестве с возрастом, накапливаясь в неокортексе и гиппокампе у 24-месячных мышей, окруженные активированной микроглией, астроцитами и дистрофическими нейритами, содержащими гиперфосфорилированный тау [30].

Генетические модели БП создавались путем модификации гена митохондриального фактора транскрипции А, продукт которого является активатором транскрипции и выполняет ряд функций в митохондриях, включая связывание с промотором мтДНК для активации митохондриальной транскрипции, обеспечение РНК-праймеров для облегчения репликации мтДНК, а также играет гистонподобную роль, покрывая мтДНК [13]. Кроме того, для моделирования БП используют ряд нейротоксинов — 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП), паракват, манеб, 6-гидроксидофамин и пестицидоаротенон [31].

Модель мышей MILON характеризуется МД и постнатальным нарушением окислительного фосфорилирования в нейронах переднего мозга. Мыши MILON были созданы для изучения эффектов мозаичного паттерна дикого типа и истощения мтДНК в нейронах переднего мозга. У них наблюдается снижение количества копий мтДНК в неокортексе, и животные умирают в течение 2–3 недель после начала заболевания на фоне дегенерации неокортекса и гиппокампа, дегенерации аксонов и глиоза [32]. У мышей MitoPark элиминирован ген *TFAM*, который кодируется в ядерном геноме, а его продукт транспортируется в митохондрии, где дей-

ствует как ДНК-связывающий белок, необходимый для транскрипции и поддержания мтДНК у млекопитающих. Этот ген кодируется в ядерном геноме, а TFAM транспортируется в митохондрии, где действует как ДНК-связывающий белок, необходимый для транскрипции и поддержания мтДНК у млекопитающих. Он стабилизирует мтДНК, регулирует число копий мтДНК *in vivo* и необходим для митохондриального биогенеза. У мышей MitoPark элиминация гена проявляется в виде медленного развития БП-подобного фенотипа в возрасте 12 недель, в том числе — внутриклеточных включений в дофаминергических нейронах, дегенерации дофаминовых путей, потери стриарного дофамина, дефицита моторики и дегенерации дофаминергических нейронов черной субстанции [33].

Нейротоксин МФТП при введении мышам превращается в ион N-метил-4-фенилпиридиния МПП+, позволяя моделировать ранние стадии БП за счет токсичности для дофаминергических нейронов стриатума и подавления комплекса I дыхательной цепи, что угнетает синтез АТФ и способствует накоплению свободных радикалов и гибели клеток [31]. Пестицид ротенон вызывает гибель дофаминергических нейронов в черной субстанции, повреждение протеасомной системы, белка DJ-1 и α -синуклеина, а также брадикинезию, ригидность мышц, нарушение осанки, скованность движений, характерную для БП [34]. Ингибиторы комплекса I и другие нейротоксины, такие как паракват, манеб, 6-гидроксидофамин (который также ингибирует митохондриальный комплекс IV и моноаминоксидазу) вызывает признаки БП у людей и экспериментальных животных [35].

Для исследования РАС применяют мышей с мутацией гена *DYRK1A* [26]. Ген *DYRK1A* кодирует киназу A, которая катализирует перенос фосфатной группы от АТФ на другие субстраты. У данных мышей наблюдаются значительные нарушения в обучении и когнитивной гибкости, коммуникативных ультразвуковых вокализациях и социальных контактах, а также повышенная восприимчивость к судорогам, вызванным гипертермией [26]. Мыши Ts65Dn обладают меньшим размером мозга ввиду снижения количества клеток в переднем мозге и являются генетической моделью синдрома Дауна. У них показана коррекция обучения и памяти путем воздействия на системы гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) и глутамата [36].

Для исследования БГ созданы мыши с замещением *HTT* на мутантный (*mhtt*)-knock-in) ген. У них отмечают биоэнергетический дефицит и МД с выраженной потерей веса при устойчивом потреблении калорий, увеличением лактата в коре и базальных ганглиях, снижением активности комплексов II и III, а также аконитазы в базальных ганглиях [37]. Фармакологическое моделирование БГ на мышах производится с использованием митохондриального токсина 3-нитропропионовой кислоты (3-NPA) и проявляется в виде прогрессирующей потери средних шипиковых нейронов в стриатуме, а также атрофии коры и дегенерации других отделов мозга на поздних стадиях заболевания [35].

Мыши с нокаутным геном *NDUFS4*, кодирующем субъединицу S4 комплекса I, демонстрируют фенотип синдрома Ли — быстро прогрессирующие нарушения походки, затрудненное дыхание и смерть к 7-недельному возрасту. Нейропатологические признаки включают дефицит комплекса I дыхательной цепи, спонгиоз, поражения обонятельных луковиц, мозжечка и вестибулярных ядер, сопровождающиеся прогрессирующей глиальной активацией и нейровоспалением [38]. Наблюдается облегчение патогенеза хронической гипоксией (11% кислорода), в том числе — увеличение продолжительности жизни, улучшение координации движений и снижение нейровоспаления [39].

Для исследования митохондриальной энцефаломии созданы нокаутные мыши, лишённые гена *RISP*, кодирующего каталитическую субъединицу комплекса III — железо-серный кластерный белок Риске. Исследования течения митохондриальной энцефалопатии на данной модели подтвердило дефицит комплекса III в ней-

ронах переднего мозга и высокий уровень окислительного стресса в оставшихся нейронах, особенно затрагивающий грушевидную кору. Для мышей при этой модели отмечалось быстрое прогрессирование заболевания с 2 мес., нарушения локомоции в ротароде и смерть к 3–3.5 мес. [40]. Еще одной моделью для исследования митохондриальной энцефалопатии стали мыши с нокаутом гена *COX10*, кодирующего вспомогательный белок, участвующий в сборке COX. Данная модель применялась для исследования уровня окислительного стресса в нейронах переднего мозга и, в отличие от мышей RISP нокаутов, плохие результаты в ротароде эти животные демонстрировали в 3 мес., доживая до 8–12 мес. (на фоне уязвимости поясной коры и окислительным стрессом в оставшихся нейронах) [40]. Табл. 1 суммирует некоторые модели МД и нарушений ЦНС на грызунах.

*Применение рыб зебраданио как модельного организма
для изучения нейробиологии митохондриальных дисфункций*

Выбор адекватного модельного организма критичен для трансляционности результатов доклинических исследований [45]. Благодаря особенностям своей генетики, анатомии и физиологии, одним из основных видов для нейробиологических и фармакологических исследований (наравне с грызунами) является небольшая пресноводная костная рыба зебраданио (zebrafish, *Danio rerio*) [46]. Нервная система зебраданио гомологична нервной системе человека, и многие белки мозга рыб имеют сходные с человеком паттерны экспрессии, связывания и сигналинга [47]. С точки зрения генетики, зебраданио являются хорошим модельным объектом, поскольку их геном полностью секвенирован [48], гены демонстрируют высокую степень синтении среди видов позвоночных и 70% из них имеют ортологи у человека [49]. Биологическими характеристиками зебраданио, делающими их привлекательным модельным объектом, являются малые размеры тела, быстрое развитие нервной системы в онтогенезе, раннее созревание, внешнее оплодотворение, развитие эмбрионов вне материнского организма [50] и хорошо описанный спектр поведенческих реакций [48]. Существуют и практические преимущества использования зебраданио в качестве модельного организма — они экономичны в содержании и легко поддаются разведению, что обеспечивает проведение массовых экспериментов и получение большого объема экспериментальных данных [51].

В целом, функционирование митохондрий у рыб и млекопитающих сходно, что позволяет экстраполировать многие результаты экспериментов с зебраданио на человека. Самое значительно различие митохондрий рыб и человека заключается в генетической организации мтДНК и яДНК. У человека мтДНК — небольшая кольцевая структура, в то время как у рыб она содержит значительно больше генов и способна на большую генетическую изменчивость в результате дупликации генома во время эволюции костистых рыб. Таким образом, у зебраданио специфические функции могут быть разделены между двумя дублированными генами, потеряны, нарушены для одного из генов или даже дополнены, если нарушена одна из двух копий. Тем не менее, в некоторых случаях дупликация увеличивают возможность получения информации о приобретении/утрате некоторых функций генов [52]. Существующие сходства и различия необходимо учитывать при применении рыб в качестве модельных организмов для изучения патогенеза заболеваний ЦНС человека.

Зебраданио применяются для изучения различных аспектов митохондриальной физиологии, например, динамики клеточной митохондриальной сети, митохондриального жизненного цикла и изменений мтДНК [53]. Для изучения изменений митохондриальной морфологии в режиме реального времени используются трансгенные модели зебраданио, экспрессирующие митохондрио-специфические флуоресцентные белки [54]. С целью изучения “жизненного цикла” митохондрий и их дина-

Таблица 1. Модели дисфункций ЦНС на грызунах, связанные с нарушением митохондриальных функций

Название линии	Моделируемое заболевание	Ген	Моделируемое состояние	Патологический фенотип	Применение в исследованиях	Источник
DYRK1A	Расстройство аутистического спектра (РАС)	<i>DYRK1A</i> мутация сдвига рамки считывания	Нарушение обучения, ультразвуковых vocalizations и социальный контактов, повышение судорожной чувствительности	Галлонедостаточность по <i>DYRK1A</i> , дисморфология, когнитивные и неврологические	Изучение механизмов, приводящих к РАС, задержка речи и фебрильным припадкам	[26]
Ts65Dn	Синдром Дауна	Сегментарная трисомия 16	Фенотипы синдрома Дауна, включая поведенческие и когнитивные нарушения	Уменьшение мозга за счет снижения числа нейронов в переднем мозге. Нарушение синаптической пластичности и нейрогенеза, моторная дисфункция и возрастная хроническая нейродегенерация	Корректирующее воздействие препаратов, исследование физиологии систем органов чувств и активности мозга при синдроме Дауна, а также генной структуры и развития патологии	[36] [41]
Tg2576	Болезнь Альцгеймера (БА)	<i>APP</i> KM670/671NL	Синаптические и когнитивные дефекты на ранних стадиях заболевания, накопление амилоидных бляшек по мере их прогрессирования	Нормальное развитие, к 11–13 мес. когнитивные нарушения, образование многочисленных паренхиматозных бляшек, прогрессирующее ухудшение когнитивных процессов	Течение БА для анализа патологической физиологии и поиска новых терапевтических мишеней	[27]
APP23	БА	Ген <i>APP</i> KM670/671NL Ген <i>PSEN1</i> : deltaE9	Синаптические и когнитивные дефекты на поздних стадиях развития заболевания после начала отложения бляшек	Видимое отложение бляшек формируется в возрасте 6 месяцев и особенно в 18 месяцев	Разработка терапевтических стратегий для лечения БА	[42]
MILON	БП		Нейродегенерация вследствие нарушений в комплексе I дыхательной цепи	Быстро прогрессирующая митохондриальная дегенерация и гибель клеток в гипоталамусе и неокортексе с 5-го месяца, постнатальное нарушение окислительного фосфорилирования в нейронах переднего мозга, снижение уровня мтДНК с 2- и мтРНК с 4-месячного возраста	Исследование роли дефицита дыхательной цепи в нейродегенерации и старении	[32]

Таблица 1. Окончание

Название линии	Моделируемое заболевание	Ген	Моделируемое состояние	Патологический фенотип	Применение в исследованиях	Источник
MitoPark	Болезнь Паркинсона (БП)		Дефицит моторики, истощение дофамина и дегенерация компактной черной субстанции	Воспроизводство ряда симптомов БП в результате отсутствия митохондриального фактора транскрипции <i>Tfam</i> в дофаминергических нейронах среднего мозга	Исследование медленного и прогрессирующего развития БП с возраста 12 нед.	[43]
NDUFS4	Синдром Ли	<i>NDUFS4</i> (нокаут)	Патологическая картина синдрома с типичными соматическими проявлениями	Отсутствует убихиноноксидоредуктаза. У мышей происходят быстро прогрессирующие нарушения походки, затрудненное дыхание и смерть к возрасту 7 нед.	Изучение патофизиологических механизмов синдрома (спонгиоз обонятельной луковицы, мозжечка и вентилулярных ядер сопровождается нейровоспалением), исследование влияния хронической гипоксии для облегчения лечения заболевания	[38]
RISP-KO	Митохондриальная энцефалопатия	<i>RISP</i> (нокаут)	Нарушение в комплексе III дыхательной цепи	Отсутствие в комплексе III железосерного кластерного белка Рискс. быстрое прогрессирующее нейродегенерации с 2 мес., смерть в возрасте 3–3,5 мес.	Исследование специфических эффектов на нейроны переднего мозга	[40]
COX10-KO	Митохондриальная энцефалопатия	<i>COX10</i> (нокаут)	Нарушение в комплексе IV дыхательной цепи	Отсутствие вспомогательного белка, участвующего в сборке COX. Мыши доживают до 8–12 мес. с уязвимостью поясной коры и окислительным стрессом в мозге	Исследование уровня окислительного стресса в нейронах переднего мозга	[40]
OXYS (крысы)	БА		Раннее старение и связанная с ним нейродегенерация	Преждевременное старение (ускоренная инволюция тимуса, гипертрофическая кардиомиопатия миокарда и другие) с ранним развитием катаракты (в возрасте 6 мес.)	Изучение нейродегенеративных процессов, связанных со старением, в частности, роли окислительного стресса в мозге	[44]

мики в нейронах созданы трансгенные зебраданио с использованием Gal4/UAS, который позволяет экспрессировать меченые митохондрии [55]. Линии зебраданио с флуоресцентно меченными митохондриями используются для изучения митохондриального транспорта, связанного с неврологическими заболеваниями в сенсорных нейронах Рохона—Беарда, ганглиозных клетках сетчатки, моторных и дофаминергических нейронах [54]. Также оптимизирована прямая визуализация митохондрий, анализ их жизни и функции в аксонах задней боковой линии зебраданио [56].

Наконец, исследовать окислительный стресс у рыб можно путем отслеживания образования АФК окислительным флуоресцентным красителем дигидрородамином-123 (DHR-123) [57]. Разработан логотметрический двухфотонный флуоресцентный зонд (Mito-MQ) для измерения уровня цистеина и гомоцистеина в митохондриях *in vivo* на 5-дневных личинках зебраданио [58]. Эмбрионы зебраданио позволяют оценить мтДНК на разных стадиях развития и пространственную экспрессию генов, регулирующих биогенез мтДНК и комплексов дыхательной цепи [59]. Таким образом, данные модели служат отправной точкой для проведения дальнейших исследований функционирования митохондрий в нормальном и патологическом состоянии ЦНС зебраданио.

Существует целый ряд моделей связанных с МД расстройств ЦНС на зебраданио. Например, нокдаун гена *NDUFAF7* у зебраданио применен для исследования влияния экспрессии этого гена на сборку комплекса I. Нарушения в его работе обуславливают снижение внутриклеточных АФК и АТФ и коррелируют с патологической миопией. У зебраданио также зафиксирована задержка выплывания и морфологические аномалии — дефекты развития энтодермы, сердечной функции и плавательного поведения из-за мутаций в гене *COXV* и *SURF1* (структурного компонента COX и фактора его сборки соответственно). Мутации гена *COA6*, чья функция заключается в регуляции пути транспорта меди, у модельных рыб провоцируют пороки развития сердца. Перечисленные мутации являются моделью классического синдрома Ли, фатального дефицита COX у детей, а также гипертрофической кардио- и миопатии [60].

Xavier — линия рыб с инактивированным геном *ETFDH*, который кодирует убихинон-оксидоредуктазу — электрон-транспортный флавопротеин, обеспечивающий перенос электронов с различных дегидрогеназ в дыхательную цепь. У модельных рыб инактивация гена приводит к тяжелым метаболическим нарушениям — измененному энергетическому обмену, нарушению регуляции продукции АФК, увеличенному аэробному гликолизу, дефектам подвижности, аномальному формированию глиального паттерна, снижению ветвления моторных аксонов и числа нервно-мышечных синапсов [57]. Линия *scn1Lab* создана для исследования синдрома Драве — тяжелой генетической формы эпилепсии, связанной с мутациями гена *SCN1A*, кодирующего субъединицу натриевого канала. У рыб-мутантов наблюдается повышенная судорожная активность и ускоренный гликолиз. Снижение активности комплекса I вызвано окислительным стрессом и посттрансляционной окислительной модификацией, провоцируя судороги [61].

Линия зебраданио с нокаутом по гену *PINK1* применяется для изучения БП. *PINK1* кодирует митохондриальную серин/треонинкиназу, нейропротекторный белок, способствующий очищению поврежденных митохондрий посредством аутофагии. У модельных рыб наблюдаются МД и потеря дофаминергических нейронов. Данная линия использована для разработки нового класса стресс-зависимых препаратов, стимулирующих аутофагию, для предотвращения потери дофаминергических нейронов в модели зебраданио с БП [62].

Зебраданио с нокдауном гена *MFN2* применяются для изучения двух наследственных нейродегенеративных заболеваний человека — аксональной периферической невропатии и доминантной атрофии зрительного нерва [63]. *MFN2* кодирует

митохондриальный мембранный белок митофузин-2 — трансмембранную ГТФ-азу, который участвует в слиянии митохондрий. У рыб с мутацией *MFN2* отмечается незначительное изменение структуры митохондриальной сети, но значительные двигательные нарушения или отсутствие реакции на прикосновение. Выявлено генерализованное нарушение аксональной структуры первичных двигательных нейронов, сопровождающееся наличием укороченных или отсутствующих аксонов, измененным распределением ацетилхолиновых рецепторов с уменьшением количества и размеров их скоплений [64].

Зебраданию с мутацией в гене *KIF5A* моделируют фенотип аксональной периферической невропатии. *KIF5A* кодирует белок, который относится к суперсемейству белков кинезинов, они входят в состав мультисубъединичного комплекса, отвечающего за перемещение органелл по микротрубочкам. Зебраданию с мутацией *KIF5A* демонстрируют смертность личинок и сенсомоторный дефицит, повышенную возбудимость, периферическую полинейропатию и аксональную дегенерацию [65]. Зебраданию с мутацией гена *SLC25A1* моделируют врожденный миастенический синдром или более тяжелую комбинированную D-2- и L-2-гидроксиглутаровую ацидурию [53]. Белок *SLC25A1* является переносчиком митохондриального цитрата, который опосредует обмен митохондриального цитрата/изоцитрата на цитозольный малат, участвует в биосинтезе жирных кислот и стеролов, глюконеогенезе и гликолизе, поддержании целостности хромосом и регуляции аутофагии [66]. Модель зебраданию с нокаутом двух ортологов *SLC25A1* демонстрирует характерные черты миастенического синдрома — отек заднего мозга, сердца, желточного мешка и хвоста, аномальное развитие сердца со сниженным притоком крови к хвосту (при тяжелых фенотипах), измененная морфология хвоста, нарушение плавания и избегание прикосновения. Отмечается нарушение в структуре синапсов двигательных аксонов и мышечных волокон, проявляющееся в виде отростков от окончаний двигательных аксонов без полного формирования синапса [67].

Мутации в гене *OPA3* у зебраданию моделируют нейроофтальмологическое заболевание человека — синдром Костеффа, характеризующееся повышенной экскрецией с мочой 3-метилглутаконовой и 3-метилглутаровой кислот, ранним началом атрофии зрительного нерва и более поздним появлением спастичности и экстрапирамидных признаков [68]. Ген кодирует белок *OPA3*, функция которого связана с транспортом липидов митохондрий и формированием их структуры. При моделировании мутации гена у зебраданию отмечается повышение уровня 3-метилглутаконовой кислоты. У рыб не наблюдается характерные для патогенеза потеря зрения, гиперрефлексия и спастичность, но проявляются пенетрантное поведение, напоминающее атаксию и экстрапирамидные (брадикинезия) признаки, наблюдаемые при синдроме Костеффа [69].

Нарушения комплекса пируватдегидрогеназы (PDHC) моделируются на зебраданию для исследования тяжелых заболеваний детей — врожденного молочнокислого ацидоза, задержки роста и синдрома Ли. PDHC представляет собой мультиферментный комплекс митохондриального матрикса, который катализирует необратимое превращение пирувата в ацетильную форму коэнзима А и играет центральную роль в связывании гликолиза с циклом трикарбоновых кислот и путями липогенеза [53]. Спонтанные мутации зебраданию с дефицитом PDHC демонстрирует фенотипы, сходные с человеческими, отмечаются аномалии сетчатки, дефекты синаптической передачи и светоадаптации в колбочках, преждевременная смерть, вялость, расширенные меланофоры, исчезновение пищевого поведения. При этом отмечается нормализация состояния моделей зебраданию при введении кетогенной диеты, сходной с общепринятой терапией, предложенной для детей с дефицитом PDHC [52].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Число выявленных мутаций, связанных с МД в ЦНС, продолжает расти благодаря использованию секвенирования нового поколения в диагностике неврологических заболеваний человека [70]. Зебраданию сегодня активно применяются в качестве генетических и фармакологических моделей различных МД при заболеваниях ЦНС, включая БП, БА, БГ, БАС, синдром Ли и РАС. Большое количество новых генотипов и созданных линий зебраданию, новые инструменты, разработанные для анализа скорости и эффективности процессов и состояния генетического материала митохондрий у зебраданию, в сочетании с использованием систем редактирования генома, позволили прояснить роль конкретных генов, участвующих в МД и неврологических расстройствах, и их связь с болезнями человека.

Дальнейшее исследование связи МД с заболеваниями ЦНС имеет важное значение по ряду причин. Во-первых, выявление эволюционно-консервативных механизмов, ответственных за МД в мозге, позволяет лучше понять патогенез данной группы неврологических заболеваний. Моделирование данных состояний на животных и изучение процессов, сопровождающих МД на клеточном и биохимическом уровнях, позволит понять причину и последовательность патологических процессов, выявить мишени для лекарственной протекции, а также разработать препараты, направленные на предупреждение нарушений и восстановление функций митохондрий.

Другой важной задачей моделирования патофизиологии ЦНС на животных является преодоление разрыва между данными, полученными в ходе доклинических экспериментов и реальными пациентами. Как с любым другим модельным организмом, применение рыб для исследования патологий ЦНС человека имеет ряд ограничений. Одним из таких ограничений является филогенетическое: нервная система рыб в сравнении с млекопитающими устроена более просто, что может препятствовать изучению ряда сложных процессов, присущих высшим организмам [45]. Еще одна особенность возникает в связи с разошедшимися у рыб и млекопитающих эволюционными путями, в частности, с дупликацией генома, характерной для всех костных рыб [52]. Например, у зебраданию наблюдается два паралога гена белка HIF-1 α (фактор 1, индуцируемый гипоксией), который синтезируется в ответ на гипоксический стресс и участвует в регуляции функционирования митохондрий. При этом их функции несколько различаются, Hif-1 α регулирует активность митохондриального комплекса II, а Hif-1 β регулирует работу комплексов I, III и IV [71]. Для МД также характерна гетерогенная природа, при которой одна мутация может проявляться разными фенотипами [72]. В данном случае дупликация генома зебраданию может привести дополнительные вариации в фенотипические проявления при моделировании заболеваний.

Как и на любом модельном организме, на рыбах невозможно моделировать ряд патологий ЦНС человека [45]. Необходимо также учитывать особенности и ограничения, связанные с высоким уровнем нейрорегенерации у зебраданию [73]. Так, поскольку к болезням, связанным с МД, относится ряд нейродегенеративных заболеваний, при использовании зебраданию для оценки их терапии могут возникнуть сложности с различением терапевтического эффекта и базального уровня нейрорегенерации. К тому же открытым остается вопрос о том, насколько подходят для изучения нейродегенеративных заболеваний животные, у которых в естественной среде они не наблюдаются. Поэтому для глубокого понимания этиологии патологий ЦНС и разработки лечения необходимы комплексные исследования, использующие несколько модельных организмов и формирующие значительную базу экспериментальных данных.

Таблица 2. Некоторые открытые вопросы в области исследований митохондриальных дисфункций

Открытые вопросы
• Гетерогенная природа митохондриальных дисфункций (МД) значительно осложняет диагностику заболеваний. Какие новые подходы диагностики можно разработать и какие дополнительные маркеры использовать? • Одна и та же мутация мтДНК может вызвать разные фенотипические проявления МД. Как можно преодолеть эту проблему при создании экспериментальных генетических моделей? • Каков механизм взаимосвязи между МД и развитием болезни Альцгеймера (БА)? • В 95% случаев встречается спорадическая форма БА, однако на зебраданио разработаны в основном генетические модели БА. Можно ли создать негенетическую модель БА для изучения роли МД при развитии болезни? • Можно ли создать фармакологические модели МД на зебраданио на основе мышинных моделей, например, с помощью ингибиторов комплекса I? • Насколько в целом животные, у которых в естественных условиях не встречается нейродегенерация, подходят для изучения данных заболеваний, в особенности зебраданио, у которых также наблюдается высокий уровень нейрорегенерации? • Показано, что гипоксия способствует улучшению состояния генетической мышинной модели синдрома Ли [74]. Будет ли распространяться подобный эффект на другие МД? Может ли гипоксия рассматриваться в качестве терапевтической стратегии, учитывая ее самостоятельный негативный эффект? • Какова взаимосвязь между лизосомальной и МД при БП [75]? • Известно, что расстройства аутистического спектра (РАС) имеют очень разнообразный патогенез, но описаны только некоторые механизмы взаимосвязи РАС и окислительно-го стресса [76]. Какие дополнительные механизмы связи между РАС и МД существуют? • Известно, что на развитие некоторых болезней (например, БА) влияет образ жизни [76]. Вносит ли образ жизни значимый вклад в развитие других болезней, ассоциированных с МД? • Может ли изменение образа жизни рассматриваться в качестве терапевтической стратегии для таких заболеваний? • Можно ли подобрать универсальную терапевтическую мишень, воздействие на которую хотя бы частично облегчит протекание заболеваний, связанных с митохондриальными дисфункциями? • Предполагается, что МД тесно связана с воспалительным процессом в патогенезе РАС [78]. Может ли использование противовоспалительных агентов рассматриваться в качестве терапевтической стратегии в данном случае? Может ли использоваться такая стратегия в случае других заболеваний, связанных с МД? • Каков вклад МД глии (микроглии и астроцитов) в патогенез заболеваний ЦНС?

Дальнейшие исследования МД в ЦНС могут быть ориентированы на несколько различных аспектов — уточнение роли митохондрий в реализации функций клеток мозга, изучение механизма МД при различных заболеваниях ЦНС на моделях зебраданио, разработка и доклинические испытания новых терапевтических средств для коррекции патологических состояний, а также оценка роли микроглии и астроцитов при МД в мозге. Для определения роли митохондрий в функционировании ЦНС необходимо отслеживание изменений в энергетическом балансе клеток, метаболизме и связанных с этим генных и эпигенных факторов. Также необходимо и более глубокое изучение самих МД в мозге. Так, активно исследуются нарушения окислительного фосфорилирования, изменения в структурных компонентах митохондрий (внутренней и внешней мембранах, матриксе), генетические нарушения со стороны мтДНК или яДНК и их взаимодействие, а также связь патологических изменений морфологии митохондрий с нарушением функций нервных клеток.

Также важно исследовать роль МД в патогенезе заболеваний ЦНС, связанных со старением (БП, БА, БАС и другие), для чего необходимо моделирование этих

заболеваний *in vivo*. С учетом активных исследований в данном направлении можно в скором времени ожидать получение более полной картины патогенеза многих заболеваний и переход к формированию методик их профилактики и лечения, в том числе препаратов, генной терапии или других методов, направленных на восстановление функции митохондрий. Наконец, существует ряд заболеваний ЦНС человека, которые еще не были смоделированы на зебраданио, и поэтому создание новых генетических и фармакологических моделей МД для изучения механизмов заболеваний ЦНС также необходимо (табл. 2). Понимание биоэнергетических и биосинтетических процессов, происходящих в митохондриях как в норме, так и при различных патологиях, является необходимым условием для поиска мишеней терапевтического воздействия. Модели МД на зебраданио подобраны не для всех заболеваний, и поэтому создание на рыбах новых моделей является одним из критичных направлений исследований патогенеза широкого спектра болезней ЦНС.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит исследований с использованием животных или участием людей в качестве объектов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Настоящая работа поддержана субсидией Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-10-2021-093). Коллаборация А.В.К. поддержана средствами Санкт-Петербургского государственного университета (проект 93020614).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликтов интересов, связанных с публикацией.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея статьи (А.В.К.), подготовка черновика статьи (Л.В.Ю., М.М.К.), редактирование и подготовка финальной версии (А.В.К., Л.В.Ю., Т.В.В., М.М.К.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Murali Mahadevan H, Hashemiaghdam A, Ashrafi G, Harbauer AB* (2021) Mitochondria in Neuronal Health: From Energy Metabolism to Parkinson's Disease. *Adv Biol* 5(9): e2100663. <https://doi.org/10.1002/adbi.202100663>
2. Физиология человека с основами патофизиологии (2019) в 2 т. Т 1 под ред *РФ Шмидта, Ф Ланга, М Хекманна*; пер с нем под ред МА Каменской. М. Лаборатория знаний. [Human physiology with the basics of pathophysiology (2019) in 2 vol. Vol 1 eds *RF Schmidt, F Lang, M Heckmann*; translation from German edited by MA Kamenskaya. M. Knowledge Laboratory. (In Russ)].
3. *Johnson, J, Mercado-Ayon E, Mercado-Ayon Y, Dong YN, Halawani S, Ngaba L, Lynch DR* (2021) Mitochondrial dysfunction in the development and progression of neurodegenerative diseases. *Arch Biochem Biophys* 702: 108698. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108698>
4. *Knedlik T, Giacomello M* (2022) Mitochondria and Central Nervous System Disorders. *Biomolecules* 12(10): 1414. <https://doi.org/10.3390/biom12101414>
5. *Finsterer J* (2012) Cognitive dysfunction in mitochondrial disorders. *Acta Neurol Scand* 126(1): 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2012.01649.x>
6. 9C40.8 — наследственная оптическая нейропатия 2023 <https://mkb11.online/107396>
7. *Socolik O, Prozorova G* (2022) Analysis of significance of mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of diseases of the central nervous system. *Neurosci Res Notes* 5 (3): 1–10. <https://doi.org/10.3117/neuroscirn.v5i3.151>

8. *Lax NZ, Gorman GS, Turnbull DM* (2017) Review: Central nervous system involvement in mitochondrial disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 43(2): 102–118.
<https://doi.org/10.1111/nan.12333>
9. *DiMauro S, Schon EA* (2003) Mitochondrial respiratory-chain diseases. *New Eng J Med* 348(26): 2656–2668.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra022567>
10. *Klopstock T, Priglinger C, Yilmaz A, Kornblum C, Distelmaier F, Prokisch H* (2021) Mitochondrial Disorders. *Deutsches Arzteblatt Intl* 118(44): 741–748.
<https://doi.org/10.3238/arztebl.m2021.0251>
11. *Li D, Liang C, Zhang T, Marley JL., Zou W, Lian M, Ji D* (2022) Pathogenic mitochondrial DNA 3243A>G mutation: From genetics to phenotype. *Front Gen* 13: 951185.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2022.951185>
12. *Зарипов С, Маматов Ж, Касимов А, Мамурова М* (2023) Нарушение функции митохондрий при нейродегенеративных заболеваниях (литературный обзор). *Евраз журн академ исследован* 3(6 Part 3): 169–177. [*Zaripov S, Mamatov Zh, Kasimov A, Mamurova M* (2023) Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases (literature review). *Euras J Acad Res* 3(6 Part 3): 169–177. (In Russ)].
<https://in-academy.uz/index.php/ejar/article/view/18388>
13. *Johri A, Beal MF* (2012) Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *J Pharm Exper Ther* 342(3): 619–630.
<https://doi.org/10.1124/jpet.112.192138>
14. *Du T, Wang L, Liu W, Zhu G, Chen Y, Zhang J* (2021) Biomarkers and the Role of α -Synuclein in Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci* 13: 645996.
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.645996>
15. *Zhou C, Huang Y, Przedborski S* (2008) Oxidative stress in Parkinson's disease: a mechanism of pathogenic and therapeutic significance. *Ann N Y Acad Sci* 1147: 93–104.
<https://doi.org/10.1196/annals.1427.023>
16. *Víctor VM, Espulgues JV, Hernández-Mijares A, Rocha M* (2009) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis: a potential therapy with mitochondria-targeted antioxidants. *Infectious Disord Drug Targets* 9(4): 376–389.
<https://doi.org/10.2174/187152609788922519>
17. *Maurel C, Dangoumau A, Marouillat S, Brulard C, Chami A, Hergesheimer R, Corcia P, Blasco H, Andres CR, Vourc'h P* (2018) Causative Genes in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Protein Degradation Pathways: a Link to Neurodegeneration. *Mol Neurobiol* 55(8): 6480–6499.
<https://doi.org/10.1007/s12035-017-0856-0>
18. *Rose S, Niyazov DM, Rossignol DA, Goldenthal M, Kahler SG, Frye RE* (2018) Clinical and Molecular Characteristics of Mitochondrial Dysfunction in Autism Spectrum Disorder. *Mol Diagn Ther* 22(5): 571–593.
<https://doi.org/10.1007/s40291-018-0352-x>
19. *Frye RE* (2020) Mitochondrial Dysfunction in Autism Spectrum Disorder: Unique Abnormalities and Targeted Treatments. *Sem Ped Neurol* 35: 100829.
<https://doi.org/10.1016/j.spen.2020.100829>
20. *Roberts RC* (2021) Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: With a focus on postmortem studies. *Mitochondrion* 56: 91–101.
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.11.009>
21. Международная классификация болезней 11-го пересмотра (МКБ-11).
<https://mkb11.online/>
22. МКБ-11 5C53.24 — Синдром Ли
<https://mkb11.online/104842>
23. *Rahman S* (2023) Leigh syndrome. *Handbook Clin Neurol* 194: 43–63.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821751-1.00015-4>
24. 6A6 Биполярное и сходные расстройства.
<https://mkb11.online/105462>
25. *Ashleigh T, Swerdlow RH, Beal MF* (2023) The role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease pathogenesis. *Alzheimer's Dement* 19(1): 333–342.
<https://doi.org/10.1002/alz.12683>
26. *Raveau M, Shimohata A, Amano K, Miyamoto H, Yamakawa K* (2018) DYRK1A-haploinsufficiency in mice causes autistic-like features and febrile seizures. *Neurobiol Dis* 110: 180–191.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.12.003>
27. RESEARCH MODELS Tg2576. AlzForum Foundation Inc.
<https://www.alzforum.org/research-models/tg2576>
28. *LaFerla FM, Green KN* (2012) Animal models of Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Persp Med* 2(11): a006320.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006320>

29. *Van Dam D, Vloeberghs E, Abramowski D, Staufenbiel M, De Deyn PP* (2005) APP23 mice as a model of Alzheimer's disease: an example of a transgenic approach to modeling a CNS disorder. *CNS Spectrums* 10(3): 207–222.
<https://doi.org/10.1017/s1092852900010051>
30. RESEARCH MODELS APP23. AlzForum Foundation Inc.
<https://www.alzforum.org/research-models/app23>
31. *Куликова ОИ, Федорова ТН, Орлова ВС* (2019) Моделирование болезни Паркинсона с помощью экзогенных нейротоксинов (обзор литературы). *Токсикол вестн* 2(155): 9–15. [*Kulikova OI, Fedorova TN, Orlova VS* (2019) Modeling of Parkinson's disease using ekzogen-nyh nejrotoksinov (obzor literature). *Toksikol Vestn* 2(155): 9–15. (In Russ)].
<https://api.semanticscholar.org/CorpusID:182374837>
32. *Sörensen L, Ekstrand M, Silva JP, Lindqvist E, Xu B, Rustin P, Olson L, Larsson NG* (2001) Late-onset corticohippocampal neurodepletion attributable to catastrophic failure of oxidative phosphorylation in MILON mice. *J Neurosci* 21(20): 8082–8090.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-20-08082.2001>
33. *Galter D, Pernold K, Yoshitake T, Lindqvist E, Hoffer B, Kehr J, Larsson NG, Olson L* (2010) MitoPark mice mirror the slow progression of key symptoms and L-DOPA response in Parkinson's disease. *Genes Brain Behav* 9(2): 173–181.
<https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2009.00542.x>
34. *Innos J, Hickey MA* (2021) Using Rotenone to Model Parkinson's Disease in Mice: A Review of the Role of Pharmacokinetics. *Chem Res Toxicol* 34(5): 1223–1239.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.0c00522>
35. *Ставровская АВ, Воронков ДН, Ольшанский АС, Гущина АС, Ямщикова НГ* (2021) Взаимосвязь локализации повреждений дофаминовой иннервации стриатума и их поведенческих проявлений на 6-гидроксидофамин-индуцированной модели паркинсонизма у крыс. *Анналы клин экспер неврол* 15(2): 42–49. [*Stavrovskaya AV, Voronkov DN, Olshansky AS, Gushchina AS, Yamshikova NG* (2021) The relationship between the location of a lesion in the striatal dopaminergic innervation and its behavioral manifestation in a 6-hydroxydopamine-induced model of Parkinson's disease in rats. *Ann Clin Experim Neurol* 15(2): 42–49. (In Russ)].
<https://doi.org/10.25692/ACEN.2021.2.6>
36. *Scott-McKean JJ, Chang B, Hurd RE, Nusinowitz S, Schmidt C, Davisson MT, Costa AC* (2010) The mouse model of Down syndrome Ts65Dn presents visual deficits as assessed by pattern visual evoked potentials. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51(6): 3300–3308.
<https://doi.org/10.1167/iovs.09-4465>
37. *Browne SE, Ferrante RJ, Beal MF* (1999) Oxidative stress in Huntington's disease. *Brain Pathol* 9(1): 147–163.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1999.tb00216.x>
38. *Grillo AS, Bitto A, Kaeberlein M* (2021) The NDUFS4 Knockout Mouse: A Dual Threat Model of Childhood Mitochondrial Disease and Normative Aging. *Methods Mol Biol* 2277: 143–155.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1270-5_10
39. *Ferrari M, Jain IH, Goldberger O, Rezoagli E, Thoonen R, Cheng KH, Sosnovik DE, Scherrer-Crosbie M, Mootha VK, Zapol WM* (2017) Hypoxia treatment reverses neurodegenerative disease in a mouse model of Leigh syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(21): E4241–E4250.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1621511114>
40. *Anwar MR, Saldana-Caboverde A, Garcia S, Diaz F* (2018) The Organization of Mitochondrial Supercomplexes is Modulated by Oxidative Stress In Vivo in Mouse Models of Mitochondrial Encephalopathy. *Int J Mol Sci* 19(6): 1582.
<https://doi.org/10.3390/ijms19061582>
41. Research models Ts65Dn. AlzForum Foundation Inc.
<https://www.alzforum.org/research-models/ts65dn>
42. Research models APP23 x PS1-R278I. AlzForum Foundation Inc.
<https://www.alzforum.org/research-models/app23-x-ps1-r278i>
43. *Ekstrand MI, Galter D* (2009) The MitoPark Mouse – an animal model of Parkinson's disease with impaired respiratory chain function in dopamine neurons. *Parkinson Relat Disords* 15 Suppl 3: S185–S188.
[https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(09\)70811-9](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(09)70811-9)
44. *Kolosova NG, Stefanova NA, Korbolina EE, Fursova AZh, Kozhevnikova OS* (2014) A genetic model of premature aging and age-related diseases. *Adv Gerontol* 4: 294–298.
<https://doi.org/10.1134/S2079057014040146>
45. *Макарова МН, Матицин АА, Матицина АА, Макаров ВГ* (2022) Принципы выбора животных для научных исследований. Сообщение 1. Выбор модельных организмов на основании филогенетических связей. *Лаб животные для научн исследований* 2: 58–70. [*Makarova MN, Matichin AA, Maticina AA, Makarov VG* (2022) Animal choice strategy for research. Report 1:

- animal choice based on phylogenetic relationships. *Lab Animals for Sci* 2: 58–70. (In Russ)].
<https://doi.org/10.29296/2618723X-2022-02-07>
46. *de Abreu MS, Demin KA, Kotova MM, Mirzaei F, Shariff S, Kantawala B, Zakharchenko KV, Kolesnikova TO, Dilbaryan K, Grigoryan A, Yenkovyan KB, Kalueff AV* (2023) Developing Novel Experimental Models of m-TORopathic Epilepsy and Related Neuropathologies: Translational Insights from Zebrafish. *Int J Mol Sci* 24(2): 1530.
<https://doi.org/10.3390/ijms24021530>
 47. *Panula P, Chen YC, Priyadarshini M, Kudo H, Semenova S, Sundvik M, Sallinen V* (2010) The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. *Neurobiol Dis* 40(1): 46–57.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.05.010>
 48. *Калыев АВ* (2022) Принципы моделирования заболеваний мозга и их терапии на зебра-дании (zebrafish). *Обзоры клин фармакол и лекарств терапии* 20(2): 119–122. [*Kalueff AV* (2022) Principles of modeling brain diseases and their therapy based on zebrafish studies. *Rev Clin Pharmacol Drug Therapy* 20(2): 119–122. (In Russ)].
<https://doi.org/10.17816/RCF202119-122>
 49. *Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, Collins JE, Humphray S, McLaren K, Matthews L, McLaren S, Sealy I, Caccamo M, Churcher C, Scott C, Barrett JC, Koch R, Rauch GJ, White S, Chow W, Stemple DL* (2013) The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496(7446): 498–503.
<https://doi.org/10.1038/nature12111>
 50. *Кротова НА, Лакстыгал АМ, Таранов АС, Ильин НП, Бытов МВ, Волгин АД, Амстиславская ТГ, Демин КА, Калыев АВ* (2019) Зебраданио (zebrafish) как новая перспективная модель в трансляционной нейробиологии. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 105: 1417–1435. [*Krotova NA, Lakstygala AM, Taranov AS, Ilyin NP, Bytov MV, Volgin AD, Amstislavskaya TG, Demin KA, Kalueff AV* (2019) Zebrafish as a new promising model in translational neuroscience. *Russ J Physiol* 105: 1417–1435. (In Russ)].
<https://doi.org/10.1134/S0869813919110062>
 51. *Wang J, Cao H* (2021) Zebrafish and Medaka: Important Animal Models for Human Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci* 22(19): 10766.
<https://doi.org/10.3390/ijms221910766>
 52. *Taylor JS, Braasch I, Frickey T, Meyer A, Van de Peer Y* (2003) Genome duplication, a trait shared by 22000 species of ray-finned fish. *Genome Res* 13(3): 382–390.
<https://doi.org/10.1101/gr.640303>
 53. *Fichi G, Naef V, Barca A, Longo G, Fronte B, Verri T, Santorelli FM, Marchese M, Petruzzella V* (2019) Fishing in the Cell Powerhouse: Zebrafish as A Tool for Exploration of Mitochondrial Defects Affecting the Nervous System. *Int J Mol Sci* 20(10): 2409.
<https://doi.org/10.3390/ijms20102409>
 54. *Drerup CM, Herbert AL, Monk KR, Nechiporuk AV* (2017) Regulation of mitochondria-dynactin interaction and mitochondrial retrograde transport in axons. *eLife* 6: e22234.
<https://doi.org/10.7554/eLife.22234>
 55. *Halpern ME, Rhee J, Goll MG, Akitake CM, Parsons M, Leach SD* (2008) Gal4/UAS transgenic tools and their application to zebrafish. *Zebrafish* 5(2): 97–110.
<https://doi.org/10.1089/zeb.2008.0530>
 56. *Mandal A, Pinter K, Drerup CM* (2018) Analyzing Neuronal Mitochondria in vivo Using Fluorescent Reporters in Zebrafish. *Front Cell Dev Biol* 6: 144.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00144>
 57. *Song Y, Selak MA, Watson CT, Coutts C, Scherer PC, Panzer JA, Gibbs S, Scott MO, Willer G, Gregg RG, Ali DW, Bennett MJ, Balice-Gordon RJ* (2009) Mechanisms underlying metabolic and neural defects in zebrafish and human multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MADD). *PloS One* 4(12): e8329.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008329>
 58. *Yue P, Yang X, Ning P, Xi X, Yu H, Feng Y, Shao R, Meng X* (2018) A mitochondria-targeted ratiometric two-photon fluorescent probe for detecting intracellular cysteine and homocysteine. *Talanta* 178: 24–30.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.08.085>
 59. *Artuso L, Romano A, Verri T, Domenichini A, Argenton F, Santorelli FM, Petruzzella V* (2012) Mitochondrial DNA metabolism in early development of zebrafish (*Danio rerio*). *Biochim Biophys Acta* 1817(7): 1002–1011.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabo.2012.03.019>
 60. *Zurita Rendón O, Silva Neiva L, Sasarman F, Shoubridge EA* (2014) The arginine methyltransferase NDUFAF7 is essential for complex I assembly and early vertebrate embryogenesis. *Hum Mol Gen* 23(19): 5159–5170.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddu239>

61. Kumar MG, Rowley S, Fulton R, Dinday MT, Baraban SC, Patel M (2016) Altered Glycolysis and Mitochondrial Respiration in a Zebrafish Model of Dravet Syndrome. *eNeuro* 3(2): ENEURO 0008-16.2016.
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0008-16.2016>
62. Flinn LJ, Keatinge M, Bretaud S, Mortiboys H, Matsui H, De Felice E, Woodroof HI, Brown L, McTighe A, Soellner R, Allen CE, Heath PR, Milo M, Muqit MM, Reichert AS, Köster RW, Ingham PW, Bandmann O (2013) TigarB causes mitochondrial dysfunction and neuronal loss in PINK1 deficiency. *Ann Neurol* 74(6): 837–847.
<https://doi.org/10.1002/ana.23999>
63. Ye C, Chen P, Xu B, Jin Y, Pan Y, Wu T, Du Y, Mao J, Wu R (2023) Abnormal expression of fission and fusion genes and the morphology of mitochondria in eutopic and ectopic endometrium. *Eur J Med Res* 28(1): 209.
<https://doi.org/10.1186/s40001-023-01180-w>
64. Vettori A, Bergamin G, Moro E, Vazza G, Polo G, Tiso N, Argenton F, Mostacciolo ML (2011) Developmental defects and neuromuscular alterations due to mitofusin 2 gene (MFN2) silencing in zebrafish: a new model for Charcot-Marie-Tooth type 2A neuropathy. *Neuromusc Disords* 21(1): 58–67.
<https://doi.org/10.1016/j.nmd.2010.09.002>
65. Campbell PD, Shen K, Sapio MR, Glenn TD, Talbot WS, Marlow FL (2014) Unique function of Kinesin Kif5A in localization of mitochondria in axons. *J Neurosci* 34(44): 14717–14732.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2770-14.2014>
66. Kasprzyk-Pawelec A, Tan M, Phua YL, Rahhal R, McIntosh A, Fernandez H, Girgis M, Cheema A, Jiang L, Kroemer LF, Popratiloff A, Clarkson C, Kirmsa BM, Pearson GW, Glasgow E, Albanese C, Vockley J, Avantiaggiati ML (2023) Loss of the mitochondrial citrate carrier, Slc25a1/CIC disrupts embryogenesis via 2-Hydroxyglutarate. *bioRxiv* 2023.07.18. 549409.
<https://doi.org/10.1101/2023.07.18.549409>
67. Chaouch A, Porcelli V, Cox D, Edvardson S, Scarcia P, De Grassi A, Pierri CL, Cossins J, Laval SH, Grif-fin H, Müller JS, Evangelista T, Töpf A, Abicht A, Huebner A, von der Hagen M, Bushby K, Straub V, Horvath R, Elpeleg O, Lochmüller H (2014) Mutations in the Mitochondrial Citrate Carrier SLC25A1 are Associated with Impaired Neuromuscular Transmission. *J Neuromusc Dis* 1(1): 75–90.
<https://doi.org/10.3233/JND-140021>
68. Yahalom G, Anikster Y, Huna-Baron R, Hoffmann C, Blumkin L, Lev D, Tsabari R, Nitsan Z, Lerman SF, Ben-Zeev B, Pode-Shakked B, Sofer S, Schweiger A, Lerman-Sagie T, Hassin-Baer S (2014) Costeff syndrome: clinical features and natural history. *J Neurol* 261(12): 2275–2282.
<https://doi.org/10.1007/s00415-014-7481-x>
69. Pei W, Kratz LE, Bernardini I, Sood R, Yokogawa T, Dorward H, Ciccone C, Kelley RI, Anikster Y, Burgess HA, Huizing M, Feldman B (2010) A model of Costeff Syndrome reveals metabolic and protective functions of mitochondrial OPA3. *Development* 137(15): 2587–2596.
<https://doi.org/10.1242/dev.043745>
70. Козжанова ТВ (2023) Возможности и достижения использования массового параллельного секвенирования в диагностике наследственных заболеваний с поражением нервной системы. Эпилепсия и пароксизмальные состояния 15(1): 44–52. [Kozhanova TV (2023) Opportunities and achievements of using massive parallel sequencing in the diagnosis of neurodevelopmental diseases. *Epilepsy and Paroxysmal Conditions* 15(1): 44–52. (In Russ)].
<https://doi.org/10.17749/2077-8333/epi.par.con.2023.127>
71. Chen J, Guan L, Zou M, He S, Li D, Chi W (2020) Specific cyprinid HIF isoforms contribute to cellular mitochondrial regulation. *Sci Rep* 10(1): 17246.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-74210-w>
72. Di Donato S (2009) Multisystem manifestations of mitochondrial disorders. *J Neurol* 256(5): 693–710.
<https://doi.org/10.1007/s00415-009-5028-3>
73. Schmidt R, Strähle U, Scholpp S (2013) Neurogenesis in zebrafish – from embryo to adult. *Neural Dev* 8: 3.
<https://doi.org/10.1186/1749-8104-8-3>
74. Jain IH, Zazzeron L, Goli R, Alexa K, Schatzman-Bone S, Dhillion H, Goldberger O, Peng J, Shalem O, Sanjana NE, Zhang F, Goessling W, Zapol WM, Mootha VK (2016) Hypoxia as a therapy for mitochondrial disease. *Science* 352(6281): 54–61.
<https://doi.org/10.1126/science.aad9642>
75. Matsui H, Ito J, Matsui N, Uechi T, Onodera O, Kakita A (2021) Cytosolic dsDNA of mitochondrial origin induces cytotoxicity and neurodegeneration in cellular and zebrafish models of Parkinson's disease. *Nat Commun* 12(1): 3101.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-23452-x>

76. Hu T, Dong Y, He C, Zhao M, He Q (2020) The Gut Microbiota and Oxidative Stress in Autism Spectrum Disorders (ASD). *Oxid Med Cell Longev* 2020: 8396708.
<https://doi.org/10.1155/2020/8396708>
77. Armstrong R (2019) Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol* 57(2): 87–105.
<https://doi.org/10.5114/fn.2019.85929>
78. Gevezova M, Sarafian V, Anderson G, Maes M (2020) Inflammation and Mitochondrial Dysfunction in Autism Spectrum Disorder. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 19(5): 320–333.
<https://doi.org/10.2174/1871527319666200628015039>

Experimental Models of Mitochondrial Dysfunction Disorders in the Pathogenesis of CNS Diseases on Zebrafish

L. V. Yushko^a, M. M. Kotova^a, T. V. Vyunova^b, and A. V. Kalueff^{a, c, d, e, *}

^a*Division of Neurobiology, Sirius University of Science and Technology, Federal Territory Sirius, Russia*

^b*Life Improvement by Future Technologies Center “LIFT”, Moscow, Russia*

^c*Ural Federal University, Yekaterinburg, Russia*

^d*Almazov National Medical Research Center, Ministry of Healthcare of Russian Federation, St. Petersburg, Russia*

^e*Institute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

**e-mail: avkalueff@gmail.com*

Mitochondrial dysfunctions are associated with the pathogenesis of various brain disorders, including Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's, amyotrophic lateral sclerosis, Leigh syndrome and autism spectrum disorder. For the study of mitochondrial dysfunction and the development and testing of new therapeutic strategies, in vivo studies with zebrafish (*Danio rerio*) are of particular interest, due to their biological characteristics, practicality in laboratory maintenance, and high throughput. Here, we discuss genetic and pharmacological models of common mitochondrial dysfunctions and related neurological disorders in rodents and zebrafish, focusing of the growing utility of these fish in modeling mitochondrial pathogenesis of various CNS diseases.

Keywords: mitochondria, mitochondrial dysfunction, CNS diseases, model organisms, zebrafish

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ ОСТРОГО И ХРОНИЧЕСКОГО НЕДОСЫПАНИЯ
НА РАБОЧУЮ И ДОЛГОВРЕМЕННУЮ ПАМЯТЬ У КРЫС**

© 2023 г. М. В. Чернышев¹, *, М. А. Гузеев¹, И. В. Екимова¹

¹*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия*

**E-mail: netmisha@mail.ru*

Поступила в редакцию 28.03.2023 г.

После доработки 26.06.2023 г.

Принята к публикации 10.07.2023 г.

Общеизвестно, что недосыпание или нарушение суточных ритмов сна и бодрствования негативным образом влияет на когнитивные функции. Долгое время полагалось, что главным уязвимым звеном является процесс консолидации памяти, то есть перенос информации из кратковременной/рабочей памяти в долговременную. Однако появляется все больше исследований, показывающих, что особенно сильно нарушения сна отражаются на рабочей памяти. В нашей работе мы попытались дать оценку возможных нарушений рабочей и долговременной памяти после воздействия различных режимов лишения сна в условиях острого и хронического опыта у крыс. Сон крыс популяции Вистар ограничивался с помощью методики качающейся платформы с использованием следующих трех режимов: 1 — острая депривация сна в течение 18 ч; 2 — острое ограничение сна в течение 24 ч (3 ч лишения сна чередовались с 1 ч покоя непрерывно, что суммарно составляло 18 ч лишения сна); 3 — хроническое ограничение сна (воздействие 2 использовалось непрерывно в течение 5 сут). Показано, что острая депривация сна в тесте Y-образный лабиринт приводила к достоверному снижению процента спонтанных чередований рукавов лабиринта, что указывает на нарушение рабочей памяти. В тесте лабиринт Барнс данный тип воздействия не оказывал влияние на долговременную память — время поиска убежища не менялось в этих условиях. Острое и хроническое ограничения сна не оказывали влияние на рабочую и долговременную память. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что пространственная рабочая память (в отличие от долговременной памяти) является уязвимым компонентом когнитивных функций в условиях полной депривации сна. Данный негативный эффект исчезает, если периоды депривации сна чередуются с кратковременными периодами возможности сна, что указывает на защитное значение коротких периодов отдыха (сна) для когнитивных функций при недосыпании. Следовательно, кратковременный сон полезен для когнитивного здоровья и защищает рабочую память, а непрерывное длительное бодрствование ухудшает ее.

Ключевые слова: сон, депривация, хроническое ограничение сна, когнитивные функции, рабочая память, долговременная память, крысы

DOI: 10.31857/S0869813923110031, **EDN:** HGZTDH

ВВЕДЕНИЕ

Сон продолжительностью 7–8 ч в сутки заложен в генетической природе человека [1]. Сокращение сна до 4 ч в сутки имеет пагубные последствия для здоровья,

при этом особую настороженность вызывают связанные с этим различные нарушения когнитивных функций. Общепринятым считается, что недосыпание в первую очередь приводит к снижению концентрации внимания у человека и животных [2–5]. В то же время остается до конца не выясненным вопрос, какие виды памяти в наибольшей мере подвержены негативному влиянию недостатка сна, включая хроническое недосыпание. Существует широко распространенная гипотеза, что сон является важным звеном в системе усвоения новой информации, то есть важным условием консолидации памяти — переноса информации из кратковременной/рабочей памяти в долговременную/референтную [6, 7]. По этой причине дефицит сна должен ухудшать процесс запоминания и приводить к серьезным когнитивным дисфункциям. Еще в начале прошлого века было обнаружено, что у людей процесс формирования долговременной памяти зависит от сна [8]. С тех пор в многочисленных экспериментах было обнаружено влияние недостатка сна на процессы запоминания и формирования долговременной памяти у человека [9–12]. Накоплен также большой экспериментальный материал на грызунах, показывающий нарушение долговременной памяти при остром [13, 14] и хроническом [15] ограничении сна. Однако в литературе можно встретить также и серьезную критику выводов подобных работ о значении сна в процессах консолидации памяти. Имеется предположение, что сон не играет ключевой роли в процессах консолидации памяти [16], это находит свое экспериментальное обоснование в ряде работ [17, 18]. Другой автор еще более остро ставит вопрос, пытаясь вообще опровергнуть саму возможность участия сна в запоминании информации, накопленной в течение бодрствования [19].

Параллельно с этим имеются результаты исследований, указывающие на то, что при недосыпании нарушается не только внимание, но и рабочая память, которая имеет важное значение для реализации всех когнитивных процессов [5, 20–22]. Рабочая память — это вид памяти, обеспечивающий удержание в уме небольшого объема информации в течение короткого промежутка времени для решения различных когнитивных задач. При этом внимание вовлекается в процессы обработки информации в рабочей памяти [23]. Имеющиеся данные литературы указывают, что даже легкое недосыпание в течение 6 ночей (исключение 1 ч сна по сравнению с исходной 7-часовой продолжительностью обычного сна) приводило к нарушению рабочей памяти, но не влияло при этом на концентрацию внимания у испытуемых добровольцев [24]. Другие авторы показали [25], что после хронического недосыпания (5 ч в сутки в течение 5 ночей) одной обычной ночи сна (8 ч) недостаточно, чтобы восстановить рабочую память, что подчеркивает важность длительных периодов нормального сна для восстановления.

В целом, данная картина позволяет отнести пространственную рабочую память к одному из наиболее уязвимых компонентов когнитивных функций в условиях недостатка сна. Вместе с тем имеются отдельные работы, показавшие отсутствие влияния недостатка сна на рабочую память [27]. Существуют даже исследования, в которых проводилось сравнение между чувствительностью к нарушению сна рабочей и референтной памяти у грызунов в различных задачах водного лабиринта. Результаты одних работ [28, 29] позволили авторам предполагать большую чувствительность долговременной/референтной памяти — вида памяти, обеспечивающего кодирование и хранение почти неограниченного объема информации в течение длительного срока с возможностью его извлечения, тогда как результаты других авторов [30, 31] приводили к противоположному выводу. Таким образом, обозначенная проблема представляется весьма запутанной и требующей дальнейшего изучения.

Известно, что одним из ключевых моментов, обуславливающих эффект дефицита сна, являются параметры процедуры ограничения сна. Прежде всего, сюда следует отнести общую длительность, выражаемую либо часами (острый опыт),

либо днями (хронический опыт). Важное значение при этом имеет режим ограничения сна: полное лишение (депривация) сна или частичное лишение (ограничение) сна с возможностью отдыха в определенный интервал. Несколько циклов сна в разное время суток (полифазный сон) позволяет сохранить лучшую работоспособность даже у людей при сокращении общего времени сна [32, 33]. Такой режим сна особенно распространен у грызунов, поэтому при моделировании влияния дефицита сна на функции мозга у крыс этот фактор может иметь ключевое значение. Крысы имеют полифазный цикл сон—бодрствование, в котором длительность непрерывного бодрствования редко превышает 2 ч в активное время суток. Этот факт почти не находит отражения в экспериментальных моделях недосыпания у крыс, хотя для корректного сопоставления хронического ограничения сна у людей и грызунов его также следует учитывать. Существует лишь небольшое количество исследований, оценивающих когнитивные функции в условиях полифазного ограничения сна у крыс [34, 35], причем влияние такого воздействия на память рассматривалось всего лишь в одной работе [36]. В нашей работе мы поставили перед собой задачу оценить уязвимость рабочей и долговременной памяти по отношению к полной депривации сна и полифазному ограничению сна в острой и хронической моделях у крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Исследование проведено на крысах-самцах популяции Вистар в возрасте 7–8 мес., массой тела 350–450 г, выращенных в виварии Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН. За неделю до начала опытов животных перемещали из вивария в экспериментальную комнату и помещали в одиночные клетки площадью 0.12 м². Животные содержались при световом режиме 12:12 ч (10:00–22:00 — свет включен) и температуре воздуха 23 ± 1°С. Доступ к воде и пище был неограниченным.

Ограничение сна. Влияние дефицита сна на память и обучение у крыс проводилось с использованием трех моделей: 1) острая депривация сна непрерывно в течение 18 ч; 2) острое ограничение сна в течение 24 ч по схеме 3/1 (рис. 1): 3 ч лишения сна и 1 ч покоя (суммарная потеря сна составляла 18 ч; 3) хроническое ограничение сна, животные в течение 5 дней лишались сна на 18 ч/сут по схеме, описанной в предыдущей модели (рис. 2). Лишения сна осуществляли качанием клетки с частотой 160–170 об./мин на орбитальном шейкере S-3.02L.A20 (ELMI, Латвия). Такая методика лишения сна эффективно ограничивала время медленноволнового сна (остается не более 5% от общего времени) и полностью устраняла парадоксальный сон [37]. Прерывание сна с помощью лабораторного шейкера у животных является валидным методом и широко применяется в ряде лабораторий и неврологических центров [38, 39]. В периоды покоя шейкер автоматически останавливался, что позволяло животным спать полноценным сном. Во время процедуры лишения сна животные оставались в домашней клетке, влияние человека было минимизировано. До начала эксперимента всех животных адаптировали к работе шейкера, помещая клетку с крысой на качающуюся платформу на 20 мин в светлую фазу суток в течение двух дней.

Рабочая память. Влияние дефицита сна на рабочую память определялось в тесте спонтанное чередование в Y-образном лабиринте [40]. Поведение грызунов в данной конструкции лабиринта, состоящего из трех одинаковых рукавов, базируется на стремлении животного исследовать новизну окружающей обстановки, всякий раз посещая тот рукав, который не был обследован в предыдущем заходе. Следование данному предпочтению в выборе рукава указывает на правильность выполнения теста. Всего в экспериментах использовалось 96 крыс. В экспериментах с

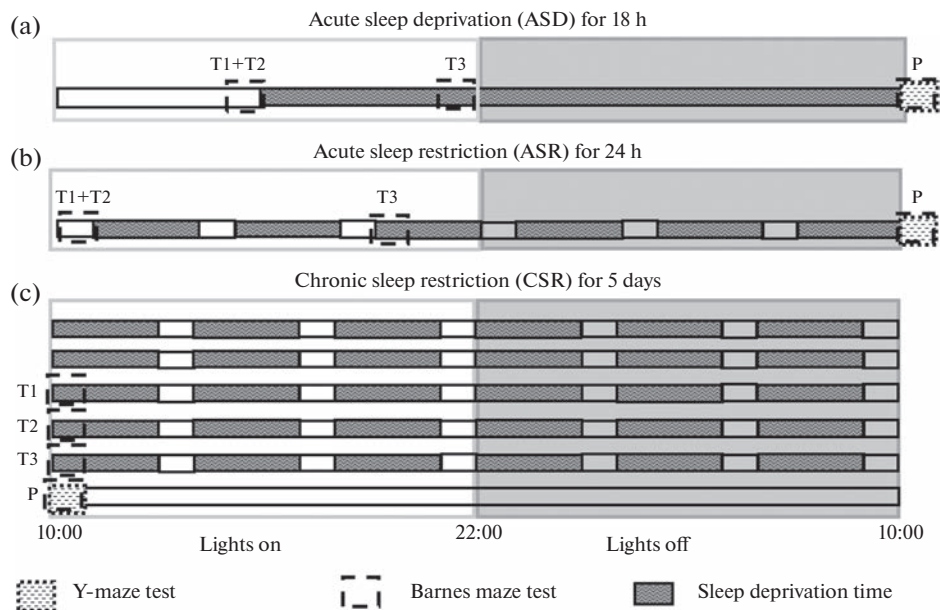


Рис. 1. Схема ограничения сна и тестирования памяти: (а) – острая депривация сна (ASD), (б) – острое ограничение сна (ASR), (с) – хроническое ограничение сна (CSR). Обучающие предъявления лабиринта Барнс (T1–T3), тестовое предъявление лабиринта Барнс (P).

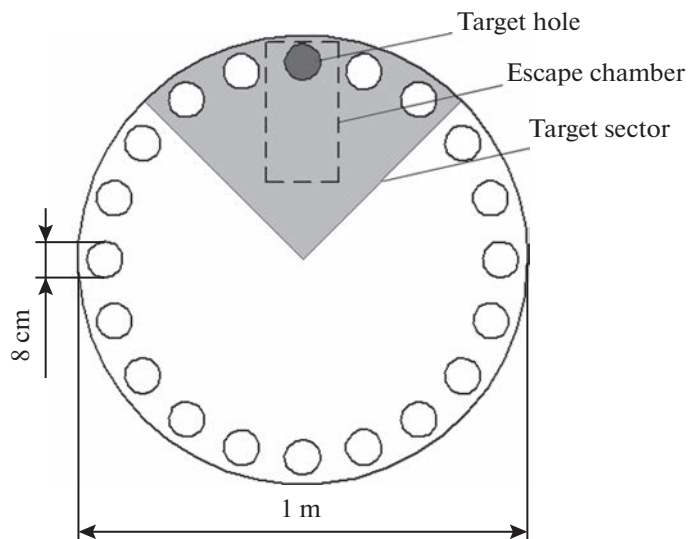


Рис. 2. Схема лабиринта Барнс.

острой депривацией сна участвовало 30 крыс, с острым ограничением сна – 32 крысы, с хроническим ограничением сна – 34 крысы. Животных случайным образом разделяли на 2 равные группы: одну группу подвергали депривации/ограничению сна с помощью шейкера, вторую (контрольную) группу содержали в клетках на невключенном шейкере, где сон был неограничен. Клетки с включенным и не

включенным шейкером находились по соседству. Тестирование рабочей памяти проводили через 10 мин после окончания процедуры лишения сна (рис. 1). В начале тестирования животных помещали в центр лабиринта белого цвета с интенсивностью освещения трех одинаковых рукавов ($50 \times 40 \times 15$ см) 80 люкс и давали свободно его обследовать в течение 10 мин. Пространственную рабочую память оценивали по процентному отношению правильных спонтанных чередований к полному числу возможных чередований. Правильными чередованиями считали любую последовательность заходов животного в 3 разных рукава лабиринта подряд. Число возможных чередований определяли как суммарное число всех входов в рукава, из которого вычитали число 2 с целью исключить первые два захода, не позволяющие оценить правильность выполнения данной задачи. Тест проводился в начале светлого времени суток. Для статистического анализа использовали только тех животных, которые совершали не менее 12 входов в рукава [41]. Локомоторную/исследовательскую активность оценивали по суммарному числу всех входов в рукава лабиринта без использования вышеуказанного порога отсечения 12.

Долговременная память и обучение. Влияние дефицита сна на долговременную память и процесс обучения исследовалось в тесте лабиринт Барнс по укороченному протоколу обучения [42]. В экспериментах на мышах в модели болезни Альцгеймера такая модификация протокола показала большую чувствительность к легким нарушениям памяти. В экспериментах участвовало 86 животных: с острой депривацией сна $n = 30$, с острым ограничением сна $n = 32$, с хроническим ограничением сна $n = 24$.

Животных случайным образом разделяли на 2 равные группы: одну группу подвергали депривации/ограничению сна, вторую (контрольную) группу содержали в клетках на невключенном шейкере, где сон был неограничен.

Лабиринт представлял собой белый диск с 20 норками, равномерно расположенными по краю с освещением на поверхности диска 800 люкс. Одна из норок являлась целевой, которая вела в темное убежище, где крыса имела возможность спрятаться. Протокол теста был разработан согласно рекомендациям, предложенным Gawel и соавт. [43]. Протокол состоял из трех этапов: 1. Приучение к лабиринту. 2. Обучение животных поиску убежища. 3. Тестирование долговременной памяти. Приучение животных к лабиринту (1-й этап) проводили за 2 дня до начала эксперимента. Сначала крыс помещали в убежище, давая спокойно его обследовать. Затем животных помещали в центр лабиринта, позволяя обнаружить убежище и спрятаться в него. Всегда время пребывания в убежище составляло 3 мин. Если крыса не обнаруживала убежище, то экспериментатор аккуратно подводил ее рукой к убежищу. На этапе приучения к лабиринту внешняя обстановка не контролировалась. На этапе обучения пространственной задаче (2-й этап) лабиринт огораживали белой ширмой по периметру на расстоянии не менее 30 см от края. На ширме располагались четыре черные картонные фигуры различной формы размером 20×20 см с четырех сторон. Животных помещали в центр лабиринта и позволяли спрятаться в убежище. При острой депривации сна и остром ограничении сна животных обучали дважды с интервалом 15 мин перед началом ограничения сна и 1 раз после 6 ч депривации сна. В эксперименте с хроническим ограничением сна животных обучали один раз в день в начале 3-го, 4-го, 5-го дней ограничения сна. Тестирование памяти (3-й этап) проводили после ограничения сна (рис. 1). В тестовую сессию животному давали 3 мин обследовать лабиринт, убежище отсутствовало. Во время тестирования внешние ориентиры оставались в том же положении, что и во время обучения. Эффективность обучения оценивали по времени, затраченному на достижение целевой норки. После каждого испытания лабиринт протирали 3%-ным раствором перекиси водорода для устранения запахов. Пространственную долговременную память оценивали по процентному отношению

времени, затраченного на обследование целевой норки и двух ближайших норок с каждой стороны (5 норок целевого сектора) ко времени, затраченному на обследование всех норок в лабиринте (рис. 2), так как этот показатель лучше отражает долговременную память в тестах с короткой обучающей последовательностью [44]. Время обследования норок определялось автоматически по положению носа крысы над норкой с использованием программы видеотрекинга EthoVision XT 12.0 (Нидерланды).

Статистический анализ. Статистический анализ результатов тестов проводился в программе GraphPad Prism 8 (США). Все данные проверялись на нормальность распределения тестом Шапиро–Уилка и на равенство дисперсий F -тестом Фишера. Парные сравнения проводились с помощью t -критерия Стьюдента. Обучение животных сравнивалось с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (two-way ANOVA: фактор 1 – этап обучения; фактор 2 – группа животных). Значимыми считались изменения с уровнем $p < 0.05$. На графиках значения представлены как среднее и ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пространственная рабочая память. При оценке пространственной рабочей памяти в тесте спонтанное чередование в Y-образном лабиринте у крыс с острой депривацией сна было обнаружено достоверное снижение процента спонтанных чередований по сравнению с контрольной группой (t -тест, $p < 0.05$; рис. 3а), что указывает на ухудшение рабочей памяти. Расчет производился по 11 депривированным крысам и 14 контрольным (5 крыс, совершивших менее 12 входов в рукава, были исключены из данного анализа). После острой депривации сна суммарное число входов в рукава лабиринта снизилось (t -критерий Стьюдента, $p < 0.05$; рис. 3б) у всех депривированных животных. Сходный анализ данных в группе с острым ограничением сна и в группе с хроническим ограничением сна показал отсутствие различий между экспериментальными и контрольными группами как по проценту спонтанных чередований (t -критерий Стьюдента, $p > 0.05$; рис. 3с, 3е), так и по количеству входов в рукава лабиринта (t -критерий Стьюдента, $p > 0.05$; рис. 3д, 3ф), что свидетельствует об отсутствии эффекта дефицита сна в этом тесте на пространственную рабочую память и двигательную/исследовательскую активность. Лишь по одному животному из контрольной и экспериментальной групп совершало меньше 12 входов при остром ограничении сна. В эксперименте с хроническим ограничением сна менее 12 входов в рукава наблюдалось у двух животных из каждой группы.

Долговременная память. На этапе обучения в лабиринте Барнс у животных всех групп наблюдалось прогрессивное сокращение латентного периода до обследования целевой норки, при этом различий между группами с лишением сна и контрольными группами не наблюдалось. При острой полной депривации two-way ANOVA: фактор 1 – этап обучения $F(3, 84) = 3.8$, $p = 0.01$; фактор 2 – группа крыс $F(1, 28) = 0.4$, $p = 0.53$; взаимодействие факторов – группа $\times$ обучение $F(3, 84) = 0.92$, $p = 0.44$ (рис. 4а). При остром ограничении сна время two-way ANOVA: фактор 1 – этап обучения $F(3, 81) = 9.5$, $p < 0.01$; фактор 2 – группа крыс $F(1, 27) = 0.38$, $p = 0.54$; взаимодействие факторов – группа $\times$ обучение $F(3, 81) = 0.35$, $p = 0.79$ (рис. 4б). При хроническом ограничении сна two-way ANOVA: фактор 1 – этап обучения $F(3, 66) = 8$, $p < 0.01$; фактор 2 – группа крыс $F(1, 22) = 0.08$, $p = 0.78$; взаимодействие факторов – группа $\times$ обучение $F(3, 66) = 0.23$, $p = 0.87$ (рис. 4с). В конце этапа обучения в лабиринте Барнс все животные при первом обнаружении убежища прятались в него, однако 3 крысы из трех разных групп после 2–3 ошибок прекращали поиск убежища. У таких животных невозможно оценить долговременную па-

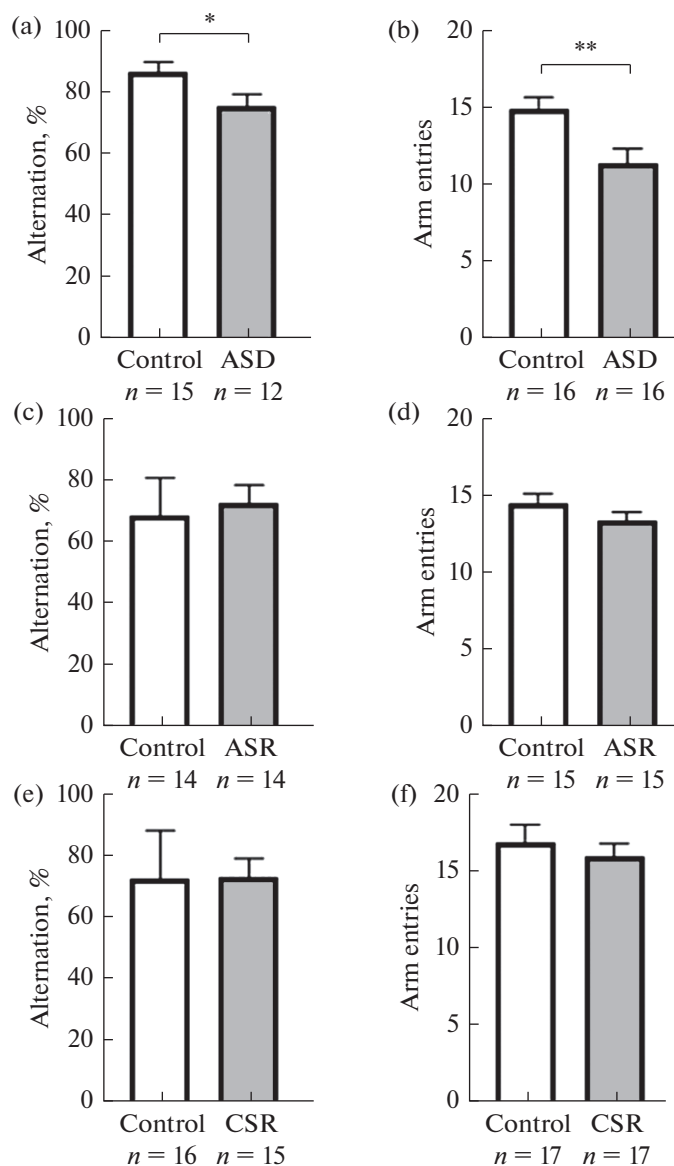


Рис. 3. Влияние дефицита сна на рабочую память и локомоторное/исследовательское поведение крыс в тесте спонтанного чередования в Y-образном лабиринте.

Различные режимы лишения сна: ASD – острая депривация сна (a, b), ASR – острое ограничение сна (c, d), CSR – хроническое ограничение сна (e, f). По вертикали: процент спонтанных чередований (a, c, e), полное число заходов в рукава (b, d, f). Данные представлены как среднее и стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). * – $p < 0.01$, ** – $p < 0.01$, t -критерий Стьюдента.

мью с помощью выбранной нами методики, поэтому эти крысы были исключены из анализа. На этапе тестирования все группы животных как контрольные, так и с ограничением сна, продемонстрировали предпочтение в обследовании норок в целевом секторе (>25% времени обследования), то есть животные запоминали положение

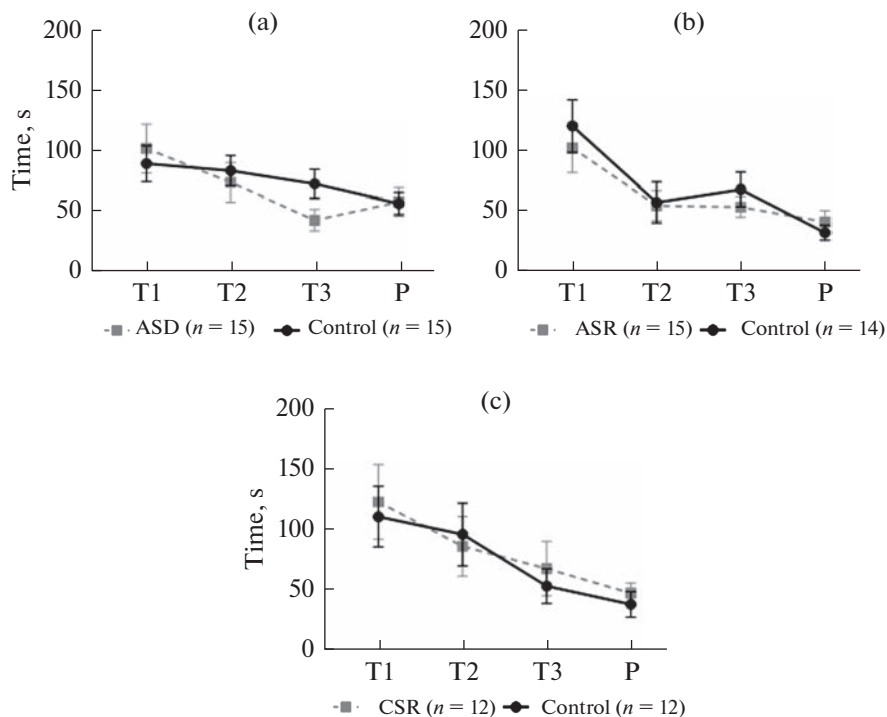


Рис. 4. Влияние дефицита сна на обучение животных в лабиринте Барнс.

По вертикали — показатель обучения (латентность первого подхода к целевой норке). По горизонтали: T1–T3 — обучающие предъявления, P — тестовое предъявление. Различные режимы лишения сна: ASD — острая депривация сна (a), ASR — острое ограничение сна (b), CSR — хроническое ограничение сна (c). Данные представлены как среднее и стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Значимых различий между группами сравнения обнаружено не было (two-way ANOVA, $p > 0.05$).

ние целевой норки. Различий между контрольной группой и группами с ограничением сна не найдено (t -тест, $p < 0.05$; рис. 5). Таким образом, по результатам данного теста мы не обнаружили ухудшения долговременной пространственной памяти ни в одной модели лишения сна.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Важным аспектом нашего исследования было выяснение наиболее значимых параметров депривации сна, способных оказывать влияние на память. Мы использовали три распространённых типа воздействий по длительности: 1) острая депривация сна непрерывно в течение 18 ч; 2) острое ограничение сна в течение 24 ч по схеме 3/1; 3) хроническое ограничение сна в течение 5 дней также по схеме 3/1. Последние два типа ограничений сна представляли для нас исходно наибольший интерес, так как они, помимо своей малой изученности, имитировали свойственную грызунам полифазную природу сна (чередование на всем протяжении суток периодов сна и бодрствования). При этом суммарная потеря сна в этих моделях составляла 18 ч в сутки, т.е. столько же, сколько при острой полной депривации сна. Проведенное исследование показало, что использованная нами 18-часовая депривация сна приводила к ухудшению пространственной рабочей памяти в тесте спон-

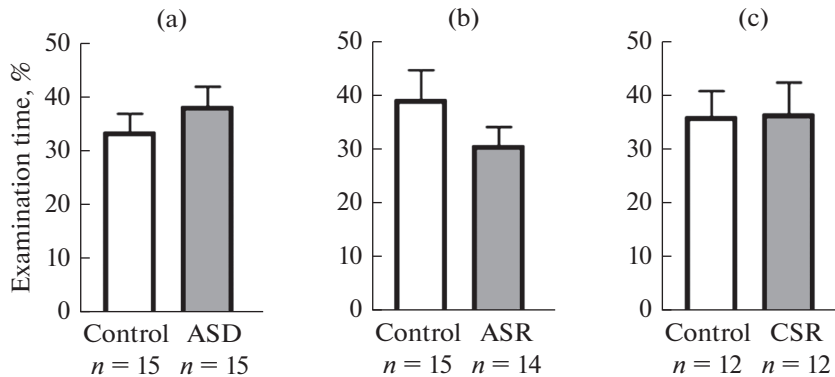


Рис. 5. Влияние дефицита сна на долговременную память крыс в лабиринте Барнса.

По вертикали — процент времени, затраченного на обследование норок в целевом секторе во время тестовой сессии после ограничения сна. Различные режимы лишения сна: ASD — острая депривация сна (а), ASR — острое ограничение сна (б), CSR — хроническое ограничение сна (с). Данные представлены как среднее и стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Значимых различий между группами сравнения обнаружено не было (t -критерий Стьюдента, $p > 0.05$).

танное чередование в Y-образном лабиринте. Такой результат совпадает с результатами большинства работ, выполненных на человеке с применением часто встречаемой 36-часовой депривации сна [22, 44] и на грызунах с депривацией сна длительностью 10–20 ч [45–47], что сопоставимо с нашей моделью. Примечательно, что в исследовании [46] ухудшение рабочей памяти у мышей зависело от степени сложности выполнения задачи пространственного чередования в Т-образном лабиринте. Авторы показали, что изменения в рабочей памяти наблюдались только при длинном интервале между пробами (длительностью 30 с), а при коротком интервале (длительностью 5 с) данные изменения отсутствовали. Это обстоятельство указывает на определенную вариабельность чувствительности рабочей памяти в данном тесте к недостатку сна, что, в свою очередь, помимо физических параметров ограничения сна, может обуславливать наличие/отсутствие эффекта.

Полученный нами эффект 18-часовой депривации сна на рабочую память в задаче спонтанного чередования в Y-образном лабиринте в то же время может отличаться от результатов, в которых использовался непосредственно тот же самый тест, но иные временные интервалы депривации. Было показано [27, 45], что депривации сна длительностью 3 и 6 ч не вызывают изменений в проценте спонтанных чередований при выполнении теста у мышей. Однако уже 10-часовая депривация ухудшала данный показатель [45], демонстрируя схожий с нашим исследованием результат. А депривация длительностью 24 ч в силу увеличения сонливости давала существенное снижение двигательной активности и приводила к неспособности животных совершать требуемые перемещения внутри лабиринта. Этот факт, в свою очередь, согласуется с обнаруженным в нашем исследовании уменьшением общего числа переходов между рукавами. Таким образом, использованный нами период 18 ч оказался оптимальным с точки зрения регистрации негативного эффекта на память. Однако следует упомянуть, что при использовании деприваций длительностью 3 и 6 ч авторы отмечали противоположный эффект — усиление двигательной активности. По-видимому, начальное недосыпание приводит к активации различных систем (в частности локомоции и исследовательского поведения в Y-лабиринте), впоследствии переходящей к дезактивации по мере протекания времени и аккумуляции сонливости.

Интересным результатом нашего исследования явилось отсутствие эффекта при использовании двух других режимов ограничения сна, что было обусловлено введением в протокол воздействия часовых окон для сна по описанной схеме 3/1. Примечательным является то, что даже в условиях 5-дневного хронического опыта данные часовые интервалы препятствовали появлению эффекта накопления нехватки сна на память. Сравнивая этот результат с данными других исследований, следует отметить, что в литературе присутствует лишь одна работа [36], в которой использовался подобный методический подход применительно к оценке памяти. Сообщается, что ограничение сна по протоколу 4/2 не оказывало влияния на рабочую память в восьмилучевом лабиринте, а также на ассоциативное обучение и гиппокамп-зависимую долговременную память у мутантных мышей как в условиях острого (24 ч), так и хронического (48 ч). воздействия. Нельзя не отметить, что ограничение сна длительностью 48 ч с трудом можно назвать хроническим, сопоставляя его с 5-дневным воздействием, использованным в нашем эксперименте. Однако результат и в том, и в другом случае оказался одинаковым — полифазный режим ограничения сна не вызывал негативных изменений в памяти.

В подавляющем числе работ используется монофазное ограничение сна — простое сокращение общего времени сна в суточном цикле. В исследованиях, выявивших ухудшение рабочей и долговременной памяти, общая продолжительность такого ограничения сна составляла, как правило, несколько недель у людей с изъятием нескольких часов сна в сутки [24, 25] и не менее 5 дней у грызунов с изъятием чаще всего 18 ч сна в сутки [15, 26, 48, 49]. На эти параметры были ориентированы и мы в своем исследовании, где общая продолжительность хронического ограничения сна составляла 5 дней, а суммарное суточное сокращение сна — 18 ч (для всех вариантов используемых воздействий). Единственной разницей являлось использование в нашей работе протокола 3/1, учитывающего полифазный сон крыс. Таким образом, отсутствие негативного эффекта дефицита сна при использовании данного протокола может указывать на то, что в этих условиях мозг животных, по-видимому, имеет больше возможностей для компенсации недостающего количества сна.

В нашем исследовании не было обнаружено влияния недостатка сна на долговременную память. Несмотря на то, что в литературе существует большое количество экспериментальных работ, показывающих негативное влияние недостатка сна на долговременную память, ранее не проводилось исследований с таким же дизайном, как в данной работе. Это касается применения шейкера для ограничения сна в сочетании с обучением животных в лабиринте Барнс и влияния полифазной схемы депривации сна на долговременную память. Хотя мы наблюдали нормальный процесс обучения во всех группах животных и предпочтение выбранного сектора лабиринта, что говорит о сформировавшейся долговременной памяти, чувствительность выбранного нами метода оценки памяти к тем нарушениям, которые возникают в наших экспериментальных условиях, могла быть недостаточна. Нарушения памяти в лабиринте Барнс наблюдались при фрагментации сна на беговой дорожке в течение 12 дней [48], такие экспериментальные условия могут оказаться более тяжелыми для животных из-за более продолжительного периода нарушения сна. С другой стороны, можно предположить, что нарушения долговременной памяти зависят не только от режима депривации, но и от способа поддержания бодрствования в экспериментальной модели. Так, например, депривация сна с помощью предъявления новых объектов может приводить к повышенной когнитивной активности, депривация на беговой дорожке или в колесе к — чрезмерной двигательной активности [50]. Еще одной причиной различия результатов у грызунов по влиянию сна на долговременную память могут являться особенности теста, используемого для оценки памяти. Так, в ряде исследований было пока-

зано ухудшение пространственной долговременной памяти в водном лабиринте Морриса [14, 15]. Хотя тест Барнс и Морриса считают сходными, различия в получаемых результатах могут быть связаны с разным уровнем стресса, который испытывают животные при выполнении задачи [51]. В ряде работ было показано, что повышение уровня кортикостерона у грызунов после тестирования в водном лабиринте Морриса более значительно, чем в лабиринте Барнс [51, 52]. Если рассматривать сон в качестве стресс-лимитирующего механизма [53], то усиление стресса на фоне недостатка сна может приводить к более выраженным нарушениям когнитивных функций в экспериментах с использованием теста Морриса.

В целом, проведенное исследование показало, что 18-часовая полная депривация сна избирательно ухудшает рабочую память, не нарушая при этом долговременную память при прочих равных условиях. Режим воздействия с имитацией полифазного сна, представляющего собой чередование коротких интервалов для отдыха, предохраняет память от возникновения нарушений, которые могут наблюдаться при непрерывной депривации сна одинаковой продолжительности. Это положительное влияние сохраняется даже в условиях 5-дневного хронического ограничения сна. Важно отметить, что продолжительный здоровый сон является необходимым условием нормального функционирования эндокринной системы, оказывающей большое влияние на углеводный обмен. Последнее время появляются сведения [54] о том, что рабочая память в наибольшей мере зависима от метаболизма глюкозы, при этом сокращение ночного сна приводит даже к снижению ее толерантности. На основании этого делаются попытки объяснить наибольшую чувствительность рабочей памяти к недостаточности сна, о чем в определенной мере свидетельствуют и наши результаты, которые в том числе указывают еще на значимые параметры самого недосыпания (монофазное/полифазное ограничение сна). Кратковременный сон полезен для мозга и защищает рабочую память, а непрерывное бодрствование ухудшает ее. Результаты работы могут являться фундаментальным обоснованием для разработки нового трудового распорядка с введением короткого (10–20 мин) дневного и ночного сна на рабочем месте у людей с 24-часовым графиком работы с целью сохранения здоровья когнитивных функций.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Манипуляции с животными осуществляли в соответствии с этическими стандартами, утвержденными правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям, утвержденным биоэтическим комитетом по охране животных Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (протокол №7 от 22.07.2021 г.).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания (№ 075-00967-23-00).

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы (И.В.Е.), проведение экспериментов на животных (М.В.Ч., М.А.Г.), анализ данных (М.В.Ч., М.А.Г, И.В.Е.), написание и редактирование рукописи (М.В.Ч, М.А.Г., И.В.Е.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Полуэктов М (2019) Загадки сна: от бессонницы до летаргии М. Альпина Пабли. [*Poluektov M* (2019) *Mysteries of sleep: from insomnia to lethargy*. M. Al'pina Publ. (In Russ)].
2. Alhola P, Polo-Kantola P (2007) Sleep deprivation: Impact on cognitive performance. *Neuropsychiatr Dis Treat* 3(5): 553–567.
3. Lo JC, Groeger JA, Santhi N, Arbon EL, Lazar AS, Hasan S, von Schantz M, Archer SN, Dijk DJ (2012) Effects of partial and acute total sleep deprivation on performance across cognitive domains, individuals and circadian phase. *PLoS One* 7(9): e45987.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045987>
4. Balkin TJ, Rupp T, Picchioni D, Wesensten NJ (2008) Sleep loss and sleepiness: current issues. *Chest* 134(3): 653–660.
<https://doi.org/10.1378/chest.08-1064>
5. McCoy JG, Strecker RE (2011) The cognitive cost of sleep lost. *Neurobiol Learn Mem* 96(4): 564–582.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2011.07.004>
6. Born J, Wagner U (2004) Awareness in memory: being explicit about the role of sleep. *Trends Cogn Sci* 8: 242–244.
7. Gais S, Plihal W, Wagner U, Born J (2000) Early sleep triggers memory for early visual discrimination skills. *Nat Neurosci* 3: 1335–1339.
8. Jenkins JG, Dallenbach KM (1924) Obliviscence during Sleep and Waking. *Am J Psychol* 35(4): 605.
<https://doi.org/10.2307/1414040>
9. Rasch B, Born J (2013) About Sleep's Role in Memory. *Physiol Rev* 93(2): 681–766.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00032.2012>
10. Hennecke E, Lange D, Steenbergen F, Fronczek-Poncellet J, Elmenhorst D, Bauer A, Elmenhorst EM (2020) Adverse interaction effects of chronic and acute sleep deficits on spatial working memory but not on verbal working memory or declarative memory. *J Sleep Res* 30(4): e13225.
<https://doi.org/10.1111/jsr.13225>
11. Gais S, Lucas B, Born J (2006) Sleep after learning aids memory recall. *Learn Mem* 13(3): 259–262.
12. Payne JD, Tucker MA, Ellenbogen JM, Wamsley EJ, Walker MP, Schacter DL, Stickgold R (2012) Memory for semantically related and unrelated declarative information: the benefit of sleep, the cost of wake. *PLoS One* 7(3): e33079.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033079>
13. Palchykova S, Winsky-Sommerer R, Meerlo P, Durr R, Tobler I (2006) Sleep deprivation impairs object recognition in mice. *Neurobiol Learn Mem* 85(3): 263–271.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2005.11.005>
14. Guan Z, Peng X, Fang J (2004) Sleep deprivation impairs spatial memory and decreases extracellular signal-regulated kinase phosphorylation in the hippocampus. *Brain Res* 1018(1): 38–47.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.05.032>
15. McCoy JG, Christie MA, Kim Y, Brennan R, Poeta DL, McCarley RW, Strecker RE (2013) Chronic sleep restriction impairs spatial memory in rats. *NeuroReport* 24(2): 91–95.
<https://doi.org/10.1097/wnr.0b013e32835cd97a>
16. Siegel JM (2021) Memory Consolidation Is Similar in Waking and Sleep. *Current Sleep Med Rep* 7(1): 15–18.
<https://doi.org/10.1007/s40675-020-00199-3>
17. McDevitt EA, Zhang J, MacKenzie KJ, Fiser J, Mednick SC (2022) The effect of interference, offline sleep, and wake on spatial statistical learning. *Neurobiol Learn Mem* 193: 107650.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2022.107650>
18. Bailes C, Caldwell M, Wamsley EJ, Tucker MA (2020) Does sleep protect memories against interference? A failure to replicate. *PLoS One* 15(2): e0220419.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220419>
19. Kovalzon VM (2023) Cerebral information processing during sleep: evolutionary and ecological approaches. *J Evol Biochem Phys* 59(2): 79–89.
20. Lim J, Dinges DF (2010) A meta-analysis of the impact of short-term sleep deprivation on cognitive variables. *Psychol Bull* 136(3): 375–389.
<https://doi.org/10.1037/a0018883>
21. Lowe CJ, Safati A, Hall PA (2017) The neurocognitive consequences of sleep restriction: A meta-analytic review. *Neurosci Biobehav Rev* 80: 586–604.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.07.010>
22. Peng Z, Dai C, Ba Y, Zhang L, Shao Y, Tian J (2020) Effect of Sleep Deprivation on the Working Memory-Related N2-P3 Components of the Event-Related Potential Waveform. *Front Neuro-*

- sci 14: 469.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00469>
23. Krause AJ, Simon EB, Mander BA, Greer SM, Saletin JM, Goldstein-Piekarski AN, Walker MP (2017) The sleep-deprived human brain. *Nat Rev Neurosci* 18(7): 404–418.
<https://doi.org/10.1038/nrn.2017.55>
24. Santisteban JA, Brown TG, Ouimet MC, Gruber R (2019) Cumulative mild partial sleep deprivation negatively impacts working memory capacity but not sustained attention, response inhibition, or decision making: a randomized controlled trial. *Sleep Health* 5(1): 101–108.
<https://doi.org/10.1016/j.sleth.2018.09.007>
25. Hennecke E, Lange D, Steenbergen F, Fronczek-Poncelet J, Elmenhorst D, Bauer A, Aeschbach D, Elmenhorst EM (2021) Adverse interaction effects of chronic and acute sleep deficits on spatial working memory but not on verbal working memory or declarative memory. *J Sleep Res* 30(4): e13225.
<https://doi.org/10.1111/jsr.13225>
26. Colavito V, Fabene PF, Grassi-Zucconi G, Pifferi F, Lamberty Y, Bentivoglio M, Bertini G (2013) Experimental sleep deprivation as a tool to test memory deficits in rodents. *Front Syst Neurosci* 7: 106.
<https://doi.org/10.3389/fnsys.2013.00106>
27. Ramanathan L, Hu S, Frautschy SA, Siegel JM (2010) Short-term total sleep deprivation in the rat increases antioxidant responses in multiple brain regions without impairing spontaneous alternation behavior. *Behav Brain Res* 207(2): 305–309.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.10.014>
28. Beaulieu I, Godbout R (2000) Spatial learning on the Morris Water Maze Test after a short-term paradoxical sleep deprivation in the rat. *Brain and Cognit* 43(1–3): 27–31.
29. Le Marec N, Beaulieu I, Godbout R (2001) Four hours of paradoxical sleep deprivation impairs alternation performance in a water maze in the rat. *Brain and Cognit* 46(1–2): 195–197.
[https://doi.org/10.1016/s0278-2626\(01\)80064-6](https://doi.org/10.1016/s0278-2626(01)80064-6)
30. Ward CP, McCarley RW, Sirecker RE (2009) Experimental sleep fragmentation impairs spatial reference but not working memory in Fischer/Brown Norway rats. *J Sleep Res* 18(2): 238–244.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2869.2008.00714.x>
31. Youngblood BD, Zhou J, Smagin GN, Ryan DH, Harris RB (1997) Sleep deprivation by the “flower pot” technique and spatial reference memory. *Physiol & Behav* 61(2): 249–256.
[https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(96\)00363-0](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(96)00363-0)
32. Porcu S, Casagrande M, Ferrara M, Bellatreccia A (1998) Sleep and Alertness During Alternating Monophasic and Poliphasic Rest-Activity Cycles. *Int J Neurosci* 95(1–2): 43–50.
<https://doi.org/10.3109/00207459809000648>
33. Roach GD, Zhou X, Darwent D, Kosmadopoulos A, Dawson D, Sargent C (2017) Are two halves better than one whole? A comparison of the amount and quality of sleep obtained by healthy adult males living on split and consolidated sleep–wake schedules. *Accident Analysis & Prevent* 99: 428–433.
<https://doi.org/10.1016/j.aap.2015.10.012>
34. Deurveilher S, Bush JE, Rusak B, Eskes GA, Semba K (2015) Psychomotor vigilance task performance during and following chronic sleep restriction in rats. *Sleep* 38(4): 515–528.
<https://doi.org/10.5665/sleep.4562>
35. Deurveilher S, Semba K (2019) Physiological and Neurobehavioral Consequences of Chronic Sleep Restriction in Rodent Models. In: *Handbook Behav Neurosci* 30: 557–567.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813743-7.00037-2>
36. Bjorness TE, Kelly CL, Gao T, Poffenberger V, Greene RW (2009). Control and function of the homeostatic sleep response by adenosine A1 receptors. *J Neurosci* 29(5): 1267–1276.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2942-08.2009>
37. Гузеев МА, Курмазов НС, Симонова ВВ, Пастухов ЮФ, Екимова ИВ (2021) Создание модели хронического недосыпания для трансляционных исследований. *Журн неврол психиатр им СС Корсакова* 121(4–2): 6–13. [Guzeev MA, Kurmazov NS, Simonova VV, Pastukhov YF, Ekimova IV (2021) Modeling of chronic sleep restriction for translational studies. *Zh Nevrol Psikhiatr im SS Korsakova* 121(4–2): 6–13. (In Russ)].
<https://doi.org/10.17116/jnevro20211214026>
38. Sinton CM, Kovakkattu D, Friese RS (2009) Validation of a novel method to interrupt sleep in the mouse. *J Neurosci Methods* 184(1): 71–78.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2009.07.026>
39. Bertrand SJ, Zhang Z, Patel R, O’Ferrell C, Punjabi NM, Kudchadkar SR, Kannan S (2020) Transient neonatal sleep fragmentation results in long-term neuroinflammation and cognitive impairment in a rabbit model. *Exp Neurol* 327: 113212.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113212>

40. Hidaka N, Suemaru K, Takechi K, Li B, Araki H (2011) Inhibitory effects of valproate on impairment of Y-maze alternation behavior induced by repeated electroconvulsive seizures and c-Fos protein levels in rat brains. *Acta Med Okayama* 65(4): 269–277.
<https://doi.org/10.18926/AMO/46853>
41. Garcia Y, Esquivel N (2018) Comparison of the Response of Male BALB/c and C57BL/6 Mice in Behavioral Tasks to Evaluate Cognitive Function. *Behav Sci (Basel)* 8(1): 14.
<https://doi.org/10.3390/bs8010014>
42. Attar A, Liu T, Chan W-T C, Hayes J, Nejad M, Lei K, Bitan G (2013) A shortened Barnes maze protocol reveals memory deficits at 4-months of age in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 8(11): e80355.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080355>
43. Gawel K, Gibula E, Marszalek-Grabska M, Filarowska J, Kotlinska JH (2019) Assessment of spatial learning and memory in the Barnes maze task in rodents-methodological consideration. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 392(1): 1–18.
<https://doi.org/10.1007/s00210-018-1589-y>
44. Wang L, Wu H, Dai C, Peng Z, Song T, Xu L, Xu M, Shao Y, Li S, Fu W (2022) Dynamic hippocampal functional connectivity responses to varying working memory loads following total sleep deprivation. *J Sleep Res*: e13797.
<https://doi.org/10.1111/jsr.13797>
45. Piérard C, Liscia P, Philippin JN, Mons N, Lafon T, Chauveau F, Van Beers P, Drouet I, Serra A, Jouanin JC, Béracochéa D (2007) Modafinil restores memory performance and neural activity impaired by sleep deprivation in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 88(1): 55–63.
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2007.07.006>
46. Chauveau F, Laudereau K, Libourel PA, Gervasoni D, Thomasson J, Poly B, Pierard C, Beracochéa D (2014) Ciproxifan improves working memory through increased prefrontal cortex neural activity in sleep-restricted mice. *Neuropharmacology* 85: 349–356.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.04.017>
47. Thomasson J, Canini F, Poly-Thomasson B, Trousselard M, Granon S, Chauveau F (2017) Neuropeptide S overcomes short term memory deficit induced by sleep restriction by increasing prefrontal cortex activity. *Eur Neuropsychopharmacol* 27(12): 1308–1318.
<https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2017.08.431>
48. Sportiche N, Suntsova N, Methippara M, Bashi T, Mitrani B, Szymusiak R, McGinty D (2010) Sustained sleep fragmentation results in delayed changes in hippocampal-dependent cognitive function associated with reduced dentate gyrus neurogenesis. *Neuroscience* 170(1): 247–258.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.06>
49. Yin M, Chen Y, Zheng, H, Pu T, Marshall C, Wu T, Xiao M (2017) Assessment of mouse cognitive and anxiety-like behaviors and hippocampal inflammation following a repeated and intermittent paradoxical sleep deprivation procedure. *Behav Brain Res* 15(321): 69–78.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.12.034>
50. Zamore Z, Veasey SC (2022) Neural consequences of chronic sleep disruption. *Trends Neurosci* 45(9): 678–691.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2022.05.007>
51. Looi Bashian Karabeg MM, Grauthoff S, Kollert SY, Weidner M, Heiming RS, Jansen F, Lewejohann L (2013) 5-HTT deficiency affects neuroplasticity and increases stress sensitivity resulting in altered spatial learning performance in the Morris water maze but not in the Barnes maze. *PloS One* 8(10): e78238.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078238>
52. Harrison FE, Hosseini AH, McDonald MP (2009) Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behav Brain Res* 198(1): 247–251.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.10.015>
53. Meerlo P, Sgoifo A, Suchecki D (2008) Restricted and disrupted sleep: Effects on autonomic function, neuroendocrine stress systems and stress responsivity. *Sleep Med Rev* 12(3): 197–210.
<https://doi.org/10.1016/j.smrv.2007.07.007>
54. Украинцева ЮВ, Левкович КМ (2022) Негативное влияние нарушений сна на рабочую память может быть опосредовано изменениями углеводного обмена. *Журн неврол психiatr им СС Корсакова Спецвыпуски* 122(5-2): 11–17. [Ukrainitseva YuV, Liaukovich KM (2022) The negative impact of sleep disorders on working memory may be mediated by changes in carbohydrate metabolism. *Zhurn Nevrol I Psikiatrii im SS Korsakova* 122(5-2): 11–17. (In Russ)].
<https://doi.org/10.17116/jnevro202212205211>

Effect of Acute and Chronic Sleep Deficit on Working and Long-Term Memory in Rats**М. В. Chernyshev^{a, *}, М. А. Guseev^a, and I. V. Ekimova^a**^a*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, RAS, St. Petersburg, Russia*^{*}*e-mail: netmisha@mail.ru*

It is known that insufficient sleep or diurnal rhythm disturbances of sleep and wakefulness exert a detrimental effect on cognitive functions. It was thought for a long period that memory consolidation is the most vulnerable link, i.e., information transfer from short-term/working memory to long-term memory. However, there is a progressive number of studies indicating that the most negative consequences of sleep loss are observed in working memory. In our study, we undertook an effort to assess possible disturbances in working memory and long-term memory following sleep loss impact with different protocols in acute and chronic experiment in rats. Sleep in Wistar rats was deprived/restricted by swinging platform technique according to the following protocols: 1 – total sleep deprivation for 18 h; 2 – partial sleep restriction for 24 h (3 h of sleep deprivation alternated with 1 h of sleep opportunity – totally 18 h of sleep deprivation); 3 – chronic partial sleep restriction (conditions 2 for five consistent days). Total sleep deprivation in Y-maze test was shown to result in a significant decrease in spontaneous alternations of maze arms that indicates working memory impairment. This impact in Barnes test did not exert an effect on long-term memory – time spent for seeking a shelter did not change in this task. Acute and chronic sleep restriction induced no changes in working memory and long-term memory. The results obtained allow us to come to conclusion that working memory (in contrast to long-term memory) is a vulnerable component of cognitive function under total sleep deprivation conditions. This negative effect was abolished if periods of sleep deprivation alternated with short periods of sleep opportunities that indicate protective significance of short sleep periods for cognitive functions during sleep deficit. Hence, short-term sleep is helpful for cognitive health and protects working memory, whereas continuous long-term wakefulness impairs it.

Keywords: sleep, deprivation, chronic sleep restriction, cognitive functions, working memory, long-term memory, rats

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**У САМОК МЫШЕЙ НОКАУТОВ ПО ГЕНУ TAAR1
ОТСУТСТВУЕТ РАННИЙ ПОВЕДЕНЧЕСКИЙ ОТВЕТ
НА ОСТРЫЙ ИММОБИЛИЗАЦИОННЫЙ СТРЕСС**

© 2023 г. Е. П. Виноградова¹, Ю. А. Симон¹, А. Ю. Александров¹, В. М. Князева¹*,
Л. Н. Станкевич¹, А. В. Козырева¹, А. А. Александров¹

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: v.m.knyazeva@spbu.ru

Поступила в редакцию 12.09.2023 г.

После доработки 06.10.2023 г.

Принята к публикации 06.10.2023 г.

Целью данной работы было изучение роли TAAR1, представителя семейства рецепторов, ассоциированных со следовыми аминами (trace amine-associated receptors, TAARs) в формировании поведенческого компонента стрессорного ответа. Исследовалось поведение самок мышей нокаутных по гену, кодирующему TAAR1 (TAAR1-KO) и мышей дикого типа (WT) в тестах приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ) и приподнятый О-образный лабиринт (ПОЛ) и тесте принудительного плавания в норме и после неконтролируемого стрессорного воздействия (стресс иммобилизации – 30 мин). В тесте ПКЛ исходные показатели поведения у мышей TAAR1-KO и WT не различались. В тесте ПОЛ исходные показатели уровня тревожности у самок TAAR1-KO по сравнению с самками WT были выше, а двигательной активности ниже. При тестировании мышей в ПОЛ через 30 мин после окончания стрессорного воздействия было обнаружено, что у самок WT увеличился уровень тревожности, снизились показатели двигательной и исследовательской активности. Показатели поведения в тесте ПОЛ у мышей TAAR1-KO до и после стресса оказались идентичными. Спустя 4 ч после стресса – при тестировании в ПКЛ поведенческий компонент стрессорного ответа наблюдался как у мышей TAAR1-KO, так у WT. Различий между мышами TAAR1-KO и WT при тестировании в ПКЛ через 4 ч после стресса не было обнаружено. Через три недели после стресса поведенческий компонент стрессорного ответа сохранялся у обеих групп. В тесте принудительного плавания латентный период до первой неподвижности изначально был больше у мышей TAAR1-KO по сравнению с мышами WT, через 24 ч после стресса этот показатель снизился. В результате мыши TAAR1-KO и WT не различались по всем поведенческим показателям. Через три недели после стресса в группах TAAR1-KO и WT наблюдалось значительное увеличение продолжительности неподвижности и снижение латентного периода до первой неподвижности, различий между группами животных обнаружено не было. Таким образом, мы обнаружили полное отсутствие изменений в поведении сразу после воздействия стрессора у TAAR1-KO по сравнению с мышами WT.

Ключевые слова: рецепторы, ассоциированные со следовыми аминами, TAAR1, тест принудительного плавания, тревожность, приподнятый крестообразный лабиринт, приподнятый круговой лабиринт, кортикотропин-рилизинг-гормон, стресс иммобилизации, вызванные стрессом быстрые изменения поведения

DOI: 10.31857/S0869813923110122, EDN: YBSPJG

ВВЕДЕНИЕ

Следовые амины, относящиеся к группе эндогенных аминов, структурно и метаболически близки к классическим моноаминам [1]. Однако по сравнению с классическими моноаминами они присутствуют в следовых концентрациях и гетерогенно распределены по всему мозгу [2, 3]. Рецепторы следовых аминов (trace amine-associated receptors, TAARs) – это большое семейство белков, принадлежащих к типу рецепторов, сопряженных с G-белком. Наиболее изученным на сегодняшний день является рецептор первого типа – TAAR1 [4], который широко экспрессируется в различных областях головного мозга, включая префронтальную кору, гиппокамп, гипоталамус, миндалину, ядро ложа конечной полоски и мезолимбические структуры (вентральная тегментальная область, дорзальное ядро шва) [3].

Изменение концентрации следовых аминов и/или нарушение функции их рецепторов могут быть связаны с такими психическими расстройствами, как болезнь Альцгеймера, синдром дефицита внимания и гиперактивности, болезнь Паркинсона и шизофрения, а также могут участвовать в формировании депрессивных расстройств [1, 5–9]. Было показано, что агонисты TAAR1 демонстрируют антидепрессивные и анксиолитические свойства [10–12]. Следовые амины и их рецепторы рассматриваются как многообещающая терапевтическая мишень для разработки лекарственных препаратов при лечении многих психоневрологических заболеваний, включая депрессивные расстройства [4, 6].

Изучение механизмов формирования депрессии представляется особенно актуальным, поскольку депрессия является одной из ведущих причин инвалидности во всем мире [13, 14]. Одним из важнейших факторов риска возникновения депрессивных расстройств является стресс [15, 16]. В регуляцию ответа организма на стрессорное воздействие вовлечены отделы лимбической и мезолимбической систем, такие как ядро ложа конечной полоски, центральное ядро миндалевидного тела, голубое пятно ствола головного мозга, кора головного мозга, гиппокамп, т.е. как раз те отделы центральной нервной системы (ЦНС), в которых представлены рецепторы TAAR1. Предполагают, что активация TAAR1 может способствовать стабилизации и восстановлению после дезадаптивных нарушений настроения и усиливать эффекты антидепрессантов и/или анксиолитиков [6].

До сих пор роль системы следовых аминов в формировании поведенческого компонента стрессорного ответа не изучена, и поэтому представляется целесообразным исследовать роль рецепторов TAAR1 в реакциях организма на стрессорное воздействие. Использование моделей на животных играет важную роль в изучении механизмов формирования депрессии [17].

В данном исследовании изучались поведенческие характеристики мышей с нокаутом гена, кодирующего TAAR1, и мышей дикого типа до и после воздействия острого иммобилизационного стресса в тестах приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ), приподнятый О-лабиринт (ПОЛ) и тесте принудительного плавания, применяющихся для оценки тревожного и депрессивноподобного поведения. Работа выполнена на самках, поскольку подавляющее большинство исследований по изучению роли рецепторов следовых аминов в регуляции поведения, так же, как и исследования по поиску механизмов формирования постстрессорных расстройств проводятся в основном на самцах [18, 19]. В то же время риск возникновения депрессии у женщин существенно выше, чем у мужчин [20]. Также показано, что половые стероиды оказывают существенное влияние на поведенческие, эндокринные и вегетативные показатели стрессорного ответа, в частности участвуют в регуляции как базального, так и ситуативного уровня тревожности и вносят вклад в патогенез депрессивных расстройств [21]. В связи с этим необходимо исследовать поведение и реакции на стресс именно у самок.

Задачей данного исследования стало изучение влияния неконтролируемого острого иммобилизационного стресса у самок мышей нокауты по TAAR1 по сравнению с животными WT на формирование раннего и позднего поведенческого компонента стрессорного ответа: двигательную активность, уровень тревожности, исследовательское поведение, депрессивноподобное поведение и эмоциональность.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Исследование проводили на самках мышей нокауты по гену рецептора TAAR1 ($n = 9$), в качестве контроля использовались самки дикого типа WT ($n = 9$). Мыши дикого типа (WT) и TAAR1-KO были получены путем скрещивания (более 20 поколений) гетерозиготных животных TAAR1 C57BL6/129SvJ. Животные в возрасте 10 месяцев были получены из Ресурсного центра вивария научного парка СПбГУ. Средняя масса животных составила 28 ± 3.8 г. Все животные содержались в стандартных условиях при доступе к пище и воде *ad libitum*, в помещении поддерживался 12-часовой цикл свет–темнота. Животные размещались в одиночных боксах ($30 \times 15 \times 17$ см). До начала проведения работ животные находились в лаборатории 7–10 дней и подвергались процедуре хендлинга, чтобы предотвратить возникновение стрессорной реакции на взятие в руки во время проведения эксперимента.

Аппаратура и методы. Для изучения локомоторного, ориентировочно-исследовательского поведения и уровня тревожности животных использовались тесты ПКЛ и ПОЛ. Оба теста широко применяются для оценки анксиолитической активности фармакологических агентов в условиях переменной стрессогенности [23–25].

В ПКЛ и ПОЛ регистрировались следующие параметры: время пребывания животного в открытых рукавах, время, проведенное в открытых рукавах по отношению ко времени, проведенному во всех рукавах (открытые/открытые + закрытые $\times 100$), полная пройденная дистанция за время теста и дистанция в открытых рукавах, количество заходов в открытые рукава, число вертикальных стоек и свешиваний с открытых рукавов лабиринта, длительность груминга, а также количество фекальных болюсов. Длительность эксперимента для каждого животного составляла 5 мин. В случае ПКЛ животное помещали в центр лабиринта носом к открытому рукаву; в тесте ПОЛ мышь высаживали в один из закрытых рукавов на границе с открытым, головой к открытому рукаву. После каждого тестирования поверхность установки протирали спиртом для уничтожения запаховых меток. Регистрация поведения осуществлялась с помощью системы видеомониторинга.

В качестве модели депрессивноподобного поведения использовался тест принудительного плавания в соответствии с существующими протоколами [26, 27]. Установка представляла собой стеклянный цилиндр диаметром 20 см при высоте 45 см. Цилиндр заполняли водой (температура $23\text{--}25^\circ\text{C}$) на высоту 20 см так, чтобы помещенное в него животное плавало и при этом не имело возможности выбраться из цилиндра. Время тестирования составляло 6 мин. Регистрировалась общая длительность неподвижности животного в течение последних 4 мин теста и латентный период первой иммобилизации, длительность которой должна была составлять не менее 1 с.

Модель неконтролируемого иммобилизационного стресса. Через 2 нед. после оценки исходных характеристик поведения исследуемые животные были подвергнуты острому неконтролируемому иммобилизационному стрессу [28]. Для создания иммобилизационного стресса мышам на 30 мин помещали в перфорированные пластиковые пеналы диаметром 3 см, ограничивающие подвижность животных. Длина иммобилизационного пенала варьировала в соответствии с размером животного и в среднем составляла 7 см. Через 30 мин после окончания действия острого не-

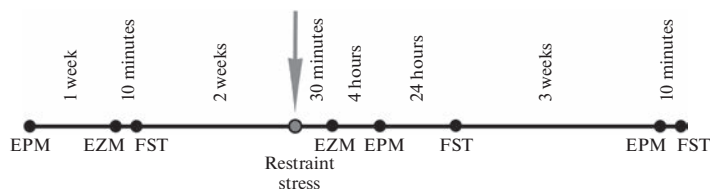


Рис. 1. Схема эксперимента. На оси времени показаны интервалы и реализованные тесты: приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ, EPM), приподнятый О-лабиринт (ПОЛ, EZM), тест принудительного плавания (ПП, FST); стрелкой отмечен период проведения острого стресса иммобилизации.

контролируемого стресса проводилось тестирование животных в тесте ПОЛ, а через 4 ч в тесте ПКЛ. По истечению 24 ч с момента окончания стрессорного воздействия проводился тест принудительного плавания. Схема проведения эксперимента представлена на рис. 1.

Взятие влагалищных мазков. Известно, что поведение самок грызунов может существенно отличаться в разные стадии эстрального цикла (проэструс, эструс, метэструс и диэструс), поскольку половые гормоны могут значительно изменять уровень тревожности, двигательную и исследовательскую активность [29–31]. В связи с этим в эксперимент включались самки только в нерепродуктивной стадии цикла (метэструс и диэструс). Взятие и анализ влагалищных мазков проводился методом вагинального смыва согласно методике, предложенной в работе Сога и соавт. [32]. Окрашивание мазков проводили сразу же после получения с помощью красителя эозина метиленового синего по Май-Грюнвальду. Влажный окрашенный препарат помещали под покровное стекло, минуя стадию высушивания. Непосредственная оценка влагалищного мазка проводилась с помощью световой микроскопии с увеличением от $\times 200$ до $\times 400$. Стадию эстрального цикла определяли по наличию или отсутствию лейкоцитов, ороговевших, эпителиальных и ядерных клеток [33]. Мазки брались ежедневно в течение всего периода эксперимента, начиная со дня получения животных из вивария.

Исследуемое поведение во всех опытах фиксировалось на видеокамеру SONY DCR-NC17E PAL (Япония) и вебкамеру Logitech HD Pro Webcam. Уровень освещенности в экспериментальных комнатах составлял 70 люкс.

Статистическая обработка результатов. Адекватные размеры выборки были определены с использованием уравнения ресурсов. Статистический анализ полученных данных и оценку достоверности различий осуществляли ранговыми непараметрическими критериями. При межгрупповых сравнениях нокаутных животных и животных дикого типа использовался *U*-критерий Манна–Уитни. Для оценки эффективности применяемого стрессорного воздействия применялся парный *T*-критерий Вилкоксона для связанных выборок. В качестве критического уровня значимости принималось $\alpha = 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты теста ПОЛ до стрессорного воздействия. Анализ поведения в тесте ПОЛ выявил, что у TAAR1-КО мышей двигательная активность (общая пройденная дистанция) была статистически значимо ниже (412.5 ± 75 см) по сравнению с мышами WT (621.0 ± 88.6 см) ($p = 0.044$). Исследовательская активность (количество стоек) также значимо была ниже у TAAR1-КО (7.0 ± 1.6) по сравнению с WT (9.5 ± 1.8) ($p = 0.033$) (рис. 2а).

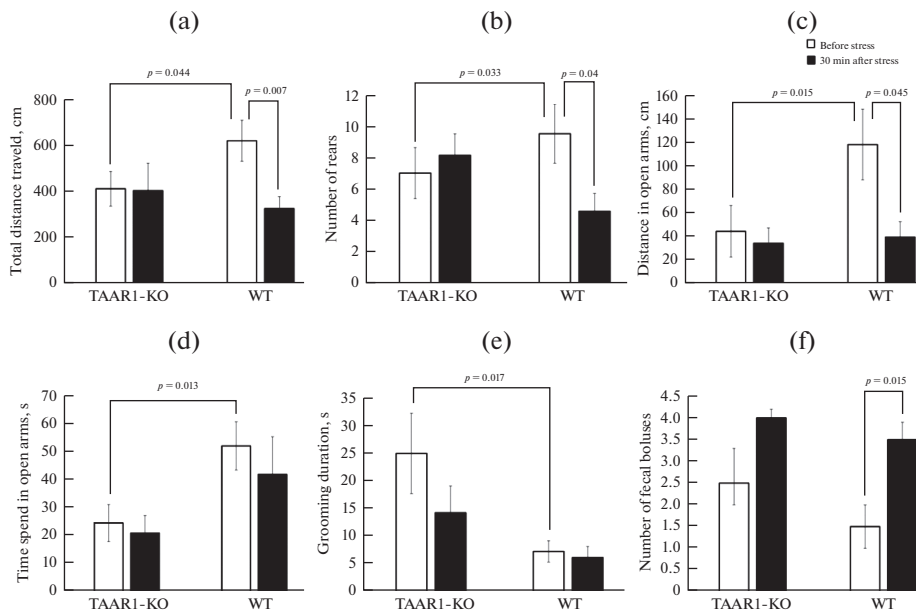


Рис. 2. Поведенческий профиль мышей TAAR1-KO и WT в тесте ПОЛ до и через 30 мин после стрессорного воздействия. (a) — пройденная дистанция (см), (b) — количество стоек, (c) — дистанция, пройденная в открытых рукавах (см), (d) — время, проведенное в открытых рукавах, с, (e) — длительность груминга, с, (f) — количество болюсов. Данные представлены в виде среднего $\pm$ SEM.

Уровень тревожности у мышей TAAR1-KO по сравнению с мышами WT был выше по ряду параметров: пройденная дистанция в открытых рукавах (44.5 ± 21.8 и 118.1 ± 50.5 см, $p = 0.015$), длительность пребывания в открытых рукавах (24.4 ± 6.6 и 52.3 ± 8.6 с, $p = 0.013$), процент времени нахождения в открытых рукавах относительно общего времени нахождения в рукавах составил (8.1 ± 2.2 и 17.4 ± 2.8 , $p = 0.01$), количество заходов в открытые рукава (6.2 ± 1.3 и 10.1 ± 1.3 , $p = 0.032$), количество свешиваний (6.0 ± 1.4 и 11.2 ± 2.3 , $p = 0.048$). Кроме того, длительность актов груминга также была выше у мышей TAAR1-KO (25.8 ± 7.2 с) по сравнению с мышами WT (7.2 ± 1.9 с) ($p = 0.03$) (рис. 2). Исследование вегетативных показателей эмоционального состояния животных — количества фекальных болюсов, не выявило статистически значимых различий между группами животных (TAAR1-KO: 3.0 ± 0.8 ; WT: 1.5 ± 0.4) (рис. 2f).

Результаты теста ПОЛ через 30 мин после стрессорного воздействия. Через 30 мин после окончания действия острого неконтролируемого иммобилизационного стресса в группе мышей TAAR1-KO все поведенческие показатели статистически значимо не отличались от зарегистрированных до стрессорного воздействия (рис. 2). В отличие от TAAR1-KO, в группе мышей WT наблюдалось статистически значимое изменение целого ряда показателей: снижение общей пройденной дистанции (с 621.0 ± 88.6 до 326.3 ± 52.1 см, $p = 0.007$) и количества стоек (с 9.5 ± 1.8 до 4.5 ± 1.1 , $p = 0.04$), снижение дистанции, пройденной в открытых рукавах (с 118.1 ± 50.5 до 39.5 ± 13.1 см, $p = 0.045$) и увеличение количества фекальных болюсов (с 1.5 ± 0.5 до 3.5 ± 0.4 , $p = 0.015$). Анализ межгрупповых различий не выявил статистически значимых результатов между группами животных после стресса.

Таблица 1. Поведенческий профиль мышей TAAR1-KO и WT в тесте ПКЛ

Поведенческие показатели	Генотип	
	TAAR1-KO	WT
Количество заходов в открытые рукава	9.5 ± 1.9	10.4 ± 1.3
Время, проведенное в открытых рукавах (с)	50.1 ± 9.2	53.8 ± 12.7
Дистанция, пройденная в открытых рукавах (см)	146.6 ± 38.9	204.6 ± 77.2
Количество свешиваний	10.3 ± 2.5	9.4 ± 1.7
Длительность груминга (с)	7.5 ± 2.1	11.7 ± 6.3
Количество стоек	21.1 ± 1.7	14.2 ± 2.2*
Общая пройденная дистанция (см)	1158.3 ± 149.4	1231.0 ± 245.1
Количество фекальных болюсов	1.5 ± 0.8	1.8 ± 0.6
Время, проведенное в открытых рукавах по отношению ко времени, проведенному во всех рукавах (открытые/открытые + закрытые × 100) (%)	17.5 ± 3.3	18.8 ± 4.5

Данные представлены в виде среднего ± SEM, * – $p < 0.05$.

Результаты теста ПКЛ до стрессорного воздействия. По показателям двигательной и исследовательской активности, уровню тревожности, длительности груминга и вегетативным компонентам эмоционального состояния статистически значимые отличия между TAAR1-KO и WT зарегистрированы не были (табл. 1). При исследовании поведенческих характеристик в тесте ПКЛ были получены статистически значимые различия между группами животных только по количеству вертикальных стоек, которых было больше зарегистрировано у мышей TAAR1-KO (TAAR1-KO: 21.1 ± 1.7 ; WT: 14.2 ± 2.2 , $p = 0.007$).

Результаты теста ПКЛ через четыре часа после стрессорного воздействия. Через четыре часа после окончания действия острого неконтролируемого иммобилизационного стресса у мышей TAAR1-KO статистически значимо снижалось количество заходов в открытые рукава (с 9.5 ± 1.9 до 3.6 ± 1.1 , $p = 0.019$), длительность пребывания в открытых рукавах (с 50.0 ± 6.6 до 12.25 ± 5.6 с, $p = 0.011$), дистанция, пройденная в открытых рукавах (с 204.6 ± 77.2 до 45.4 ± 38.9 см, $p = 0.012$), время, проведенное в открытых рукавах по отношению ко времени, проведенному во всех рукавах в % (с 17.5 ± 3.3 до 4.2 ± 1.9 , $p = 0.017$), а также количество свешиваний (с 10.0 ± 2.5 до 1.8 ± 0.5 , $p = 0.013$) и стоек (с 21.1 ± 1.7 до 10.8 ± 2.7 , $p = 0.041$).

В группе мышей дикого типа было зарегистрировано статистически значимое снижение заходов в открытые рукава (с 10.4 ± 1.3 до 3.4 ± 0.6 , $p = 0.017$), сократилась как общая дистанция (с 1231.0 ± 245.0 до 580.2 ± 96.4 см, $p = 0.015$), так и дистанция, пройденная в открытых рукавах (с 204.6 ± 77.2 до 35.8 ± 11.7 см, $p = 0.017$), количество свешиваний также претерпело изменения в сторону их сокращения (с 9.4 ± 1.7 до 1.8 ± 0.6 , $p = 0.007$) (рис. 3). Достоверных различий между группами TAAR1-KO и WT спустя 4 ч после окончания действия стрессора выявлено не было.

Результаты теста ПКЛ через три недели после стрессорного воздействия. Через три недели после окончания действия острого неконтролируемого иммобилизационного стресса двигательная (общая пройденная дистанция) и исследовательская активность (количество стоек) у мышей обеих групп осталась на уровне, регистрируемом через 4 ч после стрессорного воздействия (рис. 3). Как нокаутные животные, так и животные дикого типа демонстрировали статистически значимое снижение времени пребывания в открытых рукавах (TAAR1-KO: 50.0 ± 6.63 и 5.8 ± 1.5 с, $p = 0.004$; WT: 54.0 ± 8.6 и 3.7 ± 1.1 с, $p = 0.008$), снижение пройденной дистанции в открытых ру-

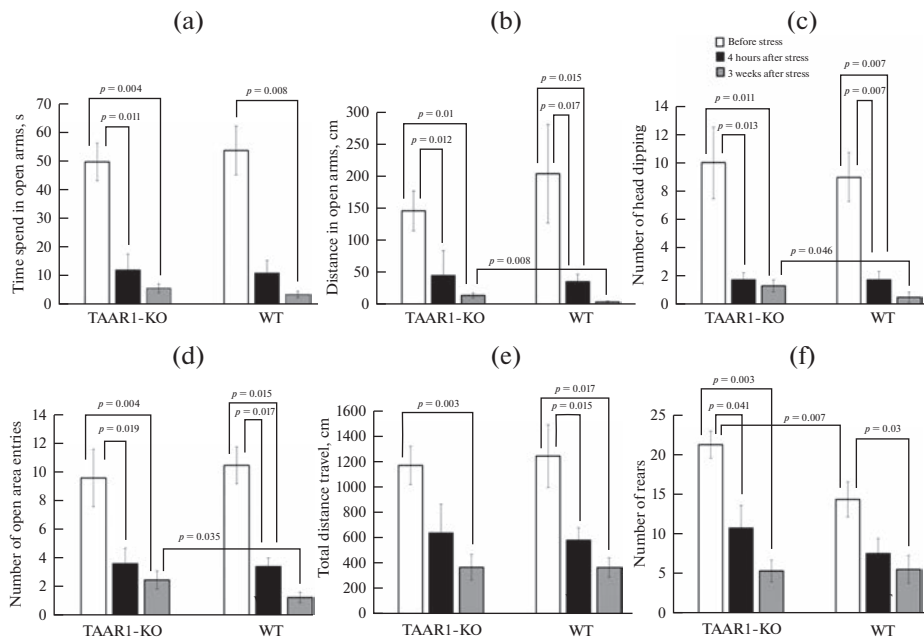


Рис. 3. Поведенческий профиль мышей TAAR1-KO и WT в тесте ПКЛ до и после стрессового воздействия. (a) — время, проведенное в открытых рукавах, с; (b) — дистанция, пройденная в открытых рукавах, см; (c) — количество свешиваний; (d) — количество заходов в открытые рукава; (e) — пройденная дистанция (см), (f) — количество стоек. Данные представлены в виде среднего $\pm$ SEM.

кавах (TAAR1-KO: 146.6 ± 31.2 и 14.4 ± 3.8 см, $p = 0.01$; WT: 204.6 ± 77.2 и 4.3 ± 1.3 см, $p = 0.015$), сокращение количества заходов в открытые рукава (TAAR1-KO: 9.5 ± 1.9 и 2.5 ± 0.6 , $p = 0.004$; WT: 10.4 ± 1.3 и 1.3 ± 0.35 , $p = 0.015$), снижение процента времени, проведенного в открытых рукавах по отношению ко времени, проведенному во всех рукавах (TAAR1-KO: 17.5 ± 3.3 и 2.0 ± 0.5 , $p = 0.004$; WT: 18.8 ± 4.5 и 1.3 ± 0.4 , $p = 0.006$).

Анализ поведения через 3 недели после стрессорного воздействия выявил статистически значимые различия между группами мышей. Уровень тревожности TAAR1-KO животных был ниже уровня, регистрируемого в группе WT. Дистанция, пройденная в открытых рукавах, составляла 14.4 ± 3.8 для TAAR1-KO и 4.3 ± 1.4 см для WT ($p = 0.008$) (рис. 2b), количество свешиваний было статистически значимо меньше у мышей WT (0.57 ± 0.36) по сравнению с мышами TAAR1-KO (1.4 ± 0.4) ($p = 0.046$), количество заходов в открытые рукава также было достоверно меньше у мышей WT (1.3 ± 0.4) по сравнению с TAAR1-KO (2.5 ± 0.6) ($p = 0.035$) (рис. 3).

Результаты теста принудительного плавания до стрессорного воздействия. Латентный период первой иммобилизации был достоверно выше у TAAR1-KO по сравнению с WT (180.5 ± 29.9 и 104.8 ± 19.6 с соответственно, $p = 0.021$). Длительность иммобилизации, анализируемая по последним 4 мин теста, статистически не отличалась между группами животных (рис. 4).

Результаты теста принудительного плавания через 24 ч после стрессорного воздействия. Спустя сутки после окончания действия острого неконтролируемого иммобилизационного стресса было зарегистрировано статистически значимое уменьшение времени до возникновения первой иммобилизации как у TAAR1-KO

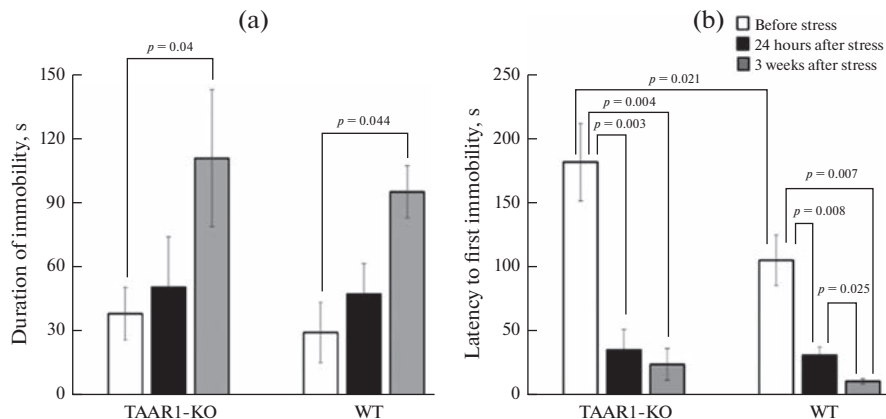


Рис. 4. Поведение мышей TAAR1-KO и WT в тесте вынужденного плавания до и после стрессового воздействия. (a) – длительность иммобилизации, с; (b) – латентный период первой иммобилизации, с. Данные представлены в виде среднего $\pm$ SEM.

(с 180.5 ± 29.9 до 35.2 ± 16.0 с, $p = 0.003$), так и у группы WT (с 104.8 ± 19.6 до 31.1 ± 6.5 с, $p = 0.008$). Длительность пассивного плавания (иммобилизации) не претерпела достоверных изменений в обеих группах животных (рис. 4b).

Результаты теста принудительного плавания через три недели после стрессорного воздействия. Через три недели после окончания действия стрессорного воздействия было показано статистически значимое увеличение длительности иммобилизации по сравнению с первоначальным уровнем как у TAAR1-KO (38.8 ± 12.3 и 111.5 ± 32.1 с, $p = 0.04$), так и у WT (30.0 ± 14.2 и 95.7 ± 12.2 с, $p = 0.044$). Анализ латентного периода первой иммобилизации до и через три недели после действия стресса обнаружил уменьшение латентного периода первого акта иммобилизации и для TAAR1-KO (180.5 ± 29.9 и 24.1 ± 12.5 с, $p = 0.004$), и для WT (104.8 ± 19.6 и 11.0 ± 2.2 с, $p = 0.007$). Кроме того, сравнение латентного периода первой иммобилизации через сутки и спустя три недели после стресса выявило значимое уменьшение латентного периода у мышей WT (31.1 ± 6.5 и 11.0 ± 2.2 с, $p = 0.025$), но не у животных TAAR1-KO.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При сравнении поведения самок мышей TAAR1-KO и WT в тесте ПКЛ показатели поведения между группами практически не отличались. Достоверные отличия были обнаружены только по количеству вертикальных стоек (повышенное исследовательское поведение), которых было больше в группе TAAR-KO. По данным Wolinsky и соавт. [34], полученных на самцах, в тесте ПКЛ также не было обнаружено различий в поведении мышей TAAR1-KO и WT. Что касается вертикальных стоек, похожий результат получен в работе Жукова и соавт. [35], изучавших поведение мышей TAAR1-KO и WT в тесте открытое поле. В этой работе было показано, что самцы мышей TAAR1-KO чаще демонстрируют вертикальные стойки, чем животные дикого типа.

В отличие от этих результатов, при тестировании в ПОЛ были показаны статистически значимые различия между животными двух групп. В тесте ПОЛ у самок мышей TAAR1-KO был выявлен более высокий уровень тревожности по всем реги-

стрируемым показателям по сравнению с мышами WT, двигательная и исследовательская активность также была ниже у мышей TAAR1-KO.

Тест ПОЛ применяется наряду с тестом ПКЛ для оценки уровня тревожности. На мышах было показано, что тест ПОЛ является более чувствительным к оценке действия бензодиазепинов, чем ПКЛ [36, 37]. В нашей работе была выявлена большая чувствительность теста ПОЛ в оценке влияния нокаута гена *taar1* на поведение мышей. Данные по самкам по TAAR1-KO были получены впервые.

При тестировании в тесте вынужденного плавания длительность общей иммобилизации не различалась у мышей TAAR1-KO и WT, латентный период первой иммобилизации был достоверно выше у мышей TAAR1-KO.

Влияние стресса. При тестировании мышей в ПОЛ через 30 мин после окончания стрессорного воздействия было обнаружено, что самки WT демонстрировали выраженный поведенческий ответ на стресс. У них резко увеличился уровень тревожности и существенно снизились показатели двигательной активности и исследовательского поведения. У мышей TAAR1-KO напротив, не наблюдалось никаких достоверных изменений в поведении. Показатели поведения в тесте ПОЛ у мышей TAAR1-KO до и после стресса оказались идентичными. Таким образом, у мышей TAAR1-KO обнаружено отсутствие раннего поведенческого ответа на стрессорное воздействие (неконтролируемый острый стресс иммобилизации).

Спустя 4 ч после окончания стрессорного воздействия при тестировании в ПКЛ выраженный поведенческий компонент стрессорного ответа наблюдался как у мышей TAAR1-KO, так у WT. В обеих группах мышей отмечалось значимое увеличение уровня тревожности и снижение ряда показателей двигательной и исследовательской активности. Различия между животными TAAR1-KO и WT при тестировании в ПКЛ через 4 ч после стресса не были выявлены.

Повторное тестирование в ПКЛ через 3 недели после стресса показало, что у мышей TAAR1-KO и у мышей WT продолжалось дальнейшее снижение двигательной и исследовательской активности и повышение уровня тревожности, однако эти различия не достигали уровня статистической значимости. И хотя внутригрупповых достоверных различий показателей поведения в ПКЛ через 4 ч и через 3 недели после стресса обнаружено не было, появились межгрупповые различия. При тестировании через 3 недели у мышей WT по сравнению с мышами TAAR1-KO было зарегистрировано уменьшение дистанции, пройденной в открытых рукавах, уменьшение количества заходов в открытые рукава и количества свешиваний. Таким образом, поведенческий ответ через 3 недели после стрессорного воздействия у мышей TAAR1-KO оказался слабее по ряду параметров, характеризующих уровень тревожности.

Анализ поведения мышей в тесте принудительного плавания не выявил различий между мышами TAAR1-KO и мышами WT по длительности иммобилизации, но латентный период первой иммобилизации был больше у нокаутных животных.

При повторном тестировании через 24 ч после стрессорного воздействия у животных обеих групп не было выявлено достоверных изменений длительности иммобилизаций, однако в группе TAAR1-KO произошло достоверное снижение времени до первой иммобилизации. В результате группы мышей TAAR1-KO и WT перестали отличаться по всем показателям поведения в тесте принудительного плавания.

При тестировании животных через три недели после острого иммобилизационного стресса в обеих группах TAAR1-KO и WT отмечено достоверное увеличение длительности иммобилизации и снижение латентного периода до первой иммобилизации. Различий между группами TAAR1-KO и WT обнаружено не было.

В многочисленных исследованиях на грызунах показано, что после самых разнообразных стрессорных воздействий у животных наблюдается увеличение длительности иммобилизации и укорочение латентного периода первой иммобилиза-

ции [38–42]. В качестве одного из вариантов трактовки этих изменений предполагается развитие депрессивно-подобного состояния с отказом от борьбы, так называемое “поведение отчаяния” [43, 44]. Однако переход к пассивному поведению может отражать адаптивную стратегию преодоления стресса для сохранения энергии, а не отказ от попыток найти выход из ситуации [45, 46]. Наши данные свидетельствуют в пользу второго предположения, поскольку через сутки после стресса не было отмечено никаких изменений в поведении в тесте принудительного плавания, а при повторении ситуации (тестирование в третий раз через три недели) животные демонстрировали заметные изменения в поведении. Они практически сразу с заметным сокращением латентного периода до первой иммобилизации переходили к пассивному поведению, что приводило к существенному увеличению длительности иммобилизации.

Ранний поведенческий ответ на стрессорное воздействие. Считается, что кортикотропин-рилизинг гормон (КРГ) играет важную роль в регуляции поведенческого ответа на стресс [47–50]. Известно, что уже через 5–10 мин после оптогенетической стимуляции КРГ-нейронов центрального ядра амигдалы инициируется тревожноподобное поведение [51]. КРГ обладает выраженным анксиогенным эффектом, хемогенетическая активация КРГ-нейронов центрального ядра амигдалы усиливала тревожно-подобное поведение через 30–40 мин после инъекции в тесте ПОЛ [52]. В свою очередь антагонисты КРГ-рецепторов весьма эффективно снимают изменения поведения, вызываемые стрессом [47, 53]. Подавление экспрессии КРГ оказывает анксиолитическое действие на стресс-индуцированную тревожность [54]. Система КРГ в тесном функциональном взаимодействии с моноаминергическими системами вовлекает в стрессорный ответ различные области мозга [50]. Предполагается, что система КРГ особенно важна в ситуациях, когда необходимо вовлечь в ответ на воздействие стрессора не только гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую систему [55], но и ЦНС [47].

В нашей работе было обнаружено, что у мышей TAAR1-KO при тестировании в ПОЛ спустя 30 мин после окончания действия стресса отсутствуют какие-либо изменения поведения по сравнению с тестированием до стресса. Отсутствие раннего поведенческого ответа на стрессорное воздействие у мышей TAAR1-KO указывает на то, что TAAR1 необходимы для работы систем КРГ при реализации раннего поведенческого ответа на стресс.

Еще один аспект действия КРГ — его воздействие на память. Показано, что во время краткосрочного стресса КРГ усиливает синаптическую пластичность [56], улучшает запоминание в задачах, требующих участия гиппокампа [57] и усиливает долговременную потенциацию в гиппокампе [58]. В нашей работе было показано, что при тестировании в ПКЛ через три недели после стресса у мышей TAAR1-KO обнаруживается ослабленный поведенческий ответ на стресс, по сравнению с мышами WT. Это может быть связано со снижением эмоциональной памяти, возникающим при предполагаемых нарушениях в работе системы КРГ из-за нокаутирования TAAR1.

Таким образом, сравнение поведения самок мышей TAAR1-KO и WT в норме и после действия стресса иммобилизации показало, что основным отличием мышей TAAR1-KO является отсутствие раннего компонента стрессорного поведенческого ответа.

Важно отметить, что несмотря на то, что действие стрессора было относительно коротким (30 мин), существенные изменения в поведении самок мышей сохранялись и даже усиливались через три недели после окончания стрессорного воздействия. Возможно, что столь длительные изменения связаны с особенностями формирования стрессорного ответа у женских особей и более высокой вероятностью развития разного типа стрессорных расстройств, включая депрессию [20, 21].

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все проводимые процедуры соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации, международным нормам по проведению медикобиологических исследований с использованием животных [22] и рекомендациям этического комитета биологического факультета СПбГУ (протокол № 131-03-2 от 17 февраля 2022 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда, номер проекта 22-25-00006.

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодарим виварий Ресурсного центра Научного парка СПбГУ за предоставление нокаутных животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и разработка дизайна исследования (Е.П.В., А.А.А.), сбор данных (Е.П.В., Ю.А.С., В.М.К., А.В.К., Л.Н.С.), анализ и интерпретация данных (Е.П.В., Ю.А.С., А.Ю.А.), статистическая обработка комплекса данных (А.Ю.А.), написание и редактирование манускрипта (Е.П.В., В.М.К., Ю.А.С., А.А.А., Л.Н.С.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lindemann L, Hoener MC* (2005) A renaissance in trace amines inspired by a novel GPCR family. *Trends Pharmacol Sci* 26: 274–281.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.03.007>
2. *Berry MD, Gainetdinov RR, Hoener MC, Shahid M* (2017) Pharmacology of human trace amine-associated receptors: therapeutic opportunities and challenges. *Pharmacol Ther* 180: 161–180.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.07.002>
3. *Rutigliano G, Accorroni A, Zucchi R* (2018) The case for TAAR1 as a modulator of central nervous system function. *Front Pharmacol* 8: 987.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00987>
4. *Gainetdinov RR, Hoener MC, Berry MD* (2003) Trace Amines and Their Receptors. *Pharmacol Rev* (2018) 70(3): 549–620.
<https://doi.org/10.1124/pr.117.015305>
5. *Branchek TA, Blackburn TP* Trace amine receptors as targets for novel therapeutics: legend, myth and fact. *Curr Opin Pharmacol* 3(1): 90–97.
[https://doi.org/10.1016/s1471-4892\(02\)00028-0](https://doi.org/10.1016/s1471-4892(02)00028-0)
6. *Pei Y, Asif-Malik A, Canales JJ* (2016) Trace amines and the trace amine-associated receptor 1: pharmacology, neurochemistry, and clinical implications. *Front Neurosci* 10: 148.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00148>
7. *Berry MD* (2007) The potential of trace amines and their receptors for treating neurological and psychiatric diseases. *Rev Recent Clin Trials* 2(1): 3–19.
<https://doi.org/10.2174/157488707779318107>
8. *Sotnikova TD, Caron MG, Gainetdinov RR* (2009) Trace Amine-Associated Receptors as Emerging Therapeutic Targets. *Mol Pharmacol* 76(2): 229–235.
<https://doi.org/10.1124/mol.109.055970>
9. *Rutigliano G, Zucchi R* (2020) Molecular Variants in Human Trace Amine-Associated Receptors and Their Implications in Mental and Metabolic Disorders. *Cell Mol Neurobiol* 40(2): 239–255.
<https://doi.org/10.1007/s10571-019-00743-y>
10. *Revel FG, Moreau JL, Gainetdinov RR, Bradaia A, Sotnikova TD, Mory R, Durkin S, Zbinden KG, Norcross R, Meyer CA, Metzler V, Chaboz S, Ozmen L, TrubeG, Pouzet B, Bettler B, Caron MG,*

- Wettstein JG, Hoener MC (2011) TAAR1 activation modulates monoaminergic neurotransmission, preventing hyperdopaminergic and hypoglutamatergic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(20): 8485–8490.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1103029108>
11. Revel FG, Moreau JL, Gainetdinov RR, Ferragud A, Velázquez-Sánchez C, Sotnikova TD, Morairty SR, Harmeier A, Zbinden GK, Norcross RD, Bradaia A, Kilduff TS, Biemans B, Pouzet B, Caron MG, Canales JJ, Wallace TL, Wettstein JG, Hoener MC (2012) Trace amine-associated receptor 1 partial agonism reveals novel paradigm for neuropsychiatric therapeutics. *Biol Psychiatry* 72: 934–942.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.05.014>
 12. Revel FG, Moreau JL, Pouzet B, Mory R, Bradaia A, Buchy D, Metzler V, Chaboz S, Groebke Zbinden K, Galley G, Norcross RD, Tuerck D, Bruns A, Morairty SR, Kilduff TS, Wallace TL, Risterucci C, Wettstein JG, Hoener MC (2013) A new perspective for schizophrenia: TAAR1 agonists reveals antipsychotic- and antidepressant-like activity, improve cognition and control body weight. *Mol Psychiatry* 18: 543–556.
<https://doi.org/10.1038/mp.2012.57>
 13. Lopez AD, Murray CC (1998) The global burden of disease, 1990–2020. *Nat Med* 4: 1241–1243.
<https://doi.org/10.1038/3218>
 14. Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Koretz D, Merikangas KR, Rush AJ, Walters EE, Wang PS (2003) The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *Jama* 289: 3095–3105.
<https://doi.org/10.1001/jama.289.23.3095>
 15. Krishnan V, Nestler EJ (2008) The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455: 894–902.
<https://doi.org/10.1038/nature07455>
 16. Pizzagalli DA (2014) Depression, stress, and anhedonia: toward a synthesis and integrated model. *Ann Rev Clin Psychol* 10: 393–423.
<https://doi.org/10.1146/annurev-clinpsy-050212-185606>
 17. Hao Y, Ge H, Sun M, Gao Y (2019) Selecting an Appropriate Animal Model of Depression. *Int J Mol Sci* 20: 4827.
<https://doi.org/10.3390/ijms20194827>
 18. Cryan JF, Mombereau C (2004) In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Mol Psychiatry* 9: 326–357.
<https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001457>
 19. Krishnan V, Nestler EJ (2008) The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455: 89–902.
<https://doi.org/10.1038/nature07455>
 20. Kessler RC, McGonagle KA, Swartz M, Blazer DG, Nelson CB (1993) Sex and depression in the National Comorbidity Survey I: Lifetime prevalence, chronicity and recurrence. *J Affect Disord* 29: 85–96.
[https://doi.org/10.1016/0165-0327\(93\)90026-g](https://doi.org/10.1016/0165-0327(93)90026-g)
 21. McEwen BS, Milner TA (2017) Understanding the Broad Influence of Sex Hormones and Sex Differences in the Brain. *J Neurosci Res* 95: 24–39.
<https://doi.org/10.1002/jnr.23809>
 22. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimentation and other Scientific Purposes. 1986.
 23. Walf AA, Frye CA (2007) The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* 2: 322–328.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>
 24. Pellow S, File SE (1986) Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 24(3): 525–529.
[https://doi.org/10.1016/0091-3057\(86\)90552-6](https://doi.org/10.1016/0091-3057(86)90552-6)
 25. Braun AA, Skelton MR, Vorhees CV, Williams MT (2011) Comparison of the elevated plus and elevated zero mazes in treated and untreated male Sprague-Dawley rats: Effects of anxiolytic and anxiogenic agents. *Pharmacol Biochem Behav* 97(3): 406–415.
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2010.09.013>
 26. Can A, Dao DT, Arad M, Terrillion CE, Piantadosi SC, Gould TD (2012) The Mouse Forced Swim Test. *J Vis Exp* 59: e3638.
<https://doi.org/10.3791/3638>
 27. Yankelevitch-Yahav R, Franko M, Huly A, Doron R (2015) The Forced Swim Test as a Model of Depressive-like Behavior. *J Vis Exp* 97: e52587.
<https://doi.org/10.3791/52587>
 28. Birmann PT, Domingues M, Casaril AM, Smaniotto TA, Hartwig D, Jacob RG, Savegnago L (2021) A pyrazole-containing selenium compound modulates neuroendocrine, oxidative stress, and behavioral responses to acute restraint stress in mice. *Behav Brain Res* 396: 112874.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112874>

29. Galeeva A, Tuohimaa P (2001) Analysis of mouse plus-maze behavior modulated by ovarian steroid. *Behav Brain Res* 119(1): 41–47.
[https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(00\)00341-7](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(00)00341-7)
30. Виноградова ЕП, Зайченко ИИ, Жуков ДА (1996) Влияние стресса на уровень тревожности у самок белых крыс в различные стадии эстрального цикла. *Журн высш нервн деятелън им ИП Павлова* 46(4): 769–775. [Vinogradova EP, Zaichenko IN, Zhukov DA (1996) The effect of stress on the anxiety level in female white rats at different stages of the estrous cycle. *Zh Vyssh Nerv Deiat im IP Pavlova* 46(4): 769–775. (In Russ)].
31. Scholl JL, Afzal A, Fox LC, Watt MJ, Forster GL (2019) Sex differences in anxiety-like behaviors in rats. *Physiol Behav* 211: 112670.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112670>
32. Cora MC, Kooistra L, Travlos G (2015) Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. *Toxicol Pathol* 43: 776–793.
<https://doi.org/10.1177/0192623315570339>
33. Felicio LS, Nelson JF, Finch CE (1984) Longitudinal studies of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: II. Cessation of cyclicity and the duration of persistent vaginal cornification. *Biol Reprod* 31: 446–453.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod31.3.446>
34. Wolinsky TD, Swanson CJ, Smith KE, Zhong H, Borowsky B, Seeman P, Branchek T, Gerald CP (2007) The Trace Amine 1 receptor knockout mouse: an animal model with relevance to schizophrenia. *Genes Brain Behav* 6(7): 628–639.
<https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2006.00292.x>
35. Zhukov IS, Karpova IV, Krotova NA, Tissen IY, Demin KA, Shabanov PD, Budygin EA, Kalueff AV, Gainetdinov RR (2022) Enhanced Aggression, Reduced Self-Grooming Behavior and Altered 5-HT Regulation in the Frontal Cortex in Mice Lacking Trace Amine-Associated Receptor 1 (TAAR1). *Int J Mol Sci* 23(22): 14066.
<https://doi.org/10.3390/ijms232214066>
36. Kulkarni SK, Singh K, Bishnoi M (2007) Elevated zero maze: a paradigm to evaluate antianxiety effects of drugs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 29: 343–348.
<https://doi.org/10.1358/mf.2007.29.5.1117557>
37. Tucker LB, McCabe JT (2017) Behavior of Male and Female C57BL/6J Mice Is More Consistent with Repeated Trials in the Elevated Zero Maze than in the Elevated Plus Maze. *Front Behav Neurosci* 11: 13.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00013>
38. Liu J, Hester K, Pope C (2021) Dose- and time-related effects of acute diisopropylfluorophosphate intoxication on forced swim behavior and sucrose preference in rats. *Neurotoxicology* 82: 82–88.
<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2020.11.007>
39. Armario A, Gavalda A, Marti J (1995) Comparison of the behavioural and endocrine to forced swimming stress in five inbred strains of rats. *Psychoneuroendocrinology* 20: 879–890.
[https://doi.org/10.1016/0306-4530\(95\)00018-6](https://doi.org/10.1016/0306-4530(95)00018-6)
40. Swiergiel AH, Leskov IL, Dunn AJ (2008) Effects of chronic and acute stressors and CRF on depression-like behavior in mice. *Behav Brain Res* 186(1): 32–40.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.07.018>
41. Tang J, Yu W, Chen S, Gao Z, Xiao B (2018) Microglia Polarization and Endoplasmic Reticulum Stress in Chronic Social Defeat Stress Induced Depression, Mouse. *Neurochem Res* 43: 985–994.
<https://doi.org/10.1007/s11064-018-2504-0>
42. Leschik J, Gentile A, Cicek C, P'eron S, Tevosian M, Beer A, Radyushkin K, Bludau A, Ebner K, Neumann I, Singewald N, Berninger B, Lessmann V, Lutz B (2022) Brain-derived neurotrophic factor expression in serotonergic neurons improves stress resilience and promotes adult hippocampal neurogenesis. *Progr Neurobiol* 217: 102333.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2022.102333>
43. Rygula R, Abumaria N, Flugge G, Fuchs E, Ruther E, Havemann-Reinecke U (2005) Anhedonia and motivational deficits in rats: impact of chronic social stress. *Behav Brain Res* 162: 127–134.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.03.009>
44. Overstreet DH, Friedman E, Mathé AA, Yadid G (2005) The Flinders Sensitive Line rat: a selectively bred putative animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 739–759.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.03.015>
45. Commons KG, Cholanians AB, Babb JA, Ehlinger DG (2017) The Rodent Forced Swim Test Measures Stress-Coping Strategy, Not Depression-like Behavior. *ACS Chem Neurosci* 8: 955–960.
<https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.7b00042>
46. de Kloet ER, Molendijk ML (2016) Coping with the Forced Swim Stressor: Towards Understanding an Adaptive Mechanism. *Neural Plasticity* 2016: 6503162.
<https://doi.org/10.1155/2016/6503162>

47. Koob GF (1999) Corticotropin-releasing factor, norepinephrine, and stress. *Biol Psychiatry* 46: 1167–1180.
[https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(99\)00164-x](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(99)00164-x)
48. Stanton LM, Price AJ, Manning EE (2023) Hypothalamic corticotrophin releasing hormone neurons in stress-induced psychopathology: Reevaluation of synaptic contributions. *J Neuroendocrinol* 35: e13268.
<https://doi.org/10.1111/jne.13268>
49. Valentino RJ, Rudoy C, Saunders A, Liu XB, Van Bockstaele EJ (2001) Corticotropin-releasing factor is preferentially colocalized with excitatory rather than inhibitory amino acids in axon terminals in the peri-locus coeruleus region. *Neuroscience* 106: 375–384.
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(01\)00279-2](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(01)00279-2)
50. Gallagher JP, Orozco-Cabal LF, Liu J, Shinnick-Gallagher P (2008) Synaptic physiology of central CRH system. *Eur J Pharmacol* 583: 215–225.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.11.075>
51. Mazzitelli M, Yakhnitsa V, Neugebauer B, Neugebauer V (2022) Optogenetic manipulations of CeA-CRF neurons modulate pain- and anxiety-like behaviors in neuropathic pain and control rats. *Neuropharmacology* 210: 109031.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2022.109031>
52. Paretkara T, Dimitrova E (2018) The central amygdala corticotropin-releasing hormone (CRH) neurons modulation of anxiety-like behavior and hippocampus-dependent memory in mice. *Neuroscience* 390: 187–197.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.08.019>
53. Holsboer F, Ising M (2008) Central CRH system in depression and anxiety-evidence from clinical studies with CRH1. *Eur J Pharmacol* 583: 350–357.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.12.032>
54. Henckens MJ, Deussing JM, Chen A (2016) Region-specific roles of the corticotropin-releasing factor-urocortin system in stress. *Nat Rev Neurosci* 17: 636–651.
<https://doi.org/10.1038/nrn.2016.94>
55. Herman JP, McKlveen JM, Ghosal S, Kopp B, Wulsin A, Makinson R, Scheimann J, Myers B (2016) Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. *Compr Physiol* 6: 603–621.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c150015>
56. Blank T, Nijholt I, Grammatopoulos DK, Randeva HS, Hillhouse E, Spiess J (2003) Corticotropin-Releasing Factor Receptors Couple to Multiple G-Proteins to Activate Diverse Intracellular Signaling Pathways in Mouse Hippocampus: Role in Neuronal Excitability and Associative Learning. *J Neurosci* 23: 700–707.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-02-00700.2003>
57. Blank T, Nijholt I, Eckart K, Spiess J (2002) Priming of Long-Term Potentiation in Mouse Hippocampus by Corticotropin-Releasing Factor and Acute Stress: Implications for Hippocampus-Dependent Learning. *J Neurosci* 22: 3788–3794.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-09-03788.2002>
58. Pollandt S, Liu J, Orozco-Cabal L, Grigoriadis DE, Vale WW, Gallagher JP, Shinnick-Gallagher P (2006) Cocaine withdrawal enhances long-term potentiation induced by corticotropin-releasing factor at central amygdala glutamatergic synapses via CRF1, NMDA receptors and PKA. *Eur J Neurosci* 24: 1733–1743.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05049.x>

Mice Lacking TAAR1 Show No Early Behavioral Response to Acute Restraint Stress

E. P. Vinogradova^a, Yu. A. Simon^a, A. Yu. Aleksandrov^a, V. M. Knyazeva^a, *,
L. N. Stankevich^a, A. V. Kozyreva^a, and A. A. Aleksandrov^a

^aSaint Petersburg State University, St Petersburg, Russia

*e-mail: v.m.knyazeva@spbu.ru

The role of the TAAR1 receptor, one of the trace amine-associated receptors (TAARs) family, in the formation of the behavioral component of the stress response was studied. The behavior of female TAAR1 knockout mice and wild-type (WT) mice was investigated in tests of elevated plus maze and elevated zero maze (EPM and EZM) and forced swimming test (FST) under normal conditions and after uncontrolled restraint stress exposure for 30 min. In the EPM test, the initial level of locomotor and exploratory activity, as well as the anxiety, was identical in both groups of mice. In the EZM test, the initial indicators of anxiety in female TAAR1 KO mice compared to female WT mice were

higher, and locomotor activity was lower. When testing mice in the EZM 30 minutes after the end of stress exposure, it was found that the anxiety in female WT mice sharply increased, and the indicators of locomotor activity and exploratory behavior significantly decreased. The behavioral indicators in the EZM test in TAAR1 KO mice before and after stress were identical. A pronounced behavioral component of the stress response was observed in both TAAR1 KO and WT mice during testing in EPM. There were no significant differences between TAAR1 KO and WT mice during testing in EPM four hours after stress exposure. In the FST test the latency to the first immobility was initially longer in TAAR1 KO mice compared to the WT mice, but 24 h after the stress this indicator has significantly decreased. As a result, TAAR1 KO and WT mice no longer differed in all behavioral indicators in the FST. Three weeks after acute restraint stress, both TAAR1 KO and WT groups showed a significant increase in immobility duration and a decrease in latency to the first immobility, however no difference between the both groups of animals were found. Thereby, we found the complete absence of behavioral change immediately after stressor exposure in TAAR1 KO compared to the WT mice.

Keywords: trace amine-associated receptors, TAAR1, forced swimming test, anxiety, elevated plus maze, elevated zero maze, corticotropin releasing hormone (CRH), restraint stress, stress-induced rapid changes of behavior

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ФАРМАКОЭНЦЕФАЛОГРАФИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ДОЗОЗАВИСИМОСТИ
ЭФФЕКТОВ АНТИПСИХОТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ У КРЫС**

© 2023 г. Ю. И. Сысоев^{1, 2, 3, 4, 5, *}, Д. Д. Шиц¹, М. М. Пучик¹, И. С. Князева⁴,
М. С. Корелов⁴, В. А. Приходько^{1, 4}, И. А. Титович¹,
Н. О. Селизарова¹, С. В. Оковитый^{1, 4}

¹Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет,
Санкт-Петербург, Россия

²Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

³Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия

⁴Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева РАН, Санкт-Петербург, Россия

⁵Научно-технологический университет “Сириус”, Сочи, Россия

*E-mail: susoyev92@mail.ru

Поступила в редакцию 01.07.2023 г.

После доработки 31.07.2023 г.

Принята к публикации 02.10.2023 г.

Фармакоэнцефалография (фармако-ЭЭГ) представляет большой интерес как инструмент фармакологического скрининга новых психоактивных молекул. Этот экспериментальный подход не остался рудиментом нейробиологических исследований и может быть успешно использован для решения поставленных задач в настоящее время. Развитие и повсеместное применение методов машинного обучения открывает новые возможности использования данных фармако-ЭЭГ для решения задач классификации и прогнозирования. Ранее было показано, что наивный байесовский классификатор в комбинации с методом главных компонент может быть использован как для отличия антипсихотического действия лекарственных препаратов от седативного, так и для сравнения эффектов антипсихотических средств между собой. В настоящем исследовании была проведена оценка возможности выявления дозозависимости эффектов изучаемых препаратов с использованием предложенного метода. Эксперименты выполняли на белых беспородных крысах-самцах с хронически имплантированными электрокортикографическими электродами. В качестве изучаемых препаратов были выбраны два средства с антипсихотическим действием — хлорпромазин и прометазин в трех дозах (0.1, 1, 10 мг/кг и 0.5, 5 и 20 мг/кг соответственно). Обучающей выборкой, относительно которой в ходе работы определяли фармакологические эффекты исследуемых средств, были блокатор дофаминовых D₂-рецепторов галоперидол, М-холиноблокатор тропикамид, Н₁-гистаминоблокатор хлоропирамин, а также седативный препарат дексмететомидин и анксиолитик феназепам. В результате проведенной работы было показано, что низкая доза хлорпромазина (0.1 мг/кг) может быть охарактеризована как антипсихотическая с выраженным гистаминолитическим эффектом, в то время как наиболее высокая (10 мг/кг) демонстрирует преимущественно антипсихотическое действие с каталептогенным эффектом. Все три дозы хлорпромазина обнаруживали холинолитическое действие, которое усиливалось по мере увеличения дозы. Для прометазина был выявлен четкий дозозависимый переход от антипсихотического действия к каталептогенному, а также выраженный М-холиноблокирующий эффект во всех вводимых дозах. Ни одна из доз прометазина не продемонстрировала сходство с хлоропирамином, это, вероятно, свидетельствует о том, что дофаминоблокирую-

ций и холинолитический эффекты препарата могут маскировать его H_1 -гистаминоблокирующее действие на электрокортикограмме у крыс. Таким образом, полученные результаты демонстрируют, что наивный байесовский классификатор в комбинации с методом главных компонент может быть использован для выявления дозозависимости эффектов антипсихотических препаратов по их влиянию на параметры электрокортикограмм. Дальнейшее развитие метода, а также увеличение используемой библиотеки записей эффектов психотропных препаратов может позволить более точно осуществлять прогнозирование фармакологической активности изучаемых веществ.

Ключевые слова: наивный байесовский классификатор, машинное обучение, фармакоэлектроэнцефалография, электрокортикография, антипсихотические средства, хлорпромазин, прометазин

DOI: 10.31857/S0869813923110110, **EDN:** XPKRKY

ВВЕДЕНИЕ

Идея фармакоэнцефалографии (фармако-ЭЭГ) как экспериментального метода исследования базируется на способности фармакологических агентов, оказывающих влияние на работу центральной нервной системы, вызывать специфические изменения параметров биоэлектрической активности головного мозга. В клинической практике этот метод используется главным образом для оценки эффективности проводимой у пациентов фармакотерапии, например, при эпилепсии [1] или шизофрении [2]. В исследованиях на мелких лабораторных животных фармако-ЭЭГ может быть использована как инструмент фармакологического скрининга для средств с ранее неизвестной активностью [3] или углубленного изучения эффектов известных психотропных препаратов [4, 5].

Ранее был предложен новый экспериментальный подход для выявления специфической активности и сравнения фармакологического профиля антипсихотических средств с использованием наивного байесовского классификатора (НБК) — алгоритма машинного обучения, достаточно широко применяемого в биологических и медицинских исследованиях. В рамках этого исследования была собрана библиотека электрокортикограмм (ЭКоГ) крыс, записанных после введения антипсихотических средств (хлорпромазина, галоперидола, дроперидола, тиаприда и сульпирида), которую использовали как обучающую выборку. Для каждой записи были рассчитаны соотношения значений амплитудно-спектральных характеристик ЭКоГ после инъекции препаратов к соответствующим исходным значениям до введения. Применение НБК позволило выявить специфическое влияние антипсихотических средств на параметры биоэлектрической активности коры головного мозга крыс, дифференцируя их от физиологического раствора (контроля), а также анксиолитика с седативным действием феназепама. Более того, было отмечено сходство эффектов антипсихотиков, близких по химическому строению: производных бутирофенона — галоперидола и дроперидола, а также замещенных бензамидов — тиаприда и сульпирида [6].

Характерной особенностью большинства психотропных препаратов является широкий спектр их рецепторного действия. Например, антипсихотические средства — производные фенотиазина имеют выраженное М-холино- и H_1 -гистаминоблокирующее действие, что может обуславливать их седативный эффект и ряд других центральных и периферических побочных реакций. Каждый из эффектов препаратов данной группы имеет свой диапазон доз и, несомненно, уникальные особенности влияния на ЭКоГ у крыс. Для дальнейшего развития предложенного ранее подхода как инструмента фармакологического скрининга необходимо пополнение обучающей выборки записями эффектов известных препаратов в разных дозах.

Целью данной работы стала валидация предложенного ранее метода для оценки дозозависимости эффектов двух препаратов, обладающих антипсихотическим действием — хлорпромазина и прометазина. Особое внимание было сфокусировано на возможности выявления антипсихотического, каталептогенного, М-холиноблокирующего, H_1 -гистаминоблокирующего, седативного или снотворного действия двух изучаемых препаратов в трех разных дозах.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты с использованием лабораторных животных были выполнены в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета от 22 сентября 2010 г., принципами Базельской декларации и требованиями Совета Евразийского экономического союза от 03.11.2016 г. № 81 “Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств”. Протокол эксперимента был утвержден биоэтической комиссией ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России (протокол-заявка R-PEEG2-SA-2022 от 15.02.2022). Были предприняты все меры для уменьшения числа используемых животных и минимизации их страданий.

Исследование выполнено на крысах-самцах стока Wistar в возрасте 3 месяцев и массой 250–300 г, полученных из ФГУП НИЦ “Курчатовский институт” — питомник лабораторных животных “Рапполово” (Ленинградская область, Россия). Крысы содержали по 5 особей в клетке при температуре в помещении 20–22°C и световом режиме 12 ч свет 750 лк/12 ч темнота. Все животные получали стандартный пищевой рацион (сухой полнорационный гранулированный экструдированный комбикорм рецепт ПК-120, ООО “ЛАБОРАТОРКОРМ”, Россия) и имели свободный доступ к пище и воде. Перед началом экспериментов все крысы прошли карантин в течение 14 суток.

Кортикографические электроды изготавливали из нихромовой проволоки диаметром 0.5 мм (для регистрирующих и референтного электродов) и диаметром 0.16 мм — для заземляющего электрода. Изоляцию осуществляли термоусадочной трубкой (1.5/0.5 мм); длина регистрирующей (неизолированной) части составляла ~1 мм. Все электроды объединяли в гнездо на кабель BLS-8 (Connfly Electronic Co. Ltd., КНР) с шагом 2.54 мм.

Этапы имплантации электродов и процедуры послеоперационного ухода за животными были подробно описаны в ранее опубликованной работе [7]. Для наркотизации животных использовали тилетамин/золазепам 50 (Золетил, Virbac, Франция; 10 мг/кг, внутримышечно). Электроды FP1 и FP2 располагали в области первичной двигательной коры (AP = 0.0, ML = 2.5, DV = 1.0), C3 и C4 — первичной соматосенсорной коры над гиппокампом (AP = -4.0, ML = 2.5, DV = 1.0), O1 и O2 — вторичной зрительной коры (AP = -7.0, ML = 2.5, DV = 1.0). Референтный электрод имплантировали в носовую кость, заземляющий — под кожу в области шеи.

Прооперированных крыс содержали в индивидуальных клетках со свободным доступом к воде и корму в течение всего периода исследования. Состояние животных оценивали сразу после выхода из наркоза и далее ежедневно утром и вечером; по необходимости обрабатывали швы раствором йода. Для профилактики возникновения инфекции сразу после операции животным вводили “Бициллин-3” (ОАО “Синтез”, Россия; 5000 ЕД/кг, подкожно), для снятия послеоперационной боли — кетопрофен (ООО “Велфарм”, Россия; 2.5 мг/кг, подкожно 1 раз в день в течение 3 дней). Во избежание обезвоживания крысам вводили подкожно 0.9%-ный раствор натрия хлорида (ООО “Гротекс”, Россия; 5 мл 1 раз в день) в течение первых 3 дней после операции.

Запись ЭКоГ у животных осуществляли не ранее чем через 7 дней после операции с помощью 8-канального энцефалографа Нейрон-Спектр-1 (Нейрософт, Россия) с полосой пропускания 0.5–35 Гц и частотой квантования 500 Гц. Регистрацию сигнала проводили одновременно с видеорегистрацией поведения в условиях домашней клетки при искусственном освещении. Длительность записи составляла 1 ч и включала в себя 30 мин фоновой активности (до введения препарата или физиологического раствора) и 30 мин после инъекции. Для дальнейшего анализа брали два 60-секундных участка записи: непосредственно перед введением и спустя 20 мин после. Выбранные фрагменты содержали записи ЭКоГ в спокойном бодрствующем состоянии, так как ранее было показано, что двигательная активность (локомоция, стойки, груминг или скрэтчинг) могут в значительной мере затруднять выявление и различие эффектов препаратов на биоэлектрическую активность головного мозга у крыс [8].

Все используемые препараты вводили внутривенно, при необходимости предварительно растворив в физиологическом растворе до нужной концентрации. Препаратами сравнения, относительно которых в ходе работы определяли фармакологические эффекты изучаемых антипсихотических средств, были галоперидол, тропикамид, хлоропирамин, дексмететомидин и феназепам. Галоперидол (ООО “Велфарм”, Россия) вводили в дозах 0.3 и 2 мг/кг. Первая доза была выбрана в качестве “классической антипсихотической”, блокирующей эффекты дофаминомиметиков апоморфина и квинпиrolа, а также агониста 5-HT_{1B}-серотониновых рецепторов RU24969, вызывающих гиперлокомоцию и стереотипию у крыс [9]. Доза галоперидола 2 мг/кг вызывает у крыс обратимую каталепсию [10], что позволило использовать ее в данном исследовании как маркер ранних экстрапиримидных нарушений, характерных в большей степени для типичных нейролептиков. Кроме того, галоперидол обладает достаточно высокой селективностью по отношению к дофаминовым D₂-рецепторам по сравнению с серотониновыми 5HT_{2A}-, гистаминовыми H₁-, а также M-холинорецепторами (K_i = 36 нМ, 1890 нМ и >20000 нМ соответственно) [11]. Данная избирательность объясняет его выраженное антипсихотическое действие при минимуме седации и аргументирует рациональность использования как эталонного антипсихотика.

Тропикамид (Tocris Bioscience, Великобритания), используемый как маркер M-холиноблокирующего (атропиноподобного) действия вводили в трех дозах: 0.5, 5 и 30 мг/кг [12]. Блокатор H₁-гистаминовых рецепторов хлоропирамин (ЗАО “Фармацевтический завод ЭГИС”, Венгрия) использовали только в одной дозе – 20 мг/кг – ввиду того, что более низкие дозы не оказывали выраженного действия на параметры ЭКоГ у крыс, а более высокие могут инициировать судорожную активность [13]. α₂-адреномиметик дексмететомидин и аллостерический модулятор ГАМК_A-рецепторов феназепам вводили в качестве референтных препаратов с заметным седативным действием, поскольку такое действие описано для многих антипсихотических средств в качестве побочного эффекта. Дексмететомидин использовали в дозах 0.005 и 0.1 мг/кг (умеренная и сильная седация соответственно [14]), а феназепам – 0.1 и 1 мг/кг (седация и снотворное действие соответственно [15, 16]). Несмотря на то, что и для дексмететомидина, и для феназепама характерно выраженное седативное действие, их особенности влияния на параметры ЭКоГ у крыс четко различаются. Кроме того, особенностью высоких доз феназепама является снотворное действие, не характерное для дексмететомидина [16, 17].

Хлорпромазин (АО “Валента Фарм”, Россия) вводили в дозах 0.1, 1 и 10 мг/кг, прометазин (ЗАО “Фармацевтический завод ЭГИС”, Венгрия) – 0.5, 5 и 20 мг/кг. Дозы обоих препаратов были выбраны на основании литературных данных [18, 19]

с корректировкой после собственных предыдущих исследований [6, 20]. Для дополнительной валидации полученных результатов были протестированы записи с введением дроперидола (0.3 мг/кг, ФГУП “Московский эндокринный завод”, Россия), тиаприда (30 мг/кг, АО “Органика”, Россия) и сульпирида (30 мг/кг, АО “Органика”, Россия), полученные в предыдущей работе [6]. В качестве контроля вводили 0.9%-ный раствор натрия хлорида (ООО “Гротекс”, Россия) в объеме 0.5 мл.

Для каждого препарата было сделано 5–10 записей у разных животных. Введение нового препарата осуществляли не ранее чем через 3 дня после предыдущей записи для исключения взаимодействия и остаточных эффектов. Частота тестирования той или иной крысы определялась сохранностью хэдплага (коннектора с электродами), а также общим состоянием животного. В случае признаков инфекционного заболевания вводили повторно “Бициллин-3” (ОАО “Синтез”, Россия; 5000 ЕД/кг, внутримышечно) и следующее тестирование проводили не ранее чем через неделю после инъекции.

Анализ полученных записей осуществляли с помощью программы Нейрон-Спектр.NETomega 1.6.10.8 (ООО “Нейрософт”, Россия). Для всех 6 отведений (FP1, FP2, C3, C4, O1 и O2) рассчитывали в общей сложности 132 амплитудно-спектральные характеристики ЭКоГ, включавших в себя среднюю и максимальную амплитуды сигнала, среднее квадратичное отклонение и степень сжатия по Лемпел-Зив, средние амплитуды ритмов волн, индексы и средние мощности ритмов. Из сигнала выделяли δ - (0.5–4.0 Гц), θ - (4.0–8.0 Гц), α - (8.0–14.0 Гц) и β -ритмы (низкочастотные (НЧ) – 14.0–20.0 Гц и высокочастотные (ВЧ) – 20.0–35.0 Гц). Данные выражали как соотношения значения параметров после введения препарата к значениям соответствующих параметров до введения (рис. 1).

Обработку и последующий анализ полученных данных осуществляли с помощью надстройки для MS Excel XLSTAT 2016.02.28451 и модуля sklearn v1.1.2. Уменьшение размерности данных проводили с помощью метода главных компонент (МГК), и далее на основе выделенных главных компонент обучали модель НБК. В качестве обучающей выборки были использованы данные записей эффектов галоперидола, тропикамида, хлоропирамина, дексмететомидина и феназепамы.

Оценка качества модели НБК на обучающей выборке проводилась с помощью 10-кратного повторения рандомизированной перекрестной проверки со стратификацией по группам на 5 фолдов, функция “RepeatedStratifiedKFold(n_splits=5, n_repeats=10)” в sklearn. В этом случае вся обучающая выборка делится случайно на 5 блоков с сохранением пропорций каждого препарата в группе, затем проводится обучение на каждом из 4 блоков и проверка качества на пятом, далее процедура повторяется 10 раз. Такой подход позволяет получить устойчивую оценку качества, не зависящую от конкретного разбиения. Качество оценивалось как общий процент правильно классифицированных препаратов и с помощью матрицы сопряженности для результатов классификации относительно правильных ответов, для детализации ошибок классификации. Затем модель оценивалась на всей обучающей выборке, и с помощью нее прогнозировалась фармакологическая активность экспериментальных препаратов. Для визуализации различий в распределении главных компонент для вводимых препаратов была использована диаграмма рассеяния для первых четырех главных компонент. Также для первых четырех главных компонент были проведены формальные тесты на различия изучаемых препаратов относительно физиологического раствора. Первая компонента была выбрана как содержащая большую часть изменчивости в данных и наиболее информативная с точки зрения различий. При обучении классификатора использовались также 4 компоненты.

Достоверность различий между группами на рис. 4 при сравнении двух групп оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента (при нормальном распределении и

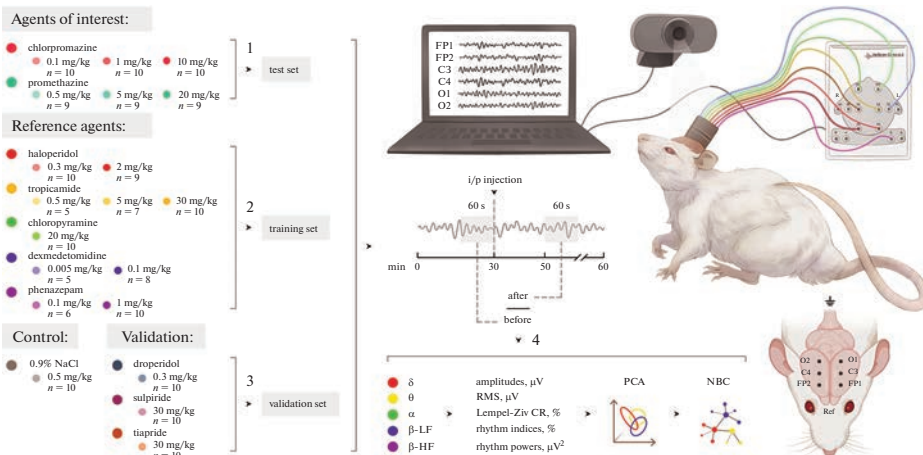


Рис. 1. Этапы эксперимента. (1) – тестовая выборка: хлорпромазин и прометазин в трех дозах. (2) – обучающая выборка: галоперидол, тропикамид, хлоропирамин, дексмететомидин и феназепам. (3) – препараты для дополнительной валидации: дроперидол, сульпирид и тиаприд. (4) – имплантация электрокортикографических электродов, регистрация электрокортикограмм в условиях домашней клетки при одновременной видеорегистрации поведения и анализ выбранных участков электрокортикограмм с последующим применением метода главных компонент и наивного байесовского классификатора. I/p – внутривенно, RMS – среднеквадратичное отклонение, CR – степень сжатия, LF – низкочастотные, HF – высокочастотные, PCA – метод главных компонент, NBC – наивный байесовский классификатор, Ref – референтный электрод.

равенстве дисперсий) и критерия Манна–Уитни (при распределении, отличном от нормального/различии дисперсий). При сравнении четырех групп использовали однофакторный дисперсионный анализ с тестом по Тьюки (при нормальном распределении и равенстве дисперсий), либо критерий Краскела–Уоллиса с *post hoc* тестом по Данну (при распределении, отличном от нормального/различии дисперсий). Для проверки нормальности распределения данных использовали W-критерий Шапиро–Уилка, для оценки равенства дисперсий – тест Бартлетта.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Введение исследуемых препаратов приводило к изменениям амплитудно-спектральных характеристик ЭКоГ у испытуемых животных. В качестве примера приведены паттерны изменения средней мощности δ -, θ -, α - и β -ритмов во всех 6 регистрируемых отведениях (рис. 2). Стоит отметить, что не всегда увеличение дозы вводимого препарата приводило к линейному увеличению средней мощности ритмов, а также числа отведений, где таковое было зафиксировано. Например, если в дозе 1 мг/кг хлорпромазин увеличивал среднюю мощность θ -, α - и β -НЧ ритмов во фронтальных отведениях, а также мощность α - и β -НЧ ритмов в затылочных, то 10-кратное увеличение дозы препарата уже в меньшей степени оказывало влияние на отведения O1 и O2. Аналогичным образом доза прометазина 5 мг/кг в меньшей степени увеличивала активность δ -ритмов во всех областях коры головного мозга у крыс чем 0.5 мг/кг, хотя в целом характер изменений ЭКоГ под влиянием обеих доз был похожим. В большинстве случаев введение того или иного препарата приводило к увеличению средней мощности регистрируемых ритмов за исключением хлоропирамина, снижавшего активность α -, β -НЧ и β -ВЧ ритмов. Наименее выра-

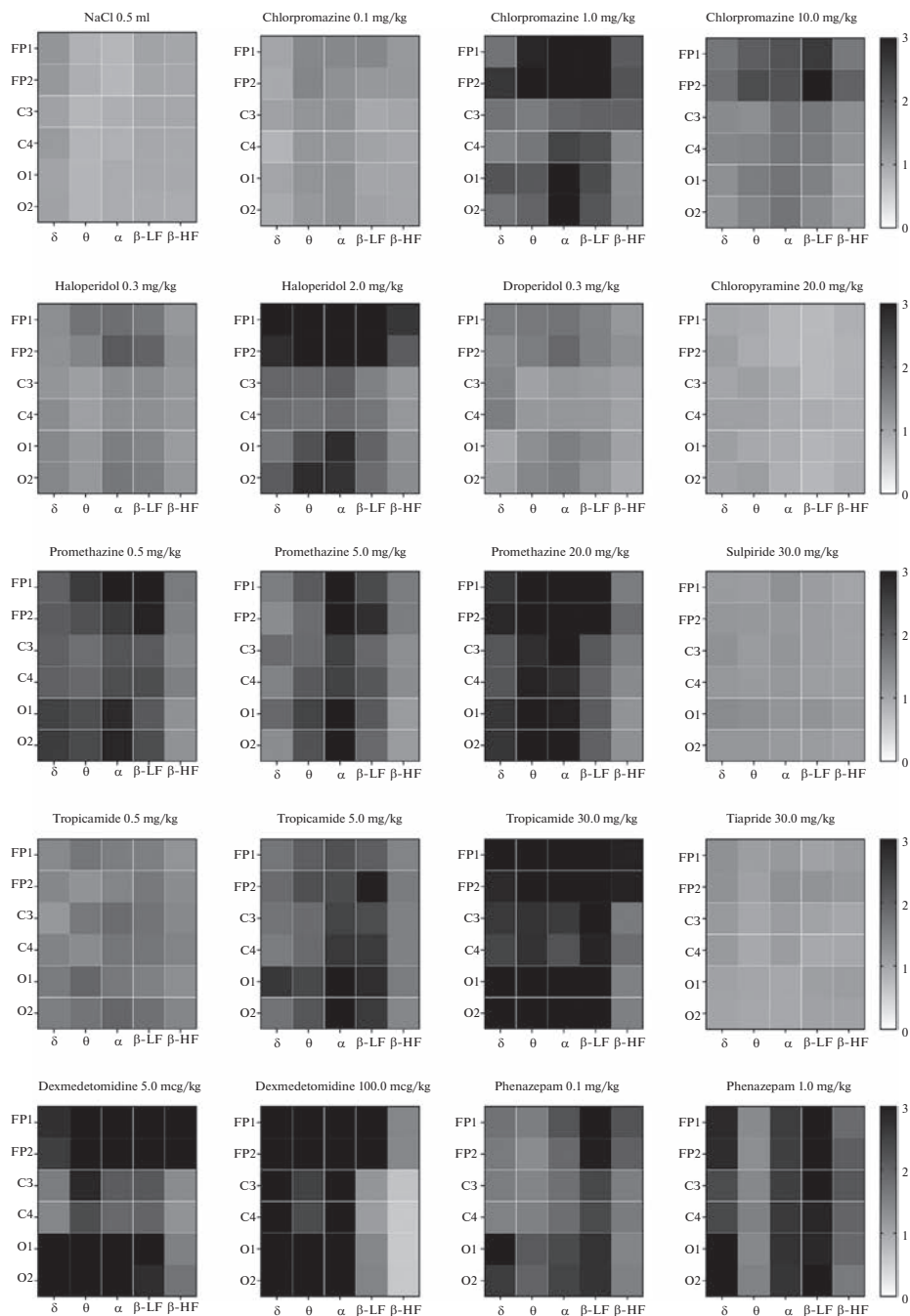


Рис. 2. Тепловые карты медианных ($n = 5–10$ для каждой группы) значений средней мощности δ -, θ -, α - и β -ритмов в отведениях FP1, FP2, C3, C4, O1 и O2 при введении препаратов. Исходными данными были отношения значений средней мощности ритмов спустя 20 мин после введения препаратов к значениям соответствующих показателей до введения (30-я минута фоновой записи).

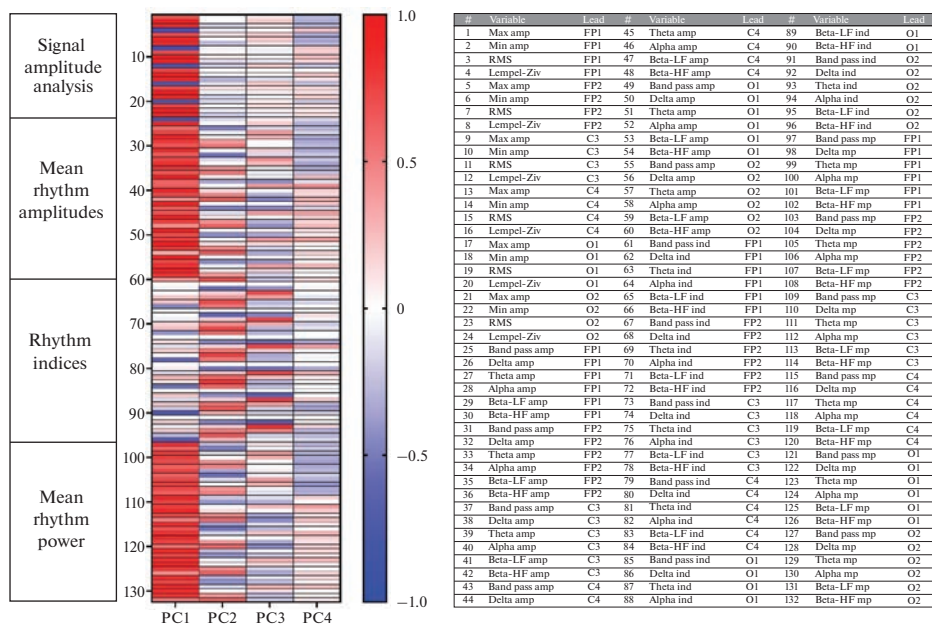


Рис. 3. Факторные нагрузки, показывающие степень вовлечения каждого из 132 анализируемых параметров в формирование компонент PC, PC2, PC3 и PC4, используемых для дальнейших вычислений с использованием наивного байесовского классификатора. Amp – амплитуда (мкВ), RMS – среднеквадратичное отклонение (мкВ), Lempel-Ziv – степень сжатия по Лемпел-Зив (%), ind – индекс ритма (%), mp – средняя мощность ритма (мкВ²).

женные эффекты на биоэлектрическую активность головного мозга у крыс оказывали хлорпирамин, сульпирид и тиаприд, однако характер их действия отличался от изменений, наблюдаемых после введения физиологического раствора (небольшое увеличение δ -активности при снижении мощности θ -ритмов).

Анализ полученных данных МГК показал, что 77.05% дисперсии могут быть описаны 4 главными компонентами (PC1–PC4), которые были использованы для дальнейшей работы. Факторные нагрузки анализируемых параметров ЭКоГ, характеризующие их вклад в формирование той или иной главной компоненты, приведены на рис. 3. Компонента PC1, описывающая 48.8% дисперсии, была образована амплитудными характеристиками сигнала (как в целом, так и отдельными ритмами), а также коррелирующими с ними значениями спектральной мощности ритмов. Все перечисленные параметры ЭКоГ влияли на значение PC1 вне зависимости от расположения регистрирующих электродов. На значение компоненты PC2 (14.1%) влияли в большей степени активность δ - и β -ритмов во всех отведениях. Величину PC3 (9.43%) практически полностью определяли индексы δ - и θ -ритмов. Компонента PC4 (4.75%) была образована преимущественно величиной средней амплитуды и мощности θ -ритма в теменных и затылочных областях коры.

При сравнении эффектов изучаемых препаратов на величину компонент PC1–PC4 было отмечено, что все они во всех вводимых дозах, за исключением хлорпромазина в дозе 0.1 мг/кг, вызывают статистически значимое увеличение первой главной компоненты по сравнению с контролем ($p < 0.05$ для тиаприда и $p < 0.01$ для хлорпромазина в дозах 1 и 10 мг/кг, прометазина в дозах 0.5, 5 и 20 мг/кг, дроперидола и сульпирида соответственно) (рис. 4). На величину PC2 оказал влияние

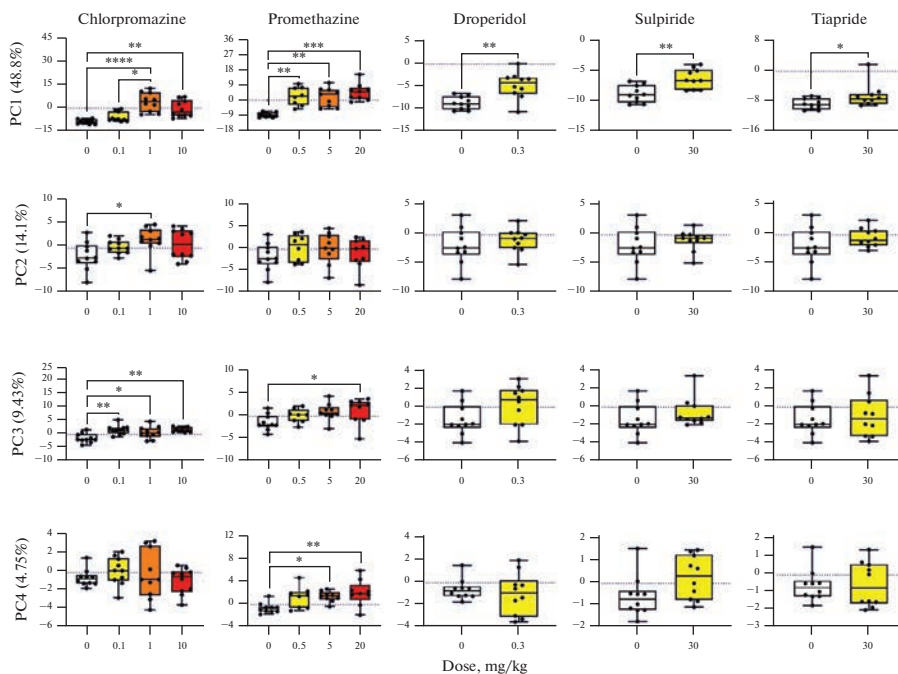


Рис. 4. Значения главных компонент PC1–PC4 в группах хлорпромазина (0.1, 1 и 10 мг/кг), прометазина (0.5, 5 и 20 мг/кг), дроперидола, сульпирида и тиаприда. В качестве контроля (белый цвет) были взяты значения главных компонент группы животных, которым вводили физиологический раствор объемом 0.5 мл. Данные представлены как медиана (минимальное значение; максимальное значение). В данном случае использовалась коррекция на множественные сравнения при сопоставлении доз внутри одной группы препаратов (хлорпромазин и прометазин), но не учитывалось одновременное тестирование четырех компонент и пяти препаратов, так как эти тесты проводили исключительно в целях визуализации для демонстрации наличия эффектов. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$.

только хлорпромазин в дозе 1 мг/кг ($p < 0.05$). Значения компоненты PC3 значимо увеличивали хлорпромазин во всех тестируемых дозах ($p < 0.05$ для дозы 1 мг/кг и $p < 0.01$ для доз 0.1 и 10 мг/кг) и прометазин в дозе 20 мг/кг ($p < 0.05$). PC4 была выше только у животных, которым вводили прометазин в дозах 5 и 20 мг/кг ($p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно).

На рис. 5 приведены диаграммы рассеяния для первых четырех главных компонент на обучающей (а) и тестовой выборке (б). К тестовой выборке также был добавлен физиологический раствор, чтобы показать, что в пространстве главных компонент изучаемые препараты лежат достаточно далеко от него.

Матрица сопряженности с результатами классификации для обучающей выборки представлена на рис. 6.

Далее препараты из тестовой и валидационной выборок были спроектированы на главные компоненты из обучающей выборки, а затем для полученных данных осуществляли прогнозирование фармакологической активности анализируемых записей на основании значений главных компонент с использованием обученного НБК. Для каждой записи были рассчитаны вероятности совпадения эффектов на ЭКоГ с таковыми у препаратов, используемых в качестве обучающей выборки (галоперидол, тропикамид, хлоропирамин, дексмететомидин и феназепам). Для всех тестируемых групп рассчитывали медианное значение вероятности сходства с той или

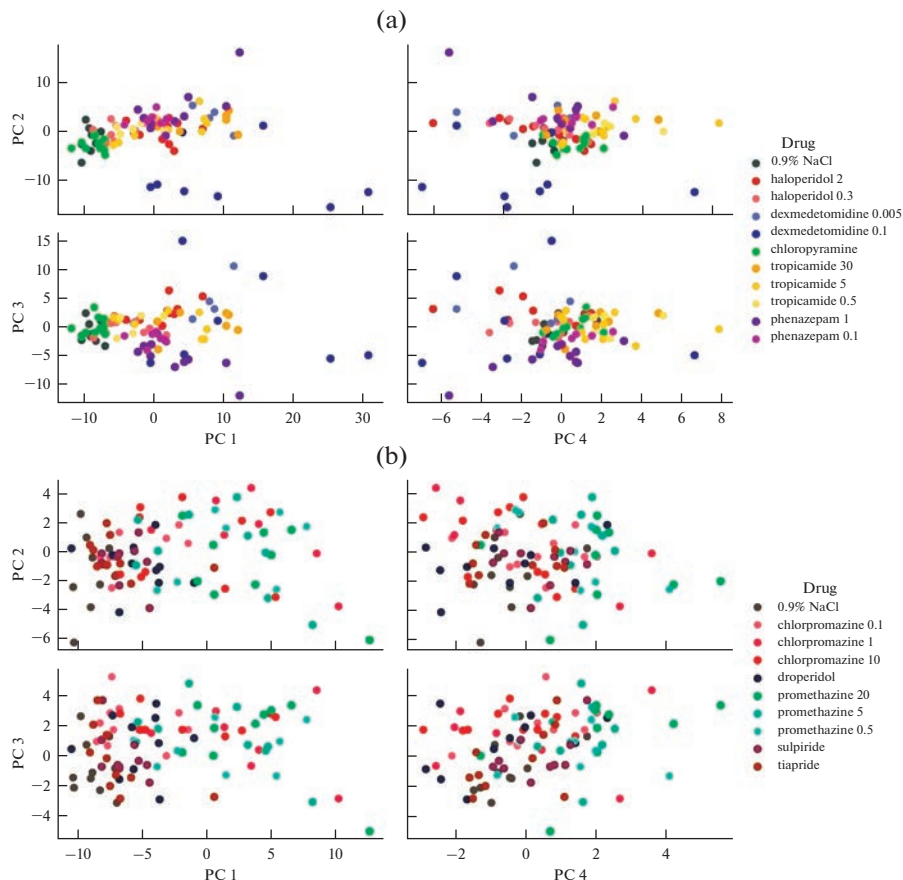


Рис. 5. Диаграмма рассеяния для первых четырех главных компонент, полученных по обучающей выборке (а) и проекция на эти компоненты тестовых препаратов (б).

иной референтной группой, на основании чего можно было сделать выводы о характере действия хлорпромазина и прометазина в той или иной тестируемой дозе (рис. 6). Для дополнительной валидации методики был осуществлен прогноз фармакологической активности для дроперидола (0.3 мг/кг), сульпирида (30 мг/кг) и тиаприда (30 мг/кг).

Установлено, что хлорпромазин в низкой дозе 0.1 мг/кг имеет наибольшее сходство с хлоропирамином и галоперидолом 0.3 мг/кг (медианные значения вероятности сходства 0.308 и 0.113 соответственно), что может говорить о преобладании у препарата в этой дозе H_1 -гистаминоблокирующего и антипсихотического эффектов. Доза 10 мг/кг продемонстрировала также сходство с антипсихотической дозой галоперидола (0.196). В то же время НБК прогнозировал выраженное “каталептогенное” действие (сходство с галоперидолом в дозе 2.0 мг/кг, медианное значение вероятности сходства – 0.206). Все три дозы хлорпромазина вызывали эффекты, похожие на действие тропикамида в дозе 5 мг/кг. При этом прослеживалась дозозависимость такого М-холиноблокирующего действия (0.049, 0.085 и 0.101 для доз 0.1, 1 и 10 мг/кг соответственно). Также для средней и высокой доз хлорпромазина

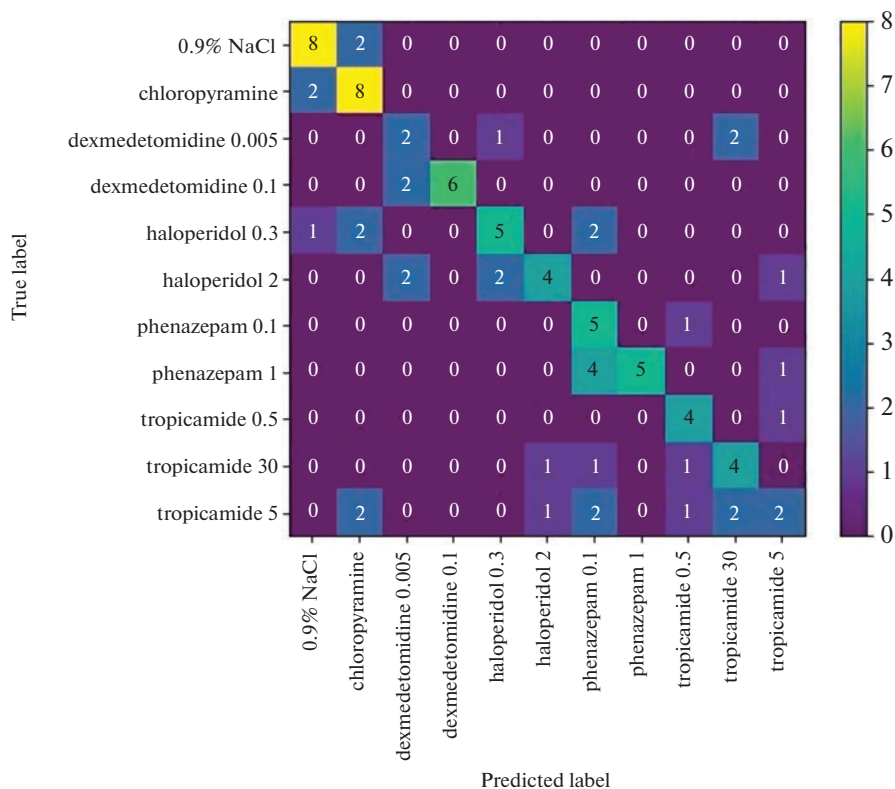


Рис. 6. Результаты классификации наивным байесовским классификатором обучающей выборки.

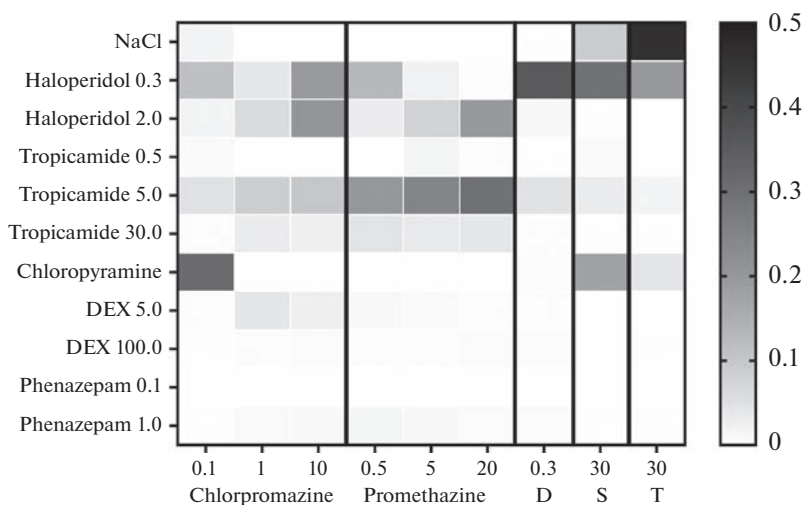


Рис. 7. Тепловая карта медианных значений вероятности сходства фармакологической активности хлорпромазина (0.1, 1 и 10 мг/кг), прометазина (0.5, 5 и 20 мг/кг), дроперидола (D), сульпирида (S) и тиаприда (T) с препаратами из обучающей выборки (вертикальная ось), полученных с использованием наивного байесовского классификатора. DEX – дексмететомидин.

прогнозировалось некоторое сходство с дексмететомидином в дозе 5 мг/кг (0.041 и 0.024 соответственно), что может говорить об их умеренном седативном действии.

Прометазин во всех вводимых дозах НБК определял в первую очередь как М-холиноблокатор (медианное значение вероятности сходства с тропикамидом 5 мг/кг — 0.201, 0.247 и 0.295 для доз 0.5, 5 и 20 мг/кг соответственно). Также для этого препарата была выявлена четкая прогнозируемая дозозависимость перехода от антипсихотического действия к каталептогенному (сходство с галоперидолом 0.3 мг/кг 0.131, 0.020 и 0.001, а с галоперидолом 2 мг/кг — 0.031, 0.075 и 0.198 для доз 0.5, 5 и 20 мг/кг соответственно). Интересно, что для прометазина предлагаемый подход не позволил обнаружить сколько-нибудь выраженного H_1 -гистаминоблокирующего действия в любой из изучаемых доз.

Дроперидол в единственной тестируемой дозе был определен как “антипсихотическое” средство (сходство с галоперидолом 0.3 мг/кг 0.353) со слабым “М-холинотоксирующим” эффектом (сходство с тропикамидом 5 мг/кг 0.047). Сульприд и тиаприд были отнесены к “антипсихотикам” со слабым или умеренным H_1 -гистаминоблокирующим действием. Однако стоит отметить, что для обоих препаратов было показано достаточно высокое сходство с контрольной группой, которой вводили физиологический раствор (0.091 и 0.459 для сульприда и тиаприда соответственно).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее было показано, что НБК в комбинации с МГК может быть использован для сравнения эффектов антипсихотических средств, а также их отличий от бензодиазепинового транквилизатора феназепама, обладающего седативной активностью [6]. Тем не менее, общеизвестно, что нейролептики в зависимости от вводимой дозы могут демонстрировать разный фармакологический эффект. Во многом это связано с неизбежностью рецепторного действия данных лекарственных средств. Для большинства из них наиболее частыми второстепенными фармакологическими мишенями являются М-холинорецепторы, H_1 -гистаминовые рецепторы, α -адренорецепторы и различные подтипы серотониновых рецепторов [11]. В связи с этим одним из ключевых этапов развития предлагаемого подхода как инструмента фармакологического скрининга является запись эффектов референтных препаратов в разных диапазонах доз. Несмотря на очевидность данного утверждения, в работах других авторов [21, 22], использующих фармако-ЭЭГ для скрининга и классификации психопрепаратов, не было сделано акцента на дозозависимости регистрируемых эффектов.

В настоящем исследовании была оценена чувствительность используемого алгоритма прогнозирования фармакологической активности к вышеупомянутой дозозависимости эффектов двух выбранных нейролептиков — хлорпромазина и прометазина. В качестве референтных препаратов были выбраны средства с наиболее классическими фармакологическими эффектами, а именно антипсихотическим и каталептогенным (галоперидол), атропиноподобным (тропикамид), H_1 -гистаминоблокирующим (хлоропирамин) и седативным/снотворным действием (дексмететомидин и феназепам). Стоит принимать во внимание, что все выбранные препараты не являются селективными по отношению к своим главным фармакологическим мишеням: например, галоперидол способен блокировать серотониновые $5HT_{2A}$ -рецепторы [11], а хлоропирамин, являясь представителем H_1 -гистаминоблокаторов 1-го поколения, не лишен М-холиноблокирующего действия [23]. В дальнейшем возможным решением данной проблемы может быть использование селективных агонистов/антагонистов интересующих молекулярных мишеней, например, блокаторов D_2 -рецепторов раклоприда, L-741626 и др. Однако, как пра-

вило, для таких молекул нет данных о клинических эффектах и фармакокинетике; кроме того, со временем, при детальном изучении фармакодинамики того или иного лиганда обнаруживаются новые фармакологические мишени, и он перестает считаться селективным. Наиболее перспективным представляется последовательное использование двух обучающих выборок, “от эффекта” и “от рецептора”, однако такой подход требует экспериментальной валидации.

С помощью НБК было выявлено, что хлорпромазин в низкой дозе 0.1 мг/кг обладает антипсихотическим и H_1 -гистаминоблокирующим действием, в дозе 1 мг/кг — антипсихотическим, а в дозе 10 мг/кг становится заметным каталептогенный эффект (рис. 5). В ранее опубликованной работе других авторов [24] показано, что хлорпромазин в дозах 0.1, 1 и 5 мг/кг способен снижать эмоциональную гипертермию у крыс в тесте “резидент—интродер” (статистически значимо для дозы 5 мг/кг и на уровне тенденции — для доз 0.1 и 1 мг/кг). Данный тест является чувствительным к действию ряда нейролептиков и рассматривается как перспективный для оценки антипсихотического эффекта. Согласно данным Rebec и соавт., умеренное каталептогенное действие у крыс хлорпромазин оказывает в дозах 5 и 10 мг/кг [25]. Таким образом, спрогнозированная в настоящей работе дозозависимость антипсихотического и каталептогенного действия хлорпромазина согласуется с литературными данными.

На основании литературных данных не представляется возможным сопоставить спрогнозированную дозозависимость М-холиноблокирующего и H_1 -гистаминоблокирующего действия хлорпромазина. Тем не менее, не вызывает сомнения, что эти эффекты должны возрастать с увеличением дозы вводимого антипсихотика. В данном исследовании только одна, низкая доза хлорпромазина была оценена как “гистаминоблокирующая”, в то время как “атропиноподобное” действие увеличивалось от дозы 0.1 к дозе 10 мг/кг. Наиболее вероятным объяснением данному феномену может быть то, что выраженное М-холиноблокирующее действие маскирует H_1 -гистаминоблокирующее на ЭКоГ у крыс. На рис. 2 наглядно видно, насколько слабо выражены эффекты хлоропирамина даже в достаточно высокой вводимой дозе (20 мг/кг) в сравнении с тремя дозами тропикамида. Также в пользу маскировки H_1 -гистаминоблокирующего действия М-холиноблокирующим говорят результаты, полученные для 3 доз прометазина (рис. 5).

Прометазин в настоящее время используется как противорвотное и противоаллергическое средство, а также для премедикации ввиду способности потенцировать наркоз и вызывать искусственную гибернацию. Являясь производным фенотиазина и обладая дофаминолитическим действием, данный препарат серьезно рассматривали в 50—60-е годы как антипсихотическое средство, однако проведенное в 1960 г. двойное слепое плацебо-контролируемое исследование показало большую эффективность другого производного фенотиазина, хлорпромазина, при терапии шизофрении [26]. В связи с этим, а также в связи с появлением в то же время производных бутирофенона (а позднее еще и нейролептиков второго и третьего поколения) [27], интерес к прометазину как антипсихотическому средству окончательно угаснет. В настоящей работе этот препарат не рассматривается как недооцененный нейролептик, а служит лишь как средство валидации предлагаемой методики. Как и для хлорпромазина, для прометазина был продемонстрирован дозозависимый переход от “антипсихотического” действия к “каталептогенному” (рис. 5), что характерно для типичных нейролептиков. Заведомо зная, что хлорпромазин является более сильным нейролептиком, чем прометазин, можно сделать вывод, что рассчитанное медианное значение вероятности сходства с галоперидолом в дозе 0.3 мг/кг не является количественной характеристикой силы антипсихотического эффекта, которую можно сравнивать между разными изучаемы-

Таблица 1. Значения констант ингибирования (K_i , нМ), отражающие аффинитет хлорпромазина, прометазина, дроперидола, тиаприда и сульпирида к различным рецепторам

Препарат	D ₂ -ДР	М-ХР	H ₁ -ГР
Хлорпромазин	11.0 [28] 19.0 [11]	1.5 [28] 60.0 [11]	25.0 [28] 9.1 [11]
Прометазин	260.0 [29]	3.32 (M ₁) 12.0 (M ₂) 4.15 (M ₃) 1.06 (M ₄) 3.31 (M ₅) [29]	0.24 [30] 0.33 [29]
Дроперидол	0.25 [31] 0.8 [32]	537.0 (M ₄) 1651.0 (M ₅) [32]	525.0 [32]
Сульпирид	8.2 [33] 13.0 [28]	>1300 [28]	>80000 [28]
Тиаприд	226.0 [33]	NA	NA

ДР – дофаминовый рецептор, ХР – холинорецептор, ГР – гистаминовый рецептор, NA – нет данных.

ми препаратами. Тем не менее, для всех доз прометазина (особенно для 5 и 20 мг/кг) было показано выраженное преобладание “М-холиноблокирующего” действия над “антипсихотическим” (или даже “каталептогенным”), это косвенно говорит о том, что изучаемый препарат в первую очередь – М-холиноблокатор, и только в некоторой степени – антагонист дофаминовых D₂-рецепторов. Данное наблюдение полностью согласуется с ранее опубликованными значениями констант ингибирования (K_i , нМ), отражающими аффинитет к дофаминовым и М-холинорецепторам (табл. 1).

Дроперидол был определен как “классический” антипсихотик со слабовыраженным атропиноподобным эффектом. Как и в случае прометазина, полученные данные согласуются со значениями K_i для D₂-дофаминовых и М-холинорецепторов (табл. 1). Атипичные нейролептики сульпирид и тиаприд, с одной стороны, были отнесены НБК к антипсихотикам, с другой стороны, было продемонстрировано их высокое сходство с физиологическим раствором и блокатором H₁-гистаминовых рецепторов хлоропирамином. Сходство с галоперидолом в дозе 0.3 мг/кг является ожидаемым и в очередной раз демонстрирует чувствительность предложенного метода для выявления антипсихотического действия. Тем не менее, два других прогноза могут вызывать некоторые вопросы к правильности работы алгоритма. С одной стороны, сходство с физиологическим раствором и хлоропирамином может быть вызвано тем, что оба атипичных нейролептика и антагонист H₁-гистаминовых рецепторов вызывали слабые изменения ЭКоГ у крыс, в связи с чем любые препараты, которые мало влияют на кору головного мозга, будут рассматриваться как похожие друг на друга или на контрольную группу. Данное утверждение не лишено справедливости, принимая во внимание тот факт, что хлорпромазин в дозе 0.1 мг/кг все же имел некоторое сходство с NaCl (рис. 5). С другой стороны, эта же низкая доза хлорпромазина была четко определена как “гистаминоблокирующая” и “антипсихотическая”. Возможным решением данной проблемы в дальнейшем может быть использование других блокаторов H₁-гистаминовых рецепторов, которые будут лучше проникать через гематоэнцефалический барьер, обладать большим аффинитетом к интересующим рецепторам и благодаря этому будут в большей степени изменять амплитудно-спектральные характеристики ЭКоГ. В рамках данной работы были также сделаны записи эффектов дифенгидрамина в

дозе 20 мг/кг (данные не представлены), однако эффекты этого препарата не были более выраженными, чем таковые хлоропирамина.

Слабые ЭКоГ-эффекты некоторых препаратов может быть серьезной проблемой для решения дальнейших задач прогнозирования с использованием предложенного метода. Применение различных вариаций комбинаций алгоритмов уменьшения размерности (PCA, LDA и др.) и методов машинного обучения (НБК, KNN, SVM и др.), вероятно, позволит более эффективно разделить такие препараты между собой. Также необходимо отметить, что настоящее исследование было выполнено на здоровых животных, но в условиях патологии эффекты препаратов могут не только становиться более выраженными, но и меняться. В связи с этим представляет интерес проведение фармако-ЭЭГ исследований на экспериментальных моделях (генетических, фармакологических и др.) заболеваний ЦНС.

Другим возможным подходом (не исключаящим первые два варианта) может быть использование глубинных электродов для записи эффектов препаратов на биоэлектрическую активность головного мозга у крыс. Например, Dimpfel в своих работах использовал сигналы, записанные не только с коры головного мозга, но также и со стриатума, гиппокампа и ретикулярной формации [4, 5]. Однако такой подход требует уже большего времени изготовления электродов, длительности процедуры хирургической имплантации, а также дополнительной гистологической валидации расположения электродов после выведения животных из эксперимента, что не позволяет его рассматривать как инструмент быстрого и простого фармакологического скрининга.

Отдельного внимания заслуживает прогнозирование сходства изучаемых препаратов с дексметомидином и феназепамом. Как было сказано ранее, оба препарата обладают седативным действием, тем не менее, вызываемая седация является разной как с точки зрения механизмов действия, так и по характеру влияния на ЭКоГ у крыс. В большей степени седативное действие, вызываемое типичными нейролептиками, принято ассоциировать с блокадой H_1 -гистаминовых рецепторов [11, 34]. В связи с этим представляется логичным, что рассматриваемые в настоящей работе антипсихотические средства демонстрировали очень слабое сходство с α_2 -адреномиметиком дексметомидином и модулятором ГАМК_A-рецепторов феназепамом. С другой стороны, оба препарата все же обладают некоторой тропностью к α_2 -адренорецепторам. Хлорпромазин в высоких дозах (1 и 10 мг/кг) продемонстрировал сходство с дексметомидином в дозе 5 мг/кг, а прометазин — практически нет (K_i хлорпромазина для α_2 -адренорецепторов по литературным данным составляет 750 нМ, а для прометазина, в зависимости от подтипа рецепторов — 256, 34, 353 нМ, для А-, В- и С-подтипов соответственно). Вероятно, в данном случае большую роль играет соотношение K_i рецепторов внутри одного конкретного лиганда, и в случае прометазина его α_2 -адреноблокирующее действие, как и H_1 -гистаминоблокирующее, может перекрываться атропиноподобным.

Подводя итоги, можно сделать вывод, что НБК в комбинации с МГК может быть использован для выявления дозозависимости эффектов антипсихотических препаратов по их влиянию на параметры ЭКоГ у крыс. Предлагаемый подход позволяет оценить выраженность антипсихотического, каталептогенного, атропиноподобного (М-холиноблокирующего), H_1 -гистаминоблокирующего, седативного или снотворного действия изучаемых препаратов в разных диапазонах доз. Слабая выраженность действия некоторых психотропных препаратов (например, блокаторов H_1 -гистаминовых рецепторов, а также производных бензамида сульпирида и тиоприда) может требовать дополнительных методических подходов, в качестве которых могут быть использованы более совершенные алгоритмы классификации и прогнозирования, животные с моделями заболеваний или с глубинными электродами.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 23-75-01051 (создание библиотеки записей электрокортикограмм), Госпрогаммы ГП-47 “Научно-технологическое развитие Российской Федерации” (2019–2030), тема 0113-2019-0006 (Ю.И.С.), в рамках проектов 93022925/94030803 Санкт-Петербургского государственного университета (Ю.И.С.) и № 075-10-2021-093 (Проект NRB-RND-2115, Ю.И.С.) при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, а также за счет средств государственного задания ИМЧ РАН (разработка методов математического анализа, номер гос. регистрации темы 122041500045-8).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея и планирование эксперимента (Ю.И.С., С.В.О.), проведение экспериментов и обработка данных (Ю.И.С., М.В.Ш., Д.Д.Ш., М.М.П., И.С.К., М.С.К.), подготовка иллюстраций (Ю.И.С., В.А.П., И.С.К., М.С.К.), подготовка и редакция рукописи (Ю.И.С., В.А.П., И.А.Т., Н.О.С., С.В.О.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lanzone J, Ricci L, Tombini M, Boscarino M, Mecarelli O, Pulitano P, Di Lazzaro V, Assenza G* (2021) The effect of Perampanel on EEG spectral power and connectivity in patients with focal epilepsy. *Clin Neurophysiol* 132(9): 2176–2183. <https://www.doi.org/10.1016/j.clinph.2021.05.026>
2. *Hyun J, Baik MJ, Kang UG* (2011) Effects of Psychotropic Drugs on Quantitative EEG among Patients with Schizophrenia-spectrum Disorders. *Clin Psychopharmacol Neurosci* 9(2): 78–85. <https://www.doi.org/10.9758/cpn.2011.9.2.78>
3. *Nordin C, Krijzer F* (1996) Antidepressant and anxiolytic profiles of E-10-hydroxynortriptyline on electrocorticograms of rats. *Neuropsychobiology* 34(1): 44–48. <https://www.doi.org/10.1159/000119290>
4. *Dimpfel W* (2007) Characterization of atypical antipsychotic drugs by a late decrease of striatal alpha1 spectral power in the electropharmacogram of freely moving rats. *Br J Pharmacol* 152(4): 538–548. <https://www.doi.org/10.1038/sj.bjp.0707427>
5. *Dimpfel W, Hoffmann JA* (2010) Electropharmacograms of rasagiline, its metabolite aminogindan and selegiline in the freely moving rat. *Neuropsychobiology* 62(4): 213–220. <https://www.doi.org/10.1159/000319947>
6. *Sysoev YuI, Shits DD, Puchik MM, Prikhodko VA, Idiyatullin RD, Kotelnikova AA, Okovityi SV* (2022) Use of Naïve Bayes Classifier to Assess the Effects of Antipsychotic Agents on Brain Electrical Activity Parameters in Rats. *J Evol Biochem Physiol* 58(4): 1130–1141. <https://www.doi.org/10.1134/S0022093022040160>
7. *Sysoev YuI, Prikhodko VA, Idiyatullin RD, Chernyakov RT, Karev VE, Okovityi SV* (2022) A Method for Chronic Registration of Brain Cortical Electrical Activity in Rats. *J Evol Biochem Physiol* 58: 292–301. <https://www.doi.org/10.31857/S0869813922020091>
8. *Hansen IH, Agerskov C, Arvastson L, Bastlund JF, Sørensen HBD, Herrik KF* (2019) Pharmacoelectroencephalographic responses in the rat differ between active and inactive locomotor states. *Eur J Neurosci* 50(2): 1948–1971. <https://www.doi.org/10.1111/ejn.14373>
9. *Geyer MA, Krebs-Thomson K, Braff DL, Swerdlow NR* (2001) Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology* 156(2-3): 117–154. <https://www.doi.org/10.1007/s002130100811>
10. *Waku I, Magalhães MS, Alves CO, de Oliveira AR* (2021) Haloperidol-induced catalepsy as an animal model for parkinsonism: A systematic review of experimental studies. *Eur J Neurosci* 53(11): 3743–3767. <https://www.doi.org/10.1111/ejn.15222>

11. Gardner DM, Baldessarini RJ, Waraich P (2005) Modern antipsychotic drugs: a critical overview. *CMAJ* 172(13): 1703–1711.
<https://www.doi.org/10.1503/cmaj.1041064>
12. Bryant SM, Rhee JW, Thompson TM, Lu JJ, Aks SE (2009) Parenteral ophthalmic tropicamide or cyclopentolate protects rats from lethal organophosphate poisoning. *Am J Ther* 16(3): 231–234.
<https://www.doi.org/10.1097/MJT.0b013e318182254b>
13. Kamei C, Ohuchi M, Sugimoto Y, Okuma C (2000) Mechanism responsible for epileptogenic activity by first-generation H1-antagonists in rats. *Brain Res* 887(1): 183–186.
[https://www.doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)03041-9](https://www.doi.org/10.1016/S0006-8993(00)03041-9)
14. Hunter JC, Fontana DJ, Hedley LR, Jasper JR, Lewis R, Link RE, Secchi R, Sutton J, Eglen RM (1997) Assessment of the role of alpha2-adrenoceptor subtypes in the antinociceptive, sedative and hypothermic action of dexmedetomidine in transgenic mice. *Br J Pharmacol* 122(7): 1339–1344.
<https://www.doi.org/10.1038/sj.bjp.0701520>
15. Арушанян ЭБ, Бейер ЭВ, Каминская ОВ, Сотникова ЛК (2015) Позитивные аспекты сочетанного влияния мелатонина и феназепама на поведенческую активность крыс. *Мед вестн Северного Кавказа* 1(37): 84–88. [Arushanyan EB, Beyer EV, Kaminskaya OV, Sotnikova LK (2015) Positive aspects of the combined effect of melatonin and phenazepam on the behavioral activity of rats. *Med Herald North Caucasus* 1(37): 84–88. (In Russ)].
<https://www.doi.org/10.14300/mnnc.2015.10014>
16. Кан АВ, Приходько ВА, Сысоев ЮИ, Оковитый СВ (2021) Влияние феназепама на амплитудные характеристики ритмов электрокортикограмм у крыс. *Бюлл мед науки* 4(24): 108–111. [Kan AV, Prikhodko VA, Sysoev YuI, Okovity SV (2021) Effect of phenazepam on the amplitude characteristics of electrocorticogram rhythms in rats. *Bull Med Sci* 4(24): 108–111. (In Russ)].
<https://www.doi.org/10.31684/25418475-2021-4-108>
17. Garrity AG, Botta S, Lazar SB, Swor E, Vanini G, Baghdoyan HA, Lydic R (2015) Dexmedetomidine-induced sedation does not mimic the neurobehavioral phenotypes of sleep in Sprague Dawley rat. *Sleep* 38(1): 73–84.
<https://www.doi.org/10.5665/sleep.4328>
18. Paalzow GHM, Paalzow LK (1985) Promethazine both facilitates and inhibits nociception in rats: Effect of the testing procedure. *Psychopharmacology* 85: 31–36.
<https://www.doi.org/10.1007/BF00427318>
19. Дроздов АЛ, Демченко ЕМ, Эйяд А, Неруш ОП (2011) Влияние психотропных лекарственных средств на спонтанную поведенческую активность белых крыс. *Вісн Дніпропетров універ Біол Мед* 1(2): 47–53. [Drozdov AL, Demchenko EM, Eyad A, Nerush OP (2011) The influence of psychotropic drugs on the spontaneous behavioral activity of white rats. *Visn Dni propetrov Univer Biol Med* 1(2): 47–53. (In Russ)].
20. Shits DD, Puchik MM, Prikhodko VA, Sysoev YuI, Okovityi SV (2022) Effects of promethazine on the amplitude and spectral characteristics of electrocorticograms in rats. *Bull Perm Univ Biol* (4): 352–356.
<https://www.doi.org/10.17072/1994-9952-2022-4-352-356>
21. Krijzer F, Koopman P, Olivier B (1993) Classification of psychotropic drugs based on pharmacoelectrocorticographic studies in vigilance-controlled rats. *Neuropsychobiology* 28(3): 122–137.
<https://www.doi.org/10.1159/000119015>
22. Dimpfel W (2003) Preclinical data base of pharmacospecific rat EEG fingerprints (tele-stereo-EEG). *Eur J Med Res* 8(5): 199–207.
23. Горячкина МВ, Белоусова ТА (2014) Хлоропирамин: клинические аспекты применения. *РМЖ Мед обзор* 22(24): 1785–1789. [Goryachkina MV, Belousova TA (2014) Chloropyramine: clinical aspects of use. *RMJ Med Rev* 22(24): 1785–1789. (In Russ)].
24. Blessing WW, Blessing EM, Mohammed M, Ootsuka Y (2017) Clozapine, chlorpromazine and risperidone dose-dependently reduce emotional hyperthermia, a biological marker of salience. *Psychopharmacology (Berl)* 234(21): 3259–3269.
<https://www.doi.org/10.1007/s00213-017-4710-x>
25. Rebec GV, Gelman J, Alloway KD, Bashore TR (1983) Cataleptogenic potency of the antipsychotic drugs is inversely correlated with neuronal activity in the amygdaloid complex of the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 19(5): 759–763.
[https://www.doi.org/10.1016/0091-3057\(83\)90076-x](https://www.doi.org/10.1016/0091-3057(83)90076-x)
26. Casey JF, Bennett IF, Lindley CJ, Holister LE, Gordon MH, Springer NN (1960) Drug therapy in schizophrenia. A controlled study of the relative effectiveness of chlorpromazine, promazine, phenobarbital, and placebo. *AMA Arch Gen Psychiatry* 2: 210–220.
<https://www.doi.org/10.1001/archpsyc.1960.03590080086012>

27. Ramachandraiah CT, Subramaniam N, Tancer M (2009) The story of antipsychotics: Past and present. *Indian J Psychiatry* 51(4): 324–326.
<https://www.doi.org/10.4103/0019-5545.58304>
28. Yonemura K, Miyanaga K, Machiyama Y (1998) Profiles of the affinity of antipsychotic drugs for neurotransmitter receptors and their clinical implication. *Kitakanto Med J* 48(2): 87–102.
<https://www.doi.org/10.2974/KMJ.48.87>
29. Promethazine. Ligand Activity Charts. IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology. Режим доступа: <https://www.guidetopharmacology.org> (доступ от 29.05.2023)
30. Ghoneim OM, Legere JA, Golbraikh A, Tropsha A, Booth RG (2006) Novel ligands for the human histamine H1 receptor: synthesis, pharmacology, and comparative molecular field analysis studies of 2-dimethylamino-5-(6)-phenyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalenes. *Bioorg Med Chem* 2006 Oct 14(19): 6640–6658.
<https://www.doi.org/10.1016/j.bmc.2006.05.077>
31. Li P, Snyder GL, Vanover KE (2016) Dopamine Targeting Drugs for the Treatment of Schizophrenia: Past, Present and Future. *Curr Top Med Chem* 16(29): 3385–3403.
<https://www.doi.org/10.2174/1568026616666160608084834>
32. Droperidol. Ligand Activity Charts. IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology. Режим доступа: <https://www.guidetopharmacology.org> (доступ от 29.05.2023)
33. Donahue TJ, Hillhouse TM, Webster KA, Young R, De Oliveira EO, Porter JH (2017) Discriminative stimulus properties of the atypical antipsychotic amisulpride: comparison to its isomers and to other benzamide derivatives, antipsychotic, antidepressant, and antianxiety drugs in C57BL/6 mice. *Psychopharmacology (Berl)* 234(23–24): 3507–3520.
<https://www.doi.org/10.1007/s00213-017-4738-y>
34. Meltzer HY, Bobo WV (2012) Antipsychotic and anticholinergic drugs. In: *M Gelder* (ed) *New Oxford Textbook of Psychiatry* 2 ed. Oxford. Oxford Acad.

Pharmacoenkephalographic Assessment of Antipsychotic Agents' Effect Dose-Dependency in Rats

Yu. I. Sysoev^{a, b, c, d, e, *}, D. D. Shits^a, M. M. Puchik^a, I. S. Knyazeva^d, M. S. Korelov^d,
V. A. Prikhodko^{a, d}, I. A. Titovich^a, N. O. Selizarova^a, and S. V. Okovityi^{a, d}

^aSaint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, St. Petersburg, Russia

^bPavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

^cInstitute of Translational Biomedicine, Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

^dBechtereva Institute of the Human Brain, St. Petersburg, Russia

^eSirius University, Sochi, Russia

*e-mail: susoyev92@mail.ru

Pharmacoenkephalography (pharmaco-EEG) is a prominent instrument for the pharmacological screening new psychoactive molecules. This experimental approach has not remained a vestige of neurobiological studies, and can be used successfully to complete today's research objectives. The development and rise to universal use of machine learning techniques opens up novel prospects for the use of pharmaco-EEG data to solve the problems of classification and prognosis. We have previously shown that naïve Bayes classifier (NBC) combined with the principal component analysis (PCA) can be used to differentiate between antipsychotic and sedative drug effects as well as to distinguish among the antipsychotics' effects. In the present study, we evaluated the possibility to employ this method to assess the dose-dependency of antipsychotic effects. The experiments were carried out in white outbred male rats with chronically implanted electrocorticographic electrodes. As the agents of interest, we chose two drugs with antipsychotic activity, chlorpromazine and promethazine, in three doses each (0.1, 1, 10 mg/kg and 0.5, 5 and 20 mg/kg, respectively). The training set, used as a reference to determine the pharmacological effects of the agents of interest, included the D₂-dopamine receptor blocker haloperidol, M-cholinergic receptor blocker tropicamide, H₁-histamine receptor blocker chlorpyramine, the sedative dexmedetomidine, and the anxiolytic phenazepam. We have shown that the lowest chlorpromazine dose (0.1 mg/kg) can be characterized as antipsychotic with a marked histaminolytic effect, while the highest one (10 mg/kg) exhibits predominantly antipsychotic activity

with a cataleptogenic effect. All the doses demonstrated anticholinergic activity, which increased with the dose. For promethazine, we observed a clear dose-dependent transition from antipsychotic action to cataleptogenic, alongside a notable antimuscarinic effect of all doses. None of promethazine doses showed any resemblance to chlorpromazine, which probably indicates its anti-dopaminergic and antimuscarinic effects being able to mask its H_1 -antihistamine effect in the used dose range. In summary, our results demonstrate that NBC coupled with PCA can be used to determine the dose-dependency of antipsychotic agents' effects based on their impact on electrocorticogram parameters. Further development of this method as well as expansion of psychotropic agent electropharmacogram library would allow for more precise prognosis of pharmacological activity of the agents of interest.

Keywords: naïve Bayes classifier, machine learning, pharmacoelectroencephalography, electrocorticography, antipsychotics, chlorpromazine, promethazine

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ
ВОДНОГО КАНАЛА AQP4 ВЫЗЫВАЕТ УСИЛЕНИЕ
АЛЬФА-СИНУКЛЕИНОВОЙ ПАТОЛОГИИ В ЧЕРНОЙ СУБСТАНЦИИ
В МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА У КРЫС**

© 2023 г. К. В. Лапшина¹, *, М. В. Ханина¹, М. П. Кайсманова¹, И. В. Екимова¹

¹*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия*

**E-mail: ksenia.lapshina@gmail.com*

Поступила в редакцию 03.10.2023 г.

После доработки 07.10.2023 г.

Принята к публикации 07.10.2023 г.

Нарушение фолдинга белка α -синуклеина, способствующее образованию нейротоксичных олигомеров и агрегатов, является одной из основных причин гибели дофамин (ДА)-ергических нейронов компактной части черной субстанции (кЧС) при болезни Паркинсона (БП). Ранее мы установили, что фармакологическое ингибирование активности водного канала аквапорина-4 (AQP4), участвующего в механизмах очистки мозга от амилоидогенных белков, усиливало процесс нейродегенерации в nigrostriatalной системе и вызывало появление моторных нарушений в лактастининовой модели БП. Предполагается, что прогрессирование нейродегенерации происходит из-за избыточного накопления патологических форм α -синуклеина в кЧС вследствие снижения активности AQP4. Задача данного исследования – выяснить, приводит ли фармакологическое ингибирование активности водного канала AQP4 в головном мозге к усилению α -синуклеиновой патологии в кЧС в модели БП у крыс. Эксперименты выполнены на самцах крыс популяции Вистар. Активность AQP4 подавляли с помощью ингибитора TGN-020, введя его в боковой желудочек головного мозга. Для воспроизведения модели БП использовали специфический ингибитор протеасом лактастин (ЛЦ), который вводили билатерально в кЧС. В исследовании применены иммуноблоттинг и конфокальная микроскопия. Модель БП характеризовалась патологическим накоплением общей водорастворимой и фосфорилированной по Ser129 форм α -синуклеина в ткани кЧС и образованием нерастворимых агрегатов α -синуклеина в ДА-ергических нейронах кЧС. Введение TGN-020 приводило к усугублению α -синуклеиновой патологии в модели БП, проявлявшемуся повышением уровней водорастворимой и модифицированной форм α -синуклеина, а также увеличением количества агрегатов α -синуклеина в черной субстанции в 1.9 раза. Предполагается, что дисфункция AQP4 является одним из механизмов, приводящих к нейродегенерации и накоплению амилоидогенных белков в паренхиме головного мозга при БП. Водный канал AQP4 может явиться перспективной мишенью для разработки терапевтических подходов, направленных на ослабление цитотоксичности, аккумуляции и распространения α -синуклеина в головном мозге при развитии Паркинсон-подобной патологии.

Ключевые слова: аквапорин-4, α -синуклеин, нейродегенерация, убиквитин-протеасомная система, черная субстанция, болезнь Паркинсона

DOI: 10.31857/S0869813923110079, EDN: GNBVKL

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) — прогрессирующее хроническое нейродегенеративное заболевание, является одной из актуальнейших биомедицинских проблем современности. Это связано с тем, что БП, несмотря на активный поиск терапевтических подходов, по-прежнему остается неизлечимой, а ее распространенность неуклонно растет [1, 2]. Для решения этой проблемы необходимы исследования, направленные на дальнейшее изучение патогенеза этого заболевания.

Характерной чертой БП является обширная дегенерация дофамин (ДА)-ергических нейронов компактной части черной субстанции (кчЧС) и других структур головного мозга, что приводит к развитию комплекса моторных и немоторных симптомов [3]. Согласно современной точке зрения, ключевым патогенетическим звеном этого заболевания является избыточное накопление в клетках и межклеточном пространстве токсичных форм белка α -синуклеина. Физиологическая функция α -синуклеина в клетке до сих пор до конца не выяснена. Однако в связи с тем, что он локализован в основном в аксонах и пресинаптических окончаниях нейронов, предполагается, что он принимает участие в регуляции везикулярного пула и передачи нервного импульса [4]. Особенностью данного белка является наличие сайтов для модификаций (в частности, фосфорилирования) и способность к образованию олигомеров, обладающих выраженным цитотоксическим действием, а также фибрилл и агрегатов. Известно, что α -синуклеин может покидать нейроны, выходить во внеклеточное пространство, передаваться другим нейронам по прион-подобному механизму, а также захватываться астроцитами и микроглиоцитами путем рецептор-опосредованного эндоцитоза и фагоцитоза [5–7]. В связи с этим поиск фармакологических препаратов или иных подходов, целью которых будет снижение цитотоксичности, предотвращение накопления и распространения α -синуклеина, представляется весьма важным и актуальным направлением.

Одним из факторов, приводящих к аккумуляции α -синуклеина в нейронах, является развивающееся с возрастом снижение эффективности работы систем деградации белков — убиквитин-протеасомной системы (УПС) и аутофаголизосомной системы, обеспечивающих протеолиз внутриклеточных aberrантных белков и их агрегатов [8]. Другим predisposing фактором к накоплению α -синуклеина фактором может быть ухудшение клиренса различных метаболитов (и в том числе — амилоидогенных белков) из паренхимы головного мозга, происходящее в результате снижения качества работы механизма, получившего название “глимфатическая система” [9, 10]. Согласно предложенной гипотезе, эта система обеспечивает выведение метаболитов и амилоидогенных белков в ликвор, откуда потом они могут элиминироваться при участии менингеальных лимфатических сосудов и глубоких шейных лимфатических узлов [9–11]. Предполагается, что ликвор может поступать в толщу мозга вдоль артериол, окруженных отростками астроцитов, формирующими гематоэнцефалический барьер. На отростках астроцитов располагается селективный водный канал аквапорин-4 (aquaporin-4, AQP4), являющийся наиболее распространенным в центральной нервной системе представителем семейства аквапоринов. Входящая в состав ликвора вода с помощью AQP4 поступает в ткань мозга, способствуя выведению метаболитов из ткани мозга в ликвор для последующей элиминации при участии лимфатической системы. Однако следует отметить, что механизмы, за счет которых достаточно крупные белки могут быть выведены в ликворную систему, все еще не изучены. Несмотря на огромный интерес исследователей к глимфатической системе и ее роли в развитии различных неврологических расстройств, представления о ней пока нельзя назвать окончательно сформированными из-за ряда противоречий и пробелов в знании относительно механизмов ее функционирования и организации [11, 12].

Водный канал AQP4 является ключевым участником лимфатической системы, и его важнейшей физиологической функцией можно назвать участие в регуляции водного и ионного баланса в ткани мозга [13]. В настоящее время активно исследуется роль AQP4 в патогенезе нейродегенеративных заболеваний, однако пока основное внимание сосредоточено на болезни Альцгеймера. Показано, что лимфатическая система обеспечивает выведение амилоидогенных белков из паренхимы головного мозга в моделях болезни Альцгеймера у животных [14, 15]. Однако степень воздействия этой системы на удаление патологических форм α -синуклеина из мозга и прогрессирование Паркинсон-подобных признаков БП остается плохо изученной. Данные, имеющиеся в литературе, предполагают наличие взаимосвязи между функциональной активностью AQP4 и БП. Выявлена отрицательная корреляция между содержанием α -синуклеина и уровнем экспрессии AQP4 в височной коре головного мозга у пациентов с БП [16]. Кроме того, было обнаружено, что определенные варианты однонуклеотидного полиморфизма гена *Aqp4* сопряжены с более высоким риском развития БП и появлением когнитивных нарушений [17, 18].

Связь между дисфункцией лимфатического клиренса и патологией БП постепенно подтверждается и в моделях БП у животных. Показано, что при введении нокаутированным по AQP4 мышам фибрилл α -синуклеина в дорсальный стриатум через 3 месяца отмечается усиленное накопление фосфорилированного по Ser129 α -синуклеина в составе агрегатов в дорсальном стриатуме, коре мозга и кЧЧС, сопровождающееся увеличением числа погибших ДА-ергических нейронов и усугублением моторных нарушений [19]. Следует отметить, что через 6 месяцев в кЧЧС, в отличие от других исследуемых структур, было отмечено снижение количества агрегатов α -синуклеина, однако их содержание у нокаутированных по AQP4 все равно было выше, чем у мышей дикого типа. Авторы приходят к выводу, что снижение экспрессии AQP4 может усугублять Паркинсон-подобную патологию, и возможной причиной является нарушение лимфатического пути. В другом исследовании было показано, что у нокаутированных по AQP4 мышей, у которых индуцировали гиперэкспрессию человеческого A53T α -синуклеина в кЧЧС, отмечается усиленное накопление мономеров α -синуклеина через 2 недели после начала эксперимента, что, по мнению авторов, указывает на тесное взаимодействие между AQP4-опосредованной лимфатической системы и α -синуклеином, находящимся в паренхиме мозга [20].

Однако для более полного понимания роли AQP4 в выведении из паренхимы головного мозга патологических форм α -синуклеина, характерных для БП, необходимо использование не только нокаутированных по AQP4 животных, но и других подходов, направленных на нарушение функционирования AQP4. Кроме того, такие исследования предусматривают использование разных по патогенетической значимости моделей БП у животных. Ранее в нашей лаборатории на основе угнетения активности УПС в головном мозге с помощью лактацистина, созданы модели доклинической и клинической стадий БП у крыс [21]. Эта модель патогенетически обоснована и позволяет воспроизвести признаки α -синуклеиновой патологии, а также другие патоморфологические, нейрохимические и поведенческие признаки БП [8, 22–25]. В исследовании, выполненном нами ранее, было установлено, что фармакологическое ингибирование активности водного канала AQP4 в лактацистиновой модели доклинической стадии БП у крыс приводит к прогрессированию нейродегенерации в нигростриатной системе и признаков моторного дефицита [26]. Нами высказана гипотеза, что прогрессирование нейродегенерации и моторных нарушений происходит из-за усиленного накопления патологических форм белка α -синуклеина в ткани кЧЧС вследствие снижения активности AQP4-опосредованной лимфатической системы. Задача настоящего исследования – выяснить, при-

водит ли фармакологическое ингибирование активности водного канала AQP4 в головном мозге к усилению α -синуклеиновой патологии в кЧЧС в модели БП у крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

Эксперименты были выполнены на взрослых самцах крыс популяции Вистар в возрасте 6–7 мес. и массой тела 350–400 г, выращенных в виварии Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН. Животных содержали в виварии Института с неограниченным доступом к пище и воде при естественном освещении и температуре воздуха 21–23°C.

Дизайн эксперимента и применяемые препараты

Для исследования нами была выбрана хроническая модель БП у крыс, разработанная в лаборатории сравнительной термофизиологии и созданная путем угнетения активности УПС в нигростриатной системе [21]. Данная модель позволяет воспроизвести основные патофизиологические признаки доклинической и клинической стадий БП у крыс (развитие α -синуклеиновой патологии, нейродегенеративного процесса в нигростриатной системе и моторных нарушений). Для угнетения активности протеасом использовали специфический ингибитор их ферментативной активности лактацистин (ЛЦ) (Enzo Life sciences, Великобритания). Введение ЛЦ осуществляли двукратно и билатерально в кЧЧС в дозах 0.4 мкг/мкл (первая микроинъекция ЛЦ) и 4.0 мкг/мкл (вторая микроинъекция ЛЦ). Интервал между введениями составлял 7 дней. Для исследования влияния фармакологического ингибирования AQP4 мы применяли ингибитор 2-(никотинамид)-1,3,4-тиадиазол (2-(nicotinamide)-1,3,4-thiadiazole, TGN-020). Препарат был синтезирован В.А. Полукеевым (АО “Вектон”, Санкт-Петербург) в виде натриевой соли для повышения растворимости согласно методическим протоколам разработчиков препаратов [27]. Решение отказаться от коммерчески доступного TGN-020 было обусловлено тем, что это вещество плохо растворяется в водных растворах. Для его разведения нужен диметилсульфоксид, применение которого для введения в ликворную систему было нежелательно из-за возможного токсического эффекта. TGN-020 вводили в боковой желудочек мозга в дозе 40 мкг и в объеме 6 мкл за 15 мин до введения ЛЦ. Используемая доза была подобрана при выполнении предшествующего исследования [26]. Используемые в исследовании препараты растворяли в стерильном фосфатно-солевом буфере (phosphate buffered saline (PBS), пропущенном через фильтр-насадку на шприц (PVDF, 0.22 мкм, Jet Biofil, Корея). Стерильный PBS применялся в качестве контрольного раствора.

Для выполнения исследования путем простой рандомизации были сформированы следующие группы животных:

Группа 1. Контроль PBS + PBS ($n = 6$ (иммуноблоттинг) и $n = 6$ (иммуногистохимическое исследование (ИГХ)); введение PBS (контрольного раствора) в левый боковой желудочек и в кЧЧС);

Группа 2. TGN-020 + PBS ($n = 6$ (иммуноблоттинг) и $n = 6$ (ИГХ); введение TGN-020 в левый боковой желудочек и PBS в кЧЧС);

Группа 3. LC + PBS ($n = 6$ (иммуноблоттинг) и $n = 6$ (ИГХ); введение PBS в левый боковой желудочек и ЛЦ (LC) в кЧЧС);

Группа 4. LC + TGN-020 ($n = 6$ (иммуноблоттинг) и $n = 6$ (ИГХ); введение TGN-020 в левый боковой желудочек и ЛЦ (LC) в кЧЧС).

При проведении данного исследования и обработке результатов слепые методы не применялись.

*Проведение операции по вживлению проводящих канюль
и техника выполнения микроинъекций препаратов*

Для установки проводящих канюль животных наркотизировали с использованием препарата Золетил (Zoletil®, Virbac, Франция), в дозе 60 мг/кг, внутримышечно) и помещали в стереотаксическое устройство (Narishige, Япония). Канюли располагали согласно данным атласа головного мозга для крыс линии Вистар [28] по координатам: кЧЧС — 5 мм каудальнее брегмы и 2 мм слева и справа от саггитального шва и на глубину 5.5–6 мм, левый боковой желудочек — 0.5 мм каудальнее брегмы, 1.5 мм латерально, 4 мм вглубь. Для того, чтобы зафиксировать канюли на поверхности черепа, применяли зубной цемент “Акродент” (“Стома”, Украина). После окончания операции канюли закрывали мандренами.

Введение препаратов начинали не ранее чем через 7–10 дней после операции. Перед выполнением микроинъекций крыс наркотизировали золетилом (внутримышечно, 45 мг/кг), фиксировали в стереотаксическом устройстве (Narishige, Япония) и вводили препараты с помощью шприца Hamilton. Скорость введения препаратов в канюлю составляла 0.5 мкл/мин (для TGN-020) и 0.1 мкл/мин (для ЛЦ). Через 21 день после начала введения препаратов животных наркотизировали с использованием хлоралгидрата (400 мг/кг), декапитировали и извлекали мозг для подготовки проб для иммуноблоттинга или препаратов для иммуногистохимического исследования.

Вестерн-блоттинг

Для оценки содержания в кЧЧС белка α -синуклеина и его формы, фосфорилированной в положении Ser129, был использован Вестерн-блоттинг. Образцы ткани мозга, содержащие кЧЧС, гомогенизировали с помощью пестика и лизировали с применением буфера Radioimmunoprecipitation Assay (RIPA) buffer с добавлением коктейля ингибиторов протеаз (Sigma, США) и фосфатаз PhosStop (Roche, Швейцария). Затем лизаты ткани центрифугировали и измеряли концентрацию белка в супернатанте с помощью набора для колориметрического определения белка с использованием бицинониновой кислоты (BCA) (Servicebio, Китай). Пробы растворяли в однократном буфере для нанесения проб (SDS — 2%, TrisHClpH 6.8–62.5 мМ, глицерол — 10%, бромфеноловый синий, β -меркаптоэтанол — 10%), после чего выполняли термическое демаскирование антигена при температуре 99°C в течение 8 мин. Количество белка, вносимого в лунку, составляло 20 мкг. Каждый гель содержал пробы, полученные и от контрольных, и от экспериментальных животных. Разделение белков производили в 11%-ном полиакриламидном геле по Лэммли с помощью электрофореза в камере Mini-Protean (Bio-Rad, США). После разделения белки из геля переносили на PVDF-мембрану (Bio-Rad, США) с размером пор 0.22 мкм. Для того чтобы предотвратить неспецифическое связывание антител, мембраны инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в PBS с добавлением 0.1% Tween-20 и 5% обезжиренного сухого молока. Для выполнения иммунообочения применяли первичные моноклональные антитела мыши к общему α -синуклеину (1 : 900, Santa-Cruz, США), поликлональные антитела кролика к α -синуклеину, фосфорилированному в положении Ser129 (1 : 700; Elk, Китай) и контролю нагрузки GAPDH (1 : 3000; Affinity, Китай). Инкубацию выполняли в течение ночи при 4°C и постоянном бережном перемешивании на шейкере. В работе использованы вторичные антитела козы к кролику и мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (1 : 10000; Jackson's Laboratories, США), инкубацию проводили в течение 1 ч при комнатной температуре. Для выявления пероксидазной реакции применяли набор ECL Immuno-Cruz (Santa-Cruz, США) и систему гель-документирования ChemiDoc TM (Bio-Rad, США). Денситометрический анализ изображе-

ний, полученных с помощью системы гель-документирования, осуществлялся с помощью программы ImageJ/Fiji (НИН, США). Уровень серого белковых дорожек, иммунореактивных к общему α -синуклеину и α -синуклеину, фосфорилированному в положении Ser129, был скорректирован по фоновому сигналу и нормирован на сигнал контроля нагрузки. Сигнал белка интереса контрольной группы принимали за 100% и сопоставляли с ними сигналы остальных экспериментальных групп.

Метод ловушки на фильтре (Filter trap assay)

Метод ловушки на фильтре был применен с целью оценки количества агрегатов α -синуклеина в ткани кЧЧС. Лизаты кЧЧС крыс инкубировали в 2%-ном растворе SDS при 98°C в течение 5 мин. Затем в лунки камеры для дот-блоттинга Bio-Dot (BioRad, США), на дне которой была расположена ацетат-целлюлозная мембрана с диаметром пор 0.22 мкм, вносили по 200 мкг каждого образца. Камеру соединяли с вакуумным насосом, под действием которого растворенные белки проходили сквозь мембрану, а нерастворимые белковые агрегаты оставались на ней. После этого мембрану промывали буферным раствором (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% SDS) и затем при комнатной температуре в течение 1 ч инкубировали в блокирующем растворе (PBS с 0.1% Tween-20 и 5% обезжиренное сухое молоко). Для иммуномечения мембрану инкубировали с первичными поликлональными антителами мыши к общему α -синуклеину (1 : 900; Santa-Cruz, США) в течение ночи при 4°C при постоянном бережном перемешивании на орбитальном шейкере. Далее были применены вторичные антитела козы к мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (1 : 10000; Jackson's Laboratories, США), период инкубации составлял 1 ч при комнатной температуре. Визуализацию проводили с применением набора ECL Immuno-Cruz (Santa-Cruz, США) и системы гель-документирования ChemiDoc TM ((Bio-Rad, США). Анализ изображения также проводился с помощью программы ImageJ/Fiji (НИН, США). Уровень серого при окрашивании белка в экспериментальных группах сопоставлялся с уровнем серого в контрольной группе.

Двойное иммуномечение и конфокальная микроскопия

Для выполнения иммуногистохимических исследований на криостате (Leica, Германия) при температуре -21... -23°C были приготовлены чередующиеся серии фронтальных срезов головного мозга, содержащие кЧЧС. Толщина срезов составляла 10 мкм, локализация кЧЧС осуществлялась согласно атласу для крыс Wistar [28]. Срезы мозга, нанесенные на адгезивные предметные стекла EpreDia SuperFrost (Fischer Scientific, США), сушили в течение суток при комнатной температуре в вертикальном положении и хранили в морозильной камере при температуре -20°C. Для того чтобы выяснить, происходит ли накопление α -синуклеина именно в DA-ергических нейронах кЧЧС при фармакологическом ингибировании AQP4 в головном мозге в модели БП, нами было выполнена процедура двойного иммуномечения с использованием первичных поликлональных антител кролика против тирозингидроксилазы (TH), скорость-лимитирующего фермента синтеза моноаминов и маркера DA-ергических нейронов (1 : 1000; Abcam, Великобритания) и моноклональных антител мыши к α -синуклеину (1 : 100, Santa-Cruz, США). Инкубация проводилась в течение 12 ч при 4°C. В этом исследовании были применены вторичные антитела осла против IgG кролика, конъюгированные с CF568 (красный сигнал, 1 : 500; Sigma, США) и вторичные антитела козы против IgG мыши, конъюгированные с CF488 (зеленый сигнал, 1 : 500; Sigma, США). Препараты исследовали на конфокальном микроскопе Leica TCS SL (Leica, Германия). Захват изображения производили на 2 независимых каналах. Результирующие изображения получали с помощью программы Leica LAS-AF-Lite, дополнительный анализ

области смешанного сигнала и подтверждение колокализации осуществлялся с помощью программы ImageJ/Fiji (NIH, США).

Статистическая обработка результатов

Анализ полученных результатов проводился в программе GraphPad Prism 8. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка, подходящего для анализа малых выборок. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью *t*-критерия Стьюдента и двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA, с последующим Tukey post-hoc анализом. Различия результатов между группами считали достоверными при уровне значимости $p < 0.05$, результаты представлены в виде $mean \pm SEM$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведенное исследование показало, что введение в ликворную систему головного мозга ингибитора водного канала AQP4 соединения TGN-020 не приводило к изменению уровней общей водорастворимой и модифицированной (Ser129) форм α -синуклеина в кЧЧС (рис. 1a, 1b) по сравнению с контрольной группой (PBS + PBS). Согласно данным, полученным с помощью метода “ловушки на фильтре” и конфокальной микроскопии, TGN-020 не вызывает патологической агрегации белка с формированием нерастворимых включений α -синуклеина в кЧЧС (рис. 1c). На результирующем изображении срезов кЧЧС в ДА-ергических нейронах при введении TGN-020 не обнаруживаются агрегатов α -синуклеина (рис. 2a–2c). Полученные данные свидетельствуют о том, что само по себе применение TGN-020 не вызывает развития признаков α -синуклеиновой патологии. Ранее нами было установлено, что выбранная доза TGN-020 не приводила к развитию нейродегенеративного процесса в нигростриатной системе и появлению моторных дисфункций [26].

Далее мы показали, что в группе крыс, которым вводили ингибитор протеасом ЛЦ (PBS + LC) для моделирования БП, отмечается увеличение уровня общей водорастворимой и фосфорилированной по Ser129 форм α -синуклеина в ткани кЧЧС с формированием нерастворимых агрегатов α -синуклеина (рис. 1a–1c), что характерно для БП. Агрегаты α -синуклеина средних размеров визуализировались не только в цитоплазме, но и в ядрах ДА-ергических нейронов кЧЧС (рис. 2h, 2i). Агрегация была специфической особенностью ДА-нейронов и не наблюдалась в мозге животных, получавших только PBS. Сходные результаты были получены нами ранее при моделировании БП у крыс с помощью ЛЦ [21, 22]. В исследовании, выполненном нами ранее, было показано, что используемая ЛЦ-модель характеризовалась допороговым уровнем нейродегенеративного процесса в нигростриатной системе (менее 50% погибших нейронов в кЧЧС) и не сопровождалась развитием моторных нарушений, что свидетельствовало о соответствии доклинической стадии БП [26]. Выяснено, что введение ингибитора AQP4 животным в модели БП

Рис. 1. Влияние TGN-020 на содержание общей и фосфорилированной в положении Ser129 форм α -синуклеина и на количество его агрегатов в черной субстанции в лактастиновой модели БП у крыс.

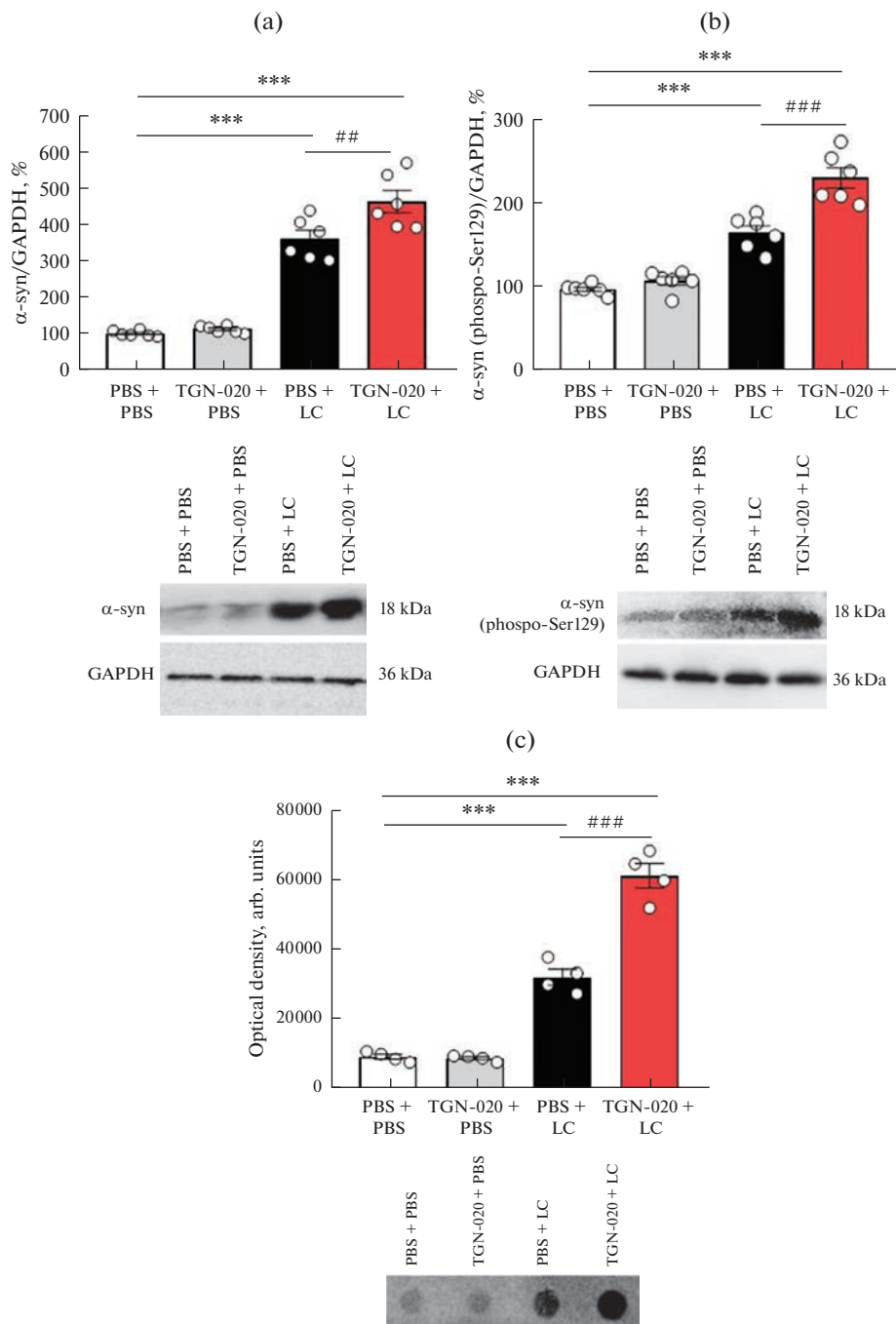
(a) – α -синуклеин (общая форма); для каждой группы $n = 6$ (Interaction F(1, 20) = 5.6; $p = 0.03$; “TGN-020” factor F(1, 20) = 8.7, $p = 0.008$; “LC” factor F(1, 20) = 253.6; $p < 0.001$)).

(b) – α -синуклеин (фосфорилированная форма), для каждой группы $n = 6$ (Interaction F(1, 20) = 12.6; $p = 0.002$; “TGN-020” factor F(1, 20) = 22.8, $p < 0.001$; “LC” factor F(1, 20) = 144.2; $p < 0.001$)).

(c) – α -синуклеин (количество агрегатов), для каждой группы $n = 4$ (Interaction F(1, 12) = 48.9; $p < 0.001$; “TGN-020” factor F(1, 12) = 46.1, $p < 0.001$; “LC” factor F(1, 12) = 324.6; $p < 0.001$)).

*** – $p < 0.001$ – достоверность различий по сравнению с контролем;

– $p < 0.01$, ### – $p < 0.001$ – достоверность различий между ЛЦ и TGN-020 + ЛЦ.



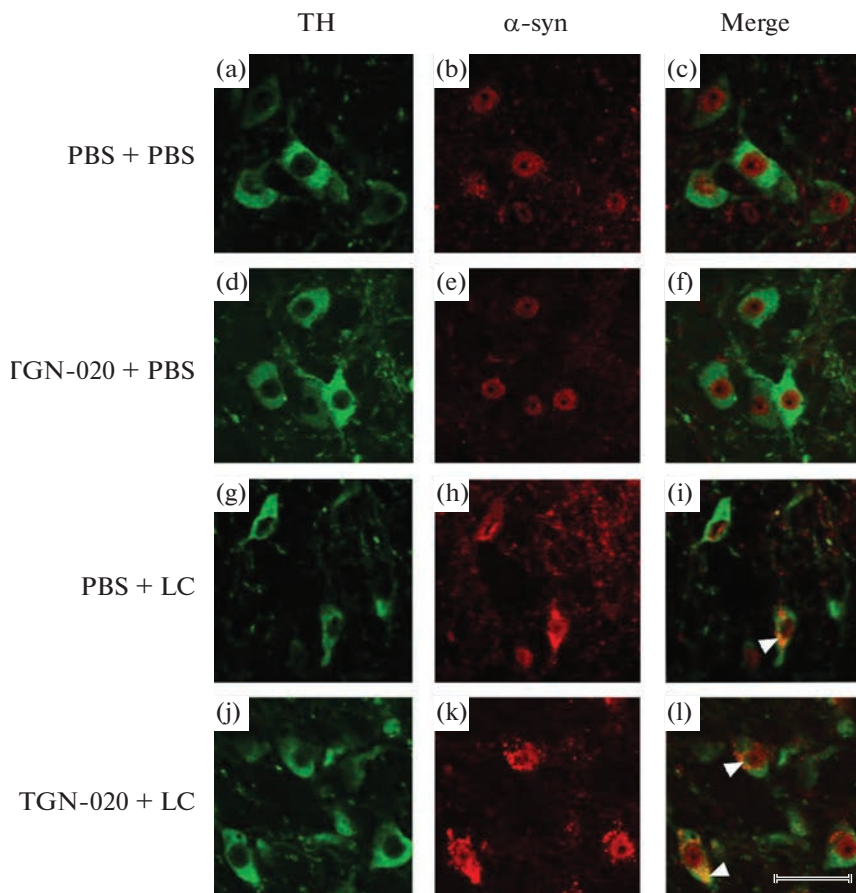


Рис. 2. Влияние TGN-020 на содержание α -синуклеина в ДА-ергических нейронах компактной части черной субстанции в лактастининовой модели БП у крыс. Конфокальная микроскопия, масштаб 50 мкм: двойное иммуноочечнение с применением антител против тирозингидроксилазы (ТГ; зеленый сигнал) и α -синуклеина (красный сигнал). На результирующих изображениях стрелками показаны агрегаты α -синуклеина.

(TGN-020 + LC) вызывает более выраженное накопление патологических форм α -синуклеина. Мы отмечали прирост уровней общей водорастворимой формы α -синуклеина в 1.3 раза и фосфорилированной Ser129 формы — в 1.4 раза (рис. 1a, 1b) в кЧС по сравнению с модельными животными, не получавшими TGN-020. Кроме того, в этих опытах отмечено ускоренное агрегирование α -синуклеина, о чем свидетельствовало увеличение количества нерастворимых агрегатов α -синуклеина в кЧС в 1.9 раза (рис. 1c). Об этом свидетельствовала интенсивность окрашивания следов нерастворимого α -синуклеина, который остался на ацетат-целлюлозной мембране после фильтрации (рис. 1c). Эти данные согласуются с результатами морфологического анализа, свидетельствующего о накоплении агрегатов α -синуклеина в ДА-ергических нейронах кЧС при введении TGN-020 (рис. 2j–l). Таким образом, можно заключить, что фармакологическое ингибирование активности водного канала приводит к усилению характерных для БП признаков α -синуклеиновой патологии. Эти данные согласуются с результатами предшествующего исследования, в ходе которого нами было показано, что применение TGN-020 в условиях ЛЦ-мо-

дели БП вызывало усиление нейродегенеративного процесса в нигростриатной системе, снижение содержания ТГ в ДА-ергических нейронах, развитие сенсомоторного дефицита и появление признаков дисфункции тонкой моторики передних конечностей, рта и языка [26].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для того чтобы выяснить, приводит ли фармакологическое ингибирование активности водного канала AQP4 в головном мозге к усиленному накоплению в кЧЧС патологических форм α -синуклеина, мы применили ЛЦ-модель БП у крыс, для которой характерны признаки α -синуклеиновой патологии. Это проявлялось увеличением содержания общей водорастворимой формы α -синуклеина и образованием нерастворимых агрегатов α -синуклеина в ДА-ергических нейронах кЧЧС. Эти данные согласуются с уже опубликованными исследованиями по этой модели [21, 22, 25]. Следует отметить, что в ЛЦ-модели БП мы также наблюдали увеличение содержания фосфорилированной по Ser129 формы α -синуклеина, что характерно для БП. Согласно распространенной точке зрения, данная модификация α -синуклеина является одной из наиболее нейротоксичных и может способствовать агрегированию белка [29, 30].

Мы обнаружили, что фармакологическое ингибирование активности AQP4 в ЛЦ-модели БП у крыс значительно ускоряет патологическое накопление α -синуклеина в кЧЧС; уровни растворимых мономерных форм α -синуклеина и модифицированной (Ser129) формы значительно превышали уровни, характерные для контрольных модельных животных. При этом накопление α -синуклеина в кЧЧС было сопряжено с увеличением количества его агрегатов в кЧЧС, что указывает на ускорение процесса агрегирования белка. Возможно, это являлось следствием чрезмерного накопления фосфорилированной (Ser129) формы α -синуклеина. Предполагается, что усиление α -синуклеиновой патологии при ингибировании активности AQP4 в модели БП может быть одной из причин прогрессирования нейродегенерации в нигростриатной системе и появления моторных нарушений, свидетельствующих об ускорении перехода от доклинической стадии БП к клинической [26]. Полученные данные указывают на то, что AQP4-опосредованная лимфатическая система играет важную роль в удалении растворимого α -синуклеина из ткани кЧЧС и являются еще одним подтверждением, что дисфункция водного канала AQP4 может быть одним из механизмов патогенеза БП.

Прогрессирование патологических признаков БП при дисфункции водного канала AQP4 отмечено и в других исследованиях. Так, в модели α -патологии у мышей, нокаутированных по AQP4 (AQP4^{+/-}), обнаружено ускоренное накопление патологического α -синуклеина и особенно его нерастворимой формы, содержащей фосфорилированный α -синуклеин Ser129 в стриатуме, черной субстанции и моторной коре [19]. Похожие результаты были получены в другом исследовании, где было установлено, что индукция оверэкспрессии человеческого A53T- α -синуклеина в ЧС у мышей, нокаутированных по AQP4, приводила к усилению накопления α -синуклеина, сопровождавшемуся увеличением числа погибших ДА-ергических нейронов и усилением моторных нарушений [20]. Недавно показано, что ингибирование активности водного канала AQP4 с помощью TGN-020 в 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП)-модели БП у мышей усугубляло не только процесс нейродегенерации в нигростриатной системе, но и реактивный астроглиоз [31]. Усиление амилоидогенеза и нейродегенерации при введении ингибитора TGN-020 отмечено и в животных моделях болезни Альцгеймера [14, 15].

Таким образом, полученные нами экспериментальные данные и данные литературы подтверждают значимость водного канала AQP4 для выведения амилоидных

белков по глимфатическому пути. Нарушение работы AQP4 может значительно снизить эффективность глимфатического клиренса α -синуклеина из межклеточного пространства, приведя тем самым к усилению его распространения, интернализации другими клетками и усугублению нейродегенеративного процесса. В пользу этой версии свидетельствуют результаты экспериментов с введением α -синуклеина с флуоресцентной меткой в дорсальный стриатум и кчЧС нокаутированным по AQP4 мышам, где было отмечено замедление выведения трейсера [19, 20]. Похожий эффект был обнаружен при микроинъекциях меченого α -синуклеина в кчЧС мышам, которым вводили ингибитор AQP4 ацетазоламид [20]. Однако точные механизмы выведения α -синуклеина и других амилоидогенных белков из ткани мозга в ликвор остаются неизвестными и для того, чтобы их выяснить, требуется продолжение исследований в этой области. Так как AQP4 вовлечен в регуляцию водного обмена в мозге, можно предположить, что его дисфункция может привести к нарушению гидростатического давления и ионного баланса, изменению микроциркуляции жидкости между параваскулярным, межклеточным и внутриклеточным пространством [32]. Дефицит AQP4 может приводить к снижению внеклеточного содержания ионов калия и накоплению внеклеточного глутамата и эксайтотоксичности, которая, в свою очередь, может способствовать гибели DA-ергических нейронов при БП [32, 33]. Кроме того, установлено, что нокаутированные по AQP4 мыши характеризовались более высоким уровнем окислительного стресса в головном мозге [34]. Окислительный стресс известен как один из факторов, предрасполагающих к посттрансляционной модификации α -синуклеина и агрегации [35]. Таким образом, ухудшение работы AQP4 приводит к разнообразным нарушениям микроокружения и функционирования нейронов и других клеток мозга. Накопление α -синуклеина и других амилоидогенных белков может быть одним из последствий этих событий. Известно, что важную роль в очистке межклеточного пространства от нейротоксичных форм α -синуклеина и других аберрантных белков играют астроциты, однако дисфункция AQP4 может нарушить способность этих клеток к захвату и деградации α -синуклеина, а также вызвать их гибель [6]. Микроглиоциты также могут поглощать α -синуклеин, однако при этом они также способны продуцировать экзосомы, содержащие этот белок, что способствует дальнейшему распространению α -синуклеиновой патологии и развитию нейровоспаления [36].

Таким образом, результаты наших экспериментов являются еще одним подтверждением существования взаимосвязи между дисфункцией AQP4 и накоплением α -синуклеина в головном мозге при развитии Паркинсон-подобной патологии. Дальнейшее исследование роли AQP4 в контроле водного гомеостаза, обеспечении благоприятных условий для функционирования клеток мозга и своевременной “очистки” ткани мозга от цитотоксических форм α -синуклеина и других белков, участвующих в патогенезе неизлечимых нейродегенеративных заболеваний, представляется весьма актуальным. Поиск путей воздействия на функционирование, внутриклеточную транспортировку и локализацию этого канала может внести значимый вклад в разработку новых методов, направленных на предотвращение или замедление развития Паркинсон-подобных патологий и других нейродегенеративных заболеваний.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Манипуляции с животными соответствовали принципам Базельской декларации и протоколу № 1-14/2022 заседания № 1 комиссии по биоэтике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН от 27.01.2022 г.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-25-00607).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (К.В.Л., И.В.Е.), проведение экспериментов (М.В.Х., М.П.К., К.В.Л.), обработка данных (К.В.Л.), написание и редактирование манускрипта (К.В.Л., И.В.Е.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность В.А. Полукееву (АО “Вектон”, Санкт-Петербург) за синтез водорастворимой формы TGN-020 и В.Н. Шипилову (ИЭФБ РАН, Санкт-Петербург) за проведение лиофилизации этого препарата. При выполнении данного исследования был применен ряд приборов, принадлежащих Центру коллективного пользования ИЭФБ РАН: лиофильная сушилка (Labconco, США), система гель-документирования ChemiDoc TM (Bio-Rad, США), конфокальный микроскоп Leica TCS SL (Leica, Германия).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ou Z, Pan J, Tang S, Duan D, Yu D, Nong H, Wang Z* (2021) Global trends in the incidence, prevalence, and years lived with disability of Parkinson’s disease in 204 countries/territories from 1990 to 2019. *Front Public Health* 9: 776847. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.776847>
2. *Montemurro N, Aliaga N, Graff P, Escibano A, Lizana J* (2022) New targets and new technologies in the treatment of Parkinson’s disease: A narrative review. *Int J Environ Res Public Health* 19(14): 8799. <https://doi.org/10.3390/ijerph19148799>
3. *Raza C, Anjum R, Shakeel NUA* (2019) Parkinson’s disease: Mechanisms, translational models and management strategies. *Life Sci* 226: 77–90. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.03.057>
4. *Calabresi P, Mechelli A, Natale G, Volpicelli-Daley L, Di Lazzaro G, Ghiglieri V* (2023) Alpha-synuclein in Parkinson’s disease and other synucleinopathies: from overt neurodegeneration back to early synaptic dysfunction. *Cell Death Dis* 14(3): 176. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-05672-9>
5. *Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann DM, Hasegawa M* (2013) Prion-like spreading of pathological α -synuclein in brain. *Brain* 136(Pt 4): 1128–1138. <https://doi.org/10.1093/brain/awt037>
6. *Sorrentino ZA, Giasson BI, Chakrabarty P* (2019) α -Synuclein and astrocytes: tracing the pathways from homeostasis to neurodegeneration in Lewy body disease. *Acta Neuropathol* 138(1): 1–21. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-01977-2>
7. *Song N, Chen L, Xie J* (2021) Alpha-synuclein handling by microglia: Activating, combating, and worsening. *Neurosci Bull* 7(6): 751–753. <https://doi.org/10.1007/s12264-021-00651-6>
8. *Frankowska N, Lisowska K, Witkowski JM* (2022) Proteolysis dysfunction in the process of aging and age-related diseases. *Front Aging* 3: 927630. <https://doi.org/10.3389/fragi.2022.927630>
9. *Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, Benveniste H, Vates GE, Deane R, Goldman SA, Nagelhus EA, Nedergaard M* (2012) A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci Transl Med* 4(147): 147ra111. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003748>
10. *Nedergaard M* (2013) Neuroscience. Garbage truck of the brain. *Science* 340(6140): 1529–1530. <https://doi.org/10.1126/science.1240514>

11. *Semyachkina-Glushkovskaya OV, Postnov DE, Khorovodov AP, Navolokin NA, Kurthz JHG* (2023) Lymphatic drainage system of the brain: a New player in neuroscience. *J Evol Biochem Phys* 59: 1–19.
<https://doi.org/10.1134/S0022093023010015>
12. *Ding Z, Fan X, Zhang Y, Yao M, Wang G, Dong Y, Liu J, Song W* (2023) The glymphatic system: a new perspective on brain diseases. *Front Aging Neurosci* 15: 1179988.
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2023.1179988>
13. *Hubbard JA, Szu JI, Binder DK* (2018) The role of aquaporin-4 in synaptic plasticity, memory and disease. *Brain Res Bull* 136: 118–129.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.02.011>
14. *Harrison IF, Ismail O, Machhada A, Colgan N, Ohene Y, Nahavandi P, Ahmed Z, Fisher A, Mef-tah S, Murray TK, Ottersen OP, Nagelhus EA, O'Neill MJ, Wells JA, Lythgoe MF* (2020) Impaired glymphatic function and clearance of tau in an Alzheimer's disease model. *Brain* 143(8): 2576–2593.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.04.012>
15. *Rosu GC, Catalin B, Balseanu TA, Laurentiu M, Claudiu M, Kumar-Singh S, Daniel P* (2020) Inhibition of aquaporin 4 decreases amyloid A β 40 drainage around cerebral vessels. *Mol Neurobiol* 57(11): 4720–4734.
<https://doi.org/10.1007/s12035-020-02044-8>
16. *Hoshi A, Tsunoda A, Tada M, Nishizawa M, Ugawa Y, Kakita A* (2017) Expression of aquaporin 1 and aquaporin 4 in the temporal neocortex of patients with Parkinson's Disease. *Brain Pathol* 27(2): 160–168.
<https://doi.org/10.1111/bpa.12369>
17. *Fang Y, Dai S, Jin C, Si X, Gu L, Song Z, Gao T, Chen Y, Yan Y, Yin X, Pu J, Zhang B* (2022) Aquaporin-4 polymorphisms are associated with cognitive performance in Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci* 13: 740491.
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.740491>
18. *Sun X, Tian Q, Yang Z, Liu Y, Li C, Hou B, Xie A* (2023) Association of AQP4 single nucleotide polymorphisms (rs335929 and rs2075575) with Parkinson's disease: A case-control study. *Neurosci Lett* 797: 137062.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2023.137062>
19. *Cui H, Wang W, Zheng X, Xia D, Liu H, Qin C, Tian H, Teng J* (2021) Decreased AQP4 expression aggravates α -synuclein pathology in Parkinson's disease mice, possibly via impaired glymphatic clearance. *J Mol Neurosci* 71: 1–14.
<https://doi.org/10.1007/s12031-021-01836-4>
20. *Zhang Y, Zhang C, He XZ, Li ZH, Meng JC, Mao RT, Li X, Xue R, Gui Q, Zhang GX, Wang LH* (2023) Interaction between the glymphatic system and α -synuclein in Parkinson's disease. *Mol Neurobiol* 60(4): 2209–2222.
<https://doi.org/10.1007/s12035-023-03212-2>
21. *Ekimova IV, Belan DV, Lapshina KV, Pastukhov YuF* (2023) The use of the proteasome inhibitor lactacystin for modeling Parkinson's disease: Early neurophysiological biomarkers and candidates for intranigral and extranigral neuroprotection. In: *Handbook of Animal Models in Neurological Disorders*. (Eds) Martin CR, Patel VB, Preedy VR. Acad Press, Elsevier. 507–523.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89833-1.00008-2>
22. *Ekimova IV, Plaksina DV, Pastukhov YF, Lapshina KV, Lazarev VF, Mikhaylova ER, Polonik SG, Pani B, Margulis BA, Guzhova IV, Nudler E* (2018) New HSF1 inducer as a therapeutic agent in a rodent model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 306: 199–208.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.04.012>
23. *McNaught KS, Perl DP, Brownell AL, Olanow CW* (2004) Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 56(1): 149–162.
<https://doi.org/10.1002/ana.20186>
24. *Vernon AC, Johansson SM, Modo MM* (2010) Non-invasive evaluation of nigrostriatal neuropathology in a proteasome inhibitor rodent model of Parkinson's disease. *BMC Neurosci* 11: 1.
<https://doi.org/10.1186/1471-2202-11-1>
25. *Savolainen MH, Albert K, Airavaara M, Myöhänen TT* (2017) Nigral injection of a proteasomal inhibitor, lactacystin, induces widespread glial cell activation and shows various phenotypes of Parkinson's disease in young and adult mouse. *Exp Brain Res* 235(7): 2189–2202.
<https://doi.org/10.1007/s00221-017-4962-z>
26. *Lapshina KV, Abramova YY, Guzeev MA, Ekimova IV* (2022) TGN-020, an inhibitor of the water channel aquaporin-4, accelerates nigrostriatal neurodegeneration in the rat model of Parkinson's disease. *J Evol Biochem Phys* (58): 2035–2047.
<https://doi.org/10.1134/S0022093022060308>

27. Nakamura Y, Suzuki Y, Tsujita M, Huber VJ, Yamada K, Nakada T (2011) Development of a novel ligand, [C]TGN-020, for aquaporin 4 positron emission tomography imaging. *ACS Chem Neurosci* 2(10): 568–571.
<https://doi.org/10.1021/cn2000525>
28. Paxinos G, Watson C (2007) The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th Ed. San Diego. Acad Press.
29. Sato H, Arawaka S, Hara S, Fukushima S, Koga K, Koyama S, Kato T (2011) Authentically phosphorylated α -synuclein at Ser129 accelerates neurodegeneration in a rat model of familial Parkinson's disease. *J Neurosci* 31(46): 16884–16894.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3967-11.2011>
30. Kawahata I, Finkelstein DI, Fukunaga K (2022) Pathogenic impact of α -synuclein phosphorylation and its kinases in α -synucleinopathies. *Int J Mol Sci* 23(11): 6216.
<https://doi.org/10.3390/ijms23116216>
31. Si X, Dai S, Fang Y, Tang J, Wang Z, Li Y, Song Z, Chen Y, Liu Y, Zhao G, Zhang B, Pu J (2023) Matrix metalloproteinase-9 inhibition prevents aquaporin-4 depolarization-mediated glymphatic dysfunction in Parkinson's disease. *J Adv Res* 20: S2090–S1232.
<https://doi.org/10.1016/j.jare.2023.03.004>
32. Vandebroek A, Yasui M (2020) Regulation of AQP4 in the Central Nervous System. *Int J Mol Sci* 21(5): 1603.
<https://doi.org/10.3390/ijms21051603>
33. Zhang Y, Tan F, Xu P, Qu S (2016) Recent advance in the relationship between excitatory amino acid transporters and Parkinson's disease. *Neural Plast* 2016: 8941327.
<https://doi.org/10.1155/2016/8941327>
34. Liu L, Lu Y, Kong H, Li L, Marshall C, Xiao M, Ding J, Gao J, Hu G (2012) Aquaporin-4 deficiency exacerbates brain oxidative damage and memory deficits induced by long-term ovarian hormone deprivation and D-galactose injection. *Int J Neuropsychopharmacol* 15(1): 55–68.
<https://doi.org/10.1017/S1461145711000022>
35. Won SJ, Fong R, Butler N, Sanchez J, Zhang Y, Wong C, Tambou Nzoutchoum O, Huynh A, Pan J, Swanson RA (2022) Neuronal oxidative stress promotes α -synuclein aggregation in vivo. *Antioxidants (Basel)* 11(12): 2466.
<https://doi.org/10.3390/antiox11122466>
36. Song N, Chen L, Xie J (2021) Alpha-synuclein handling by microglia: activating, combating, and worsening. *Neurosci Bull* 37(6): 751–753.
<https://doi.org/10.1007/s12264-021-00651-6>

Pharmacological Inhibition of the AQP4 Water Channel Activity Causes an Aggravation of Alpha-Synuclein Pathology in the Substantia Nigra in a Rat Model of Parkinson's Disease

K. V. Lapshina^{a,*}, M. V. Khanina^a, M. P. Kaismanova^a, and I. V. Ekimova^a

^a*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

**e-mail: ksenia.lapshina@gmail.com*

The misfolding of the protein α -synuclein, which leads to the formation of neurotoxic oligomers and aggregates, is one of the main causes of loss of dopaminergic (DA) neurons within the substantia nigra pars compacta (SNpc) in Parkinson's disease (PD). We previously found that pharmacological inhibition of the water channel aquaporin-4 (AQP4), participating in the mechanisms of brain clearance of amyloidogenic proteins, caused the aggravation of neurodegeneration in the nigrostriatal system and the development of motor disturbances in a lactacystin model of PD. It was hypothesized that the progression of neurodegeneration can be a result of the excessive accumulation of pathologic forms of α -synuclein due to the AQP4 inhibition. The aim of this study is to determine whether pharmacological inhibition of AQP4 activity in a rat model of preclinical PD leads to an aggravation in α -synuclein pathology. The experiments were performed on male Wistar rats. AQP4 activity was suppressed using the intracerebroventricular injection of inhibitor TGN-020. To reproduce the model of the preclinical stage of PD, a specific proteasome inhibitor lactacystin (LC) was used. It was injected bilaterally into the SNpc. Immunoblotting methods and confocal microscopy were applied. The LC

model of PD was characterized by a pathologic accumulation of total water-soluble and Ser129-phosphorylated forms of α -synuclein, as well as by formation of insoluble α -synuclein aggregates in the DA-neurons of SNpc. TGN-020 caused a significant aggravation of α -synuclein pathology in the LC model of PD. It was manifested by a marked increase in the level of water-soluble and modified forms of α -synuclein and by the 1.9-fold rise in the amount of α -synuclein aggregates in SN. We suppose that the disfunction of AQP4 which is involved in glymphatic system functioning, can be one of the mechanisms leading to the neurodegeneration and accumulation of amyloidogenic proteins in brain parenchyma during PD. The water channel AQP4 might be a target for the development of new therapeutic approaches aimed at attenuation of the cytotoxicity, accumulation and distribution of α -synuclein during the development of PD-like pathology.

Keywords: aquaporin-4, α -synuclein, neurodegeneration, ubiquitin-proteasome system, substantia nigra, Parkinson's disease

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ, ГЕНОМНЫЕ И НЕЙРОХИМИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ
В МОДЕЛИ НЕЙРОТРАВМЫ НА ВЗРОСЛЫХ РЫБАХ ЗЕБРАДАНИО
(*DANIO RERIO*)

© 2023 г. Н. П. Ильин^{1, 2, 3}, Д. С. Галстян^{1, 2, 3}, К. А. Демин^{1, 2}, А. В. Калыев^{1, 2, 3, 4, 5, *}

¹Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия

²Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова МЗ РФ,
Санкт-Петербург, Россия

³Российский научный центр радиологии и хирургических технологий
им. акад. А.М. Гранова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

⁴Направление “Нейробиология”, Научный центр генетики и наук о жизни,
Научно-технологический университет “Сириус”, Федеральная территория Сириус, Россия

⁵Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия

*E-mail: avkalueff@gmail.com

Поступила в редакцию 31.08.2023 г.

После доработки 01.10.2023 г.

Принята к публикации 02.10.2023 г.

Травматическое повреждение мозга (ТПМ, нейротравма) представляет собой серьезную биомедицинскую проблему, особенно в связи с высокой распространенностью и риском смертности. Поэтому необходимо понимание механизмов патогенеза ТПМ как в клинике, так в экспериментальных моделях на животных. В исследовании использовали модель проникающей травмы мозга (теленцефалона) для изучения поведенческих и молекулярных последствий ТПМ у взрослых рыб зебраданио (*zebrafish*, *Danio rerio*). Спустя четыре дня после индукции нейротравмы зебраданио демонстрировали гиполокомоцию в тесте незнакомого аквариума, нарушение рабочей памяти в Y-образном лабиринте и активацию экспрессии в теленцефалоне гена *isg15*, который является биомаркером повреждения нейронов. Кроме того, повреждение теленцефалона вызвало значительное снижение уровня норадреналина (но не дофамина и серотонина) в мозге зебраданио, что может отчасти объяснить наблюдаемые когнитивные дефициты, и подчеркивает потенциальное вовлечение нейротрансмиссивных систем в патогенез ТПМ.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, зебраданио, конечный мозг, поведение, норадреналин, ген *isg15*

DOI: 10.31857/S0869813923110043, EDN: HNGJDI

ВВЕДЕНИЕ

Травматическое повреждение мозга (ТПМ) является повреждением ткани мозга в результате механического воздействия, варьируя от легких сотрясений до тяжелых, угрожающих жизни черепно-мозговых травм [1]. Ежегодно более 60 миллионов человек подвергаются ТПМ, и более 2% населения живут с вызванными им неврологическими нарушениями, позволяя говорить о своеобразной “тихой эпидемии” ТМП [2]. Данная гетерогенная группа патологических состояний имеет разнообразную этиологию и функциональные проявления [3]. Открытые ТПМ ха-

рактируются видимыми повреждениями, кровотечением, возможной инфекцией и серьезными последствиями. Закрытая травма, в свою очередь, происходит без нарушения целостности черепа, но сам мозг при этом повреждается за счет деформации, сдавливания и растяжения [3]. Кроме того, ТПМ может быть классифицировано как очаговое или диффузное, в зависимости от распределения повреждения в мозге [4]. ТПМ влечет за собой ряд функциональных последствий, которые выходят за рамки острого периода травмы и могут сохраняться в течение длительного времени. В частности, распространенным эффектом ТПМ являются когнитивные дисфункции, в том числе нарушение внимания, памяти, исполнительных функций и скорости обработки информации [5]. Эти дисфункции являются характерным маркером ТПМ и наблюдаются как клинически, так и в разнообразных моделях на животных. При ТПМ также распространены моторные нарушения (затруднения двигательной активности и координации движений) [6], изменения эмоциональных состояний (перепады настроения, раздражительность, депрессия, тревога и эмоциональная неустойчивость) [7, 8], а также развитие целого ряда других заболеваний ЦНС, в том числе эпилепсии и болезней Альцгеймера и Паркинсона [9–11].

Эксайтотоксичность является одним из ключевых механизмов вторичного повреждения нейронов при ТПМ [12] и опосредована гиперактивацией рецепторов возбуждающих нейротрансмиттеров (прежде всего глутамата), повышающих внутриклеточную концентрацию кальция через ионотропные рецепторы [13]. Исследования на грызунах [14, 15] и на людях [16, 17] указывают на увеличение внеклеточной концентрации глутамата в мозге после ТПМ. Вероятно, при ТПМ происходит растяжение мембран нейронов, что создает микропоры, обеспечивающие приток ионов натрия внутрь клетки [12], это приводит к деполяризации мембраны, активации потенциал-зависимых кальциевых каналов и высвобождению глутамата во внеклеточное пространство, и, в итоге, избыточному притоку кальция в постсинаптические нейроны [18].

Увеличение внутриклеточной концентрации кальция нарушает нормальное функционирование клетки и активирует ее программируемую смерть [19]. Например, рост его концентрации приводит к активации кальций-зависимых протеаз, липаз и эндонуклеаз, которые инициируют разрушение клеточных структур [20], что приводит к нарушению синаптической передачи, дисфункции нейронных сетей, нарушению нейропластичности и расстройствам поведения, памяти и внимания.

Воспалительный процесс инициируется в первые минуты ТПМ в результате механического повреждения ткани, а также высвобождения молекулярных фрагментов, ассоциированных с повреждениями (DAMPs) [21, 22]. Первичное повреждение вызывает активацию резидентных иммунных клеток микроглии, которые служат первой линией защиты ЦНС. Микроглия быстро претерпевает морфологические и функциональные изменения, переходя из состояния покоя в активированное [23], высвобождая провоспалительные медиаторы (цитокины, хемокины и простагландины) и способствуя окислительному стрессу и нейродегенерации [24].

Астроциты также быстро реагируют на ТПМ, претерпевая морфологические и функциональные изменения (реактивный астроглиоз) [25] и образуя глиальный рубец, который действует как физический барьер, ограничивающий распространение повреждения. Активированные астроциты способны выделять провоспалительные медиаторы, а также наблюдается нарушение обратного захвата ими глутамата из внеклеточного пространства, что способствует эксайтотоксичности [26]. Нарушение целостности гематоэнцефалического барьера при ТПМ открывает возможность для инфильтрации в мозг периферических иммунных клеток – нейтрофилов, макрофагов и лимфоцитов, которые модулируют нейровоспаление, секретируя провоспалительные медиаторы [27]. В этом процессе особую роль играют фактор некроза опу-

холи-альфа (ФНО- α), интерлейкин-1 β (ИЛ- β) и интерлейкин-6 (ИЛ-6), содержание которых в мозге стремительно растет в первые часы после ТПМ [28–31]. Эти цитокины способствуют выработке и высвобождению других провоспалительных медиаторов, усиливая нейровоспаление и нейроапоптоз.

Изучение патофизиологических аспектов ТПМ и их молекулярных механизмов требует широкого спектра экспериментальных моделей на животных. Помимо грызунов, следует отметить растущую роль альтернативных моделей ТПМ на рыбах зебраданио (*zebrafish*, *Danio rerio*) [32, 33]. Цель настоящей работы – валидировать на зебраданио модель ТПМ, вызванной проникающим повреждением теленцефалона, и оценить нейрохимические и геномные изменения в мозге зебраданио в данной модели.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные и их содержание

В исследовании использовали 36 взрослых зебраданио дикого коротко-плавникового типа, возраст 3–5 мес., которые были приобретены у компании ООО “Аксолотль” (Санкт-Петербург, Россия). Животные содержались в виварии Центра доклинических и трансляционных исследований Национального медицинского исследовательского центра им. В.А. Алмазова в соответствии со стандартными условиями [34]. Аутбредная линия дикого типа была использована в настоящем исследовании с учетом популяционной валидности модели патогенеза ЦНС. В частности, в то время как инбредные линии зебраданио более надежны для нейрогенетических исследований, моделирование патологий ЦНС предполагает достижение сходства с “реальными” заболеваниями человека, которые поражают генетически гетерогенные популяции. Таким образом, использование аутбредных зебраданио является более популяционно обоснованным и трансляционно релевантным подходом, соответствующим задачам настоящего исследования.

Для обеспечения оптимальных условий содержания использовалась автоматическая система распределения и очистки воды ZebTec Active Blue Stand (Tecniplast, West Chester, США). Рыбы размещались в ней группами по 15 особей в аквариумах объемом 3 литра. Температура воды автоматически поддерживалась на уровне $27 \pm 0.5^\circ\text{C}$, а значение pH составляло 7.4. Интенсивность освещения составляла 950–960 люкс, с циклом свет/темнота 12/12 ч. Перед началом эксперимента животные прошли акклиматизацию в течение 2 недель. Все животные были экспериментально наивны и не подвергались никаким экспериментальным манипуляциям до начала данного исследования. Все рыбы принадлежали одной популяции и были случайным образом разделены на экспериментальные группы с помощью онлайн-генератора случайных чисел. Распределение рыб по группам, проведение поведенческих тестов и анализ данных выполнялись разными исследователями. При этом каждой группе были присвоены кодовые обозначения, что обеспечивало независимый анализ данных экспериментаторами относительно воздействия. Графическая иллюстрация плана экспериментов представлена на рис. 1.

Постановка модели проникающего повреждения теленцефалона

Постановка модели проводилась согласно методике, описанной ранее [35]. В начале эксперимента животные подвергались анестезии путем погружения в раствор трикаина (170 мг/мл этил-3-аминобензоат метансульфоната, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, США) на 40–60 с, затем фиксировались с помощью губки, также смоченной в трикаине, и помещались под микроскоп. Травмирующее повреждение наносилось путем введения медицинской иглы (30 G) в медиальную область

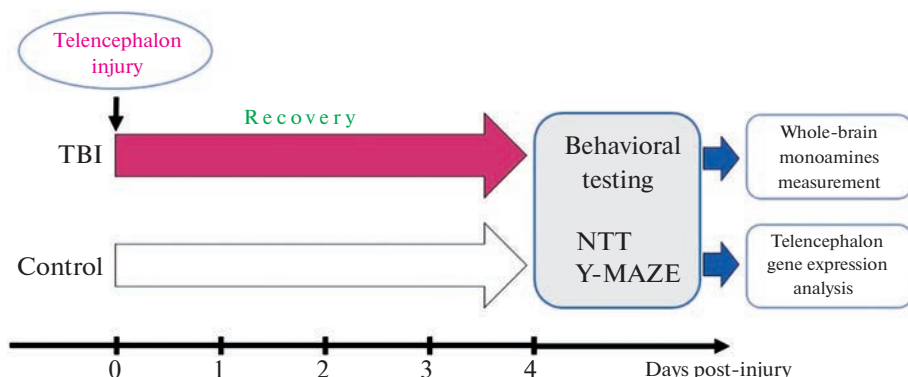


Рис. 1. Общий дизайн исследования. TBI – травматическое повреждение мозга (с периодом адаптации, recovery) в сравнении с контрольной группой (Control), NTT – тест незнакомого аквариума, Y-maze – тест Y-образного лабиринта. По оси приведены дни после TBI.

правой полусферы теленцефалона через крышу черепа на глубину 1.5–2 мм. После этого рыб выпускали в аквариум с чистой водой для восстановления. В результате описанных процедур выживаемость животных составляла 100%. Рыбы контрольной группы были экспериментально наивны, не подвергаясь экспериментальным воздействиям ранее (рис. 1).

Поведенческие тесты

Тест незнакомого аквариума был выбран как наиболее чувствительный и широко используемый метод для оценки параметров поведения и локомоции зебр-данио [36, 37]. Он представлял собой акриловый прямоугольный аквариум размером 20 см (высота) × 20 см (длина) × 5 см (ширина), заполненный водой до уровня 19 см. Задняя и боковые стороны аквариума были окрашены в белый цвет для увеличения контрастности, а передняя сторона оставалась прозрачной. На расстоянии 1 м от аквариума располагалась видеокамера SJCAM SJ4000 (SJCAM Ltd., Шэньчжэнь, Китай). Запись производилась в течение 5 мин (после помещения зебр-данио в аквариум) с частотой 60 кадров в секунду. Далее с помощью программного обеспечения Noldus IT EthoVision XT11.5 (Noldus IT, Wageningen, Нидерланды) были проанализированы поведенческие параметры зебр-данио из сделанных видеозаписей: преодоленная дистанция (см), средняя скорость (см/с), время, проведенное в неподвижном состоянии (с), латентный период первого заплыва в верхнюю часть аквариума (с), время, проведенное в верхней половине аквариума (с) и количество переходов в верхнюю половину аквариума.

Y-образный лабиринт является распространенным тестом для оценки рабочей памяти зебр-данио [38]. В ходе тестирования рыб помещали по одной в белые акриловые Y-образные аквариумы, заполненные водой. Каждый аквариум состоял из трех идентичных рукавов (длина 50, ширина 20, высота 140 мм), расположенных под углом 120° друг к другу. Рыбы имели возможность свободно исследовать все ответвления лабиринта в течение 15 мин, при этом их перемещение фиксировалось на камеру. За это время животное делало определенное количество дискретных выборов (как правило, более 100) – поворотов налево (L) или направо (R). Полученные видеозаписи анализировались в программе Noldus Ethovision, фиксируя время, когда рыба заплывала в каждое плечо (рукав) лабиринта и когда покидала его.

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных в работе

Целевой ген	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>eef1a1l1</i>	CCCAGTGCTGGATTGCCACA	GCGGCATCTCCGGATTGAG
<i>casp3a</i>	CCAGGGTCAACCATAAAGTAGC	TCTTTGGTGAGCATTGAGACGA
<i>Tnfa</i>	GGGCAATCAACAAGATGGAAG	GCAGCTGATGTGCAAAGACAC
<i>isg15</i>	ACTTGATTTCGGTGCGACTTGC	GCTGCATCGTCACCGAGTTAT

Эти данные были преобразованы в последовательность символов L и R, обозначающих левые и правые повороты соответственно [39]. Полученные для каждой рыбы последовательности были далее преобразованы в распределение по 16 тетрад (LLLL, LLLR, LLRL, LLRR, LRLR, LRRL, LRRR, RLLL, RLLR, RLRL, RLRR, RRLR, RRLR, RRRR), нормированным к общему количеству оборотов и выраженным в %, согласно стандартным методикам [38].

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ)

Забор проб теленцефалона проводился непосредственно после проведения поведенческих экспериментов. Рыб умерщвляли путем погружения в ледяную воду, до полной остановки дыхательных движений, после чего под микроскопом вскрывали крышу черепа и извлекали конечный мозг. Выделение РНК осуществлялось с использованием реагента ExtractRNA (Евроген, Москва, Россия) по стандартному протоколу для TriZol-опосредованной экстракции. Обратная транскрипция была выполнена с помощью коммерческого набора MMLV RT kit (Евроген). Для проведения ПЦР-РВ использовали коммерческую реакционную смесь 5X qPCRmix-HS SYBR (Евроген). Сама реакция проводилась в системе ПЦР реального времени CFX96 Touch (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, США). Нуклеотидные последовательности праймеров, используемых в данной работе, приведены в табл. 1.

Дизайн праймеров был осуществлен с использованием базы данных National Center for Biotechnology Information (NCBI) Primer-BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Для расчета изменения относительной экспрессии генов использовался метод $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [40]. В качестве референсного гена был выбран *eef1a1l1* – ген домашнего хозяйства, кодирующий эукариотический фактор инициации трансляции.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Высокоэффективная жидкостная хроматография с электрохимической детекцией (ВЭЖХ-ЭХД) использовалась для анализа содержания моноаминов (норадреналина, дофамина, серотонина) и их метаболитов (3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты – ДОФУК, гомованилиновой кислоты – ГВК и 5-гидроксииндолуксусной кислоты – 5-ГИУК) в пробах головного мозга зебраданио. Методика основана на модифицированной версии протокола, разработанного [41]. Анализ проводился на хроматографе HTEC-500 (Eicom, San Diego, США) с использованием колонки EICOMPAK CA-50DS. Подвижная фаза для ВЭЖХ-ЭХД состояла из 0.1 М фосфатного буфера (pH 6.0), содержащего октансульфонат натрия (1.9 мМ), этилендиаминтетрауксусную кислоту (0.17 мМ) и метанол (1.13 М), pH подвижной фазы – 4.5. Для нормализации данных был использован внутренний стандарт – 1%-ный раствор 3,4-дигидроксibenзиламина в 0.1 М HClO₄ (добавлялся в пробы в соотношении 10 мкл на 1 мг ткани) и внешний стандарт – 0.1 М растворы серотонина, дофамина,

норадrenalина, ДОФУК, ГВК, 5-ГИУК и 3,4-дигидроксibenзиламина (10 мкл каждого раствора на 930 мкл 0.1 М HClO_4). Все реактивы для ВЭЖХ были получены из Sigma Aldrich, St. Louis, США.

Статистическая обработка данных

Полученные данные анализировали с использованием языка программирования R (версия 4.2.1) в среде R-Studio (версия 2022.02.2). Проверка данных на нормальность проводилась с помощью теста Колмогорова–Смирнова. Ввиду отсутствия нормального распределения у исследуемых переменных, данные теста незнакомо аквариума, хроматографии и ПЦР анализировались с использованием непараметрического теста Вилкоксона–Манна–Уитни для независимых выборок. Для анализа распределения тетраграмм переходов в Y-образном лабиринте была построена обобщенная линейная модель (GLM, Poisson distribution, log link), где факторы “Группа”, “Тетраграмма”, и взаимодействие “Группа” $\times$ “Тетраграмма” использовались в качестве предикторов. При обнаружении значимого влияния одного из факторов или когда взаимодействие между факторами было значимым, проводилось попарное сравнение с использованием оцененных маргинальных средних (пакет R “emmeans”, коррекция значения p по методу Сидака). Различия считались статистически значимыми при значении $p < 0.05$.

Расчет размера выборки (n) проводился на основании данных пилотного исследования с использованием функции `power.prop.test` пакета `power` в R. Данная функция позволяет определить примерное n для теста Вилкоксона с учетом желаемой мощности теста (0.80), уровня значимости (0.05), а также значений среднего и стандартного отклонения среднего выбранной переменной для двух групп. В качестве зависимой переменной была выбрана дистанция в тесте незнакомо аквариума как один из наиболее важных поведенческих показателей. В пилотном исследовании значения среднего и стандартного отклонения среднего составили 954 ± 371 см для контрольной группы и 643 ± 245 см для ТПМ (размер эффекта – 0.478). На основании этих данных было получено значение $n = 16$, которое было скорректировано до $n = 18$ с учетом возможной смертности в результате экспериментальных воздействий. В ходе анализа данных удаления выбросов не проводилось. Ввиду повреждения видеофайлов результаты теста незнакомо аквариума не были получены для трех животных (два из контрольной группы и одно из группы ТПМ). Критерием для исключения из финального анализа в тесте Y-образного лабиринта являлось меньшее, чем 100 число поворотов за время теста (отмечалось для двух зебрании из каждой группы).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние ТПМ на поведение в тесте незнакомо аквариума

ТПМ оказало статистически значимое влияние на поведение зебрании в тесте незнакомо аквариума, что выражалось в изменении дистанции, числа переходов между зонами и времени нахождения в верхней половине аквариума (рис. 2 и табл. 2). Рыбы, подвергнутые ТПМ, преодолевали меньшую дистанцию за время теста, а также совершали меньшее число переходов между зонами в сравнении с контрольной группой ($p < 0.05$), что говорит о снижении локомоторной активности. В то же время травма мозга привела к увеличению времени, проведенному в верхней половине аквариума ($p < 0.05$).

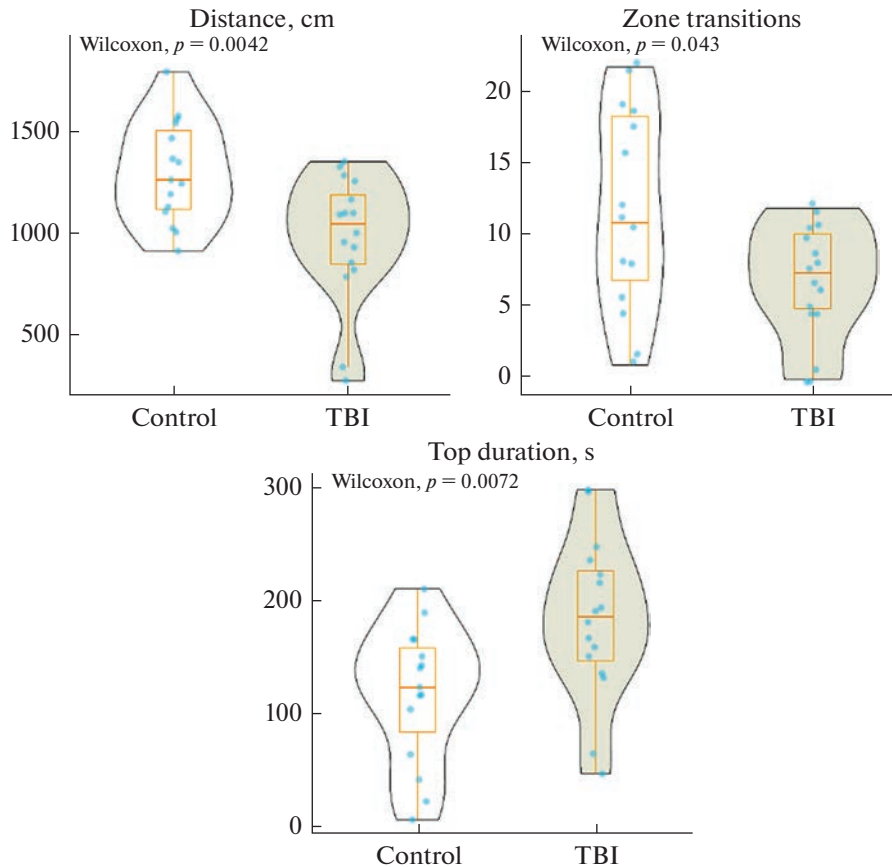


Рис. 2. Влияние травматического повреждения мозга (ТПМ, TBI) на поведение зебрании в тесте незнакомой аквариума. Control – контрольная группа. Оценивали суммарное расстояние, преодоленное животным за время теста (Distance), число переходов между верхней и нижней половинами аквариума (Zone transitions) и суммарное время в верхней половине аквариума (Top duration). Данные представлены как медиана $\pm$ межквартильный размах ($n = 16–17$ в группе) и проанализированы тестом Вилкоксона–Манна–Уитни (Wilcoxon).

Таблица 2. Сравнение ключевых поведенческих показателей теста незнакомой аквариума у зебрании

Группа	Медиана	Q1	Q3	IQR	Критерий Вилкоксона, W	Значение p
Дистанция (см)						
Контроль	1274.35	1130.12	1515.2	385.08	191	<0.01
ТПМ	1059.64	860.83	1200.11	339.27		
Количество переходов между зонами						
Контроль	11	7	18.5	11.5	171.5	<0.05
ТПМ	7.5	5	10.25	5.25		
Время в верхней половине аквариума (с)						
Контроль	126.4	87.2	161.13	73.93	51.5	<0.01
ТПМ	188.6	149.9	228.9	79		

Статистически значимые различия между группами выделены жирным шрифтом (критерий Вилкоксона–Манна–Уитни, $p < 0.05$, $n = 16–17$ в группе). ТПМ – травматическое повреждение мозга. IQR – межквартильный размах (interquartile range).

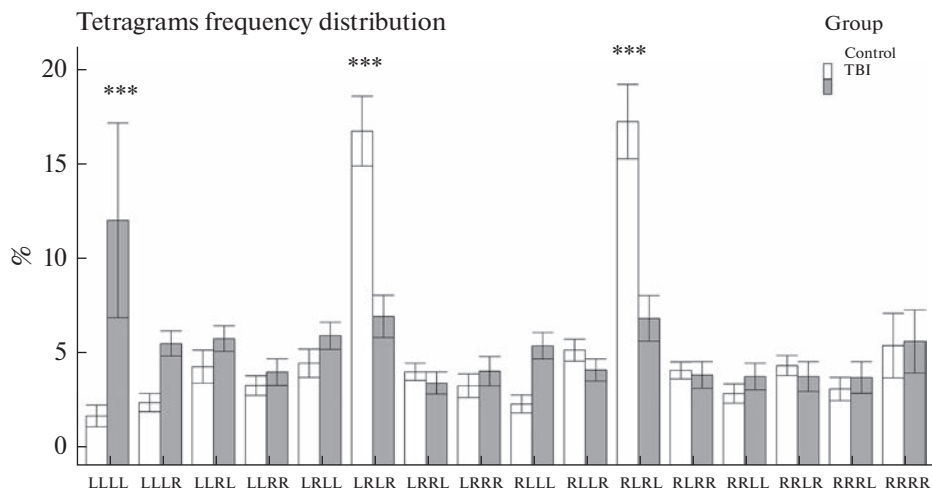


Рис. 3. Влияние травматического повреждения мозга (ТПМ, TBI) на распределение тетраграмм альтернативных выборов в тесте Y-образного лабиринта (Tetragrams frequency distribution, $n = 16$ в группе). Control – контрольная группа. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. *** – $p < 0.001$ (парное сравнение оцененных маргинальных средних значений с коррекцией значений p методом Сидака для множественных сравнений).

Влияние ТПМ на поведение в Y-образном лабиринте.

Анализ обобщенной линейной модели показал значимое влияние фактора “тетраграмма” ($p < 0.001$), а также взаимодействия факторов “тетраграмма” $\times$ “группа” ($p < 0.001$) на процентное распределение альтернативных выборов зебраданию в Y-образном лабиринте (рис. 3). Так, рыбы контрольной группы демонстрировали естественное чередование (спонтанную альтернацию) левых и правых поворотов, о чем свидетельствует характерное распределение переходов с преобладанием тетраграмм LRLR и RLRL (рис. 2, табл. 3). Подобное распределение соответствует типичному поведению рыб в данном тесте, описанному в литературе [38, 42]. В группе ТПМ спонтанная альтернация не была выражена, о чем говорит значительно меньший процент тетрад LRLR и RLRL в сравнении с контрольной группой ($p < 0.001$). При этом рыбы из группы ТПМ показали большую склонность к повторению левых поворотов, о чем говорит увеличение процентного отношения тетраграмм LLLL в сравнении с контрольной группой ($p < 0.001$, рис. 3, табл. 3).

Дальнейший анализ распределения тетраграмм выявил статистически значимые различия между группами по ключевым показателям теста – процентному отношению чередований (тетраграммы LRLR + RLRL) и повторений (тетраграммы LLLL + RRRR). Так, зебраданию из группы ТПМ показали увеличение процента повторений относительно контрольной группы и снижение процента чередований ($p < 0.05$, рис. 4 и табл. 4). Данные изменения принято интерпретировать как нарушение спонтанной альтернации как показателя рабочей памяти у зебраданию в данном тесте [38].

Влияние ТПМ на содержание моноаминов и их метаболитов в мозге зебраданию

Анализ содержания моноаминов (норадреналина, дофамина и серотонина), а также их метаболитов (гомованилиновой кислоты, 5-гидроксииндолуксусной кислоты и диоксифенилуксусной кислоты) в целом мозге зебраданию представлены на рис. 5 и в табл. 5. Травматическое повреждение теляцефалона вызвало статисти-

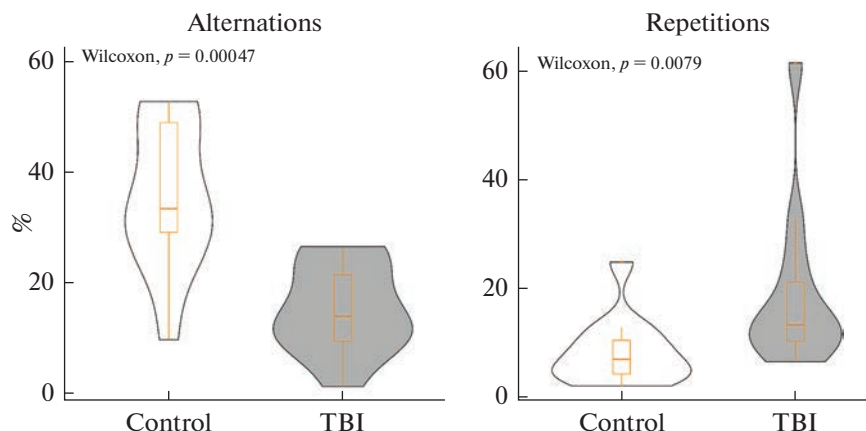


Рис. 4. Влияние травматического повреждения мозга (ТПМ, TBI) на поведение зебрланио в тесте Y-образного лабиринта, в том числе процентное отношение чередований (Alternations) и повторений (Repetitions) левых и правых поворотов. Control – контрольная группа. Данные представлены как медиана $\pm$ межквартильный размах ($n = 16$ в группе) и проанализированы тестом Вилкоксона-Манна-Уитни (Wilcoxon).

чески значимое снижение уровня норадреналина в мозге зебрланио ($p < 0.05$ против контрольной группы), при этом содержание других анализируемых веществ между группами не различалось ($p > 0.05$).

Влияние ТПМ на экспрессию генов *casp3a*, *tnfa* и *isg15* в теленцефалоне зебрланио

Анализ результатов ПЦР-РВ показал, что травматическое повреждение оказало статистически значимое влияние на уровень экспрессии гена *isg15* в теленцефало-

Таблица 3. Сравнение частоты тетраграмм в тесте Y-образного лабиринта между экспериментальными группами зебрланио

Сравнение	Тетраграммы	Estimate	SE	z-ratio	p value
Контроль–ТПМ	LLLL	−1.59	0.29	−5.52	<0.001
Контроль–ТПМ	LLLR	−0.66	0.29	−2.29	0.02
Контроль–ТПМ	LLRL	−0.25	0.25	−1	0.32
Контроль–ТПМ	LLRR	−0.15	0.28	−0.55	0.58
Контроль–ТПМ	LRLL	−0.24	0.25	−0.97	0.33
Контроль–ТПМ	LRLR	0.81	0.18	4.41	<0.001
Контроль–ТПМ	LRRL	0.13	0.28	0.46	0.65
Контроль–ТПМ	LRRR	−0.17	0.28	−0.59	0.56
Контроль–ТПМ	RLLL	−0.56	0.29	−2.28	0.06
Контроль–ТПМ	RLLR	0.19	0.26	0.74	0.46
Контроль–ТПМ	RLRL	0.85	0.18	4.64	<0.001
Контроль–ТПМ	RLRR	0.05	0.27	0.18	0.86
Контроль–ТПМ	RRLL	−0.21	0.29	−0.72	0.47
Контроль–ТПМ	RRLR	0.12	0.27	0.43	0.67
Контроль–ТПМ	RRRR	−0.14	0.29	−0.48	0.63
Контроль–ТПМ	RRRL	−0.03	0.24	−0.14	0.89

Статистически значимые различия выделены жирным шрифтом (попарное сравнение оцененных маргинальных средних значений с коррекцией значений p методом Сидака для множественных сравнений). Estimate – разница между оцененными маргинальными средними, SE – стандартная ошибка среднего, ТПМ – травматическое повреждение мозга.

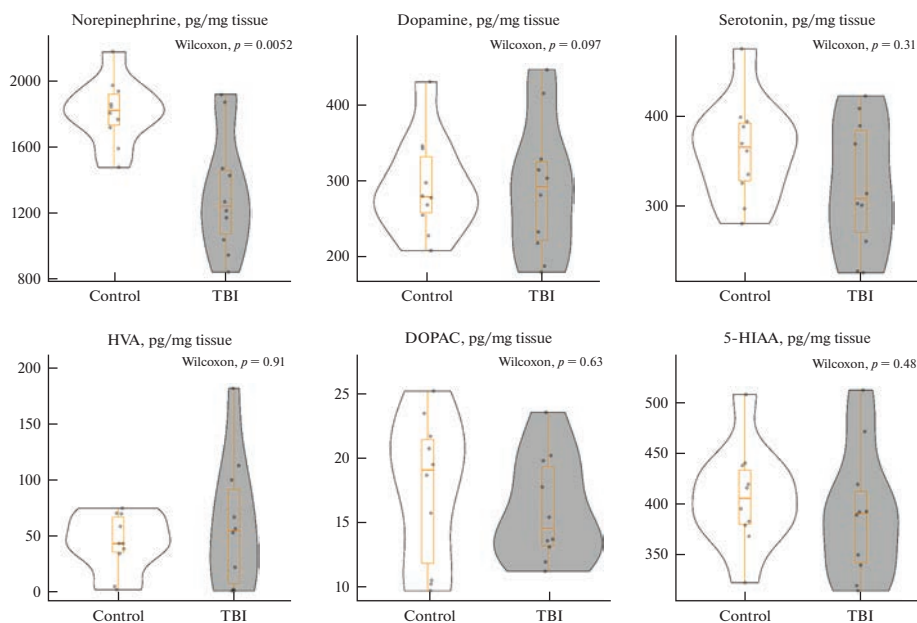


Рис. 5. Влияние травматического повреждения мозга (ТПМ, TBI) на содержание моноаминов и их метаболитов в целом мозге зебраданию ($n = 10$ в группе). Control – контрольная группа. Данные представлены как медиана $\pm$ межквартильный размах и проанализированы тестом Вилкоксона-Манна-Уитни (Wilcoxon). Norepinephrine – норадrenalин, Dopamine – дофамин, Serotonin – серотонин, HVA – гомованилиновая кислота, DOPAC – дигидроксифенилуксусная кислота, 5-HIAA – 5-гидроксииндолуксусная кислота.

не зебраданию ($p < 0.001$ против контрольной группы), при этом изменений в экспрессии генов *casp3* и *tnfa* обнаружено не было ($p > 0.05$; рис. 6 и табл. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на высокую гетерогенность клинических форм ТПМ, можно выделить некоторые общие закономерности, присущие всем видам данной патологии [43]. Первичные ТПМ возникают при физическом воздействии и вызывают разрушение оболочек мозга и гематоэнцефалического барьера, разрыв кровеносных сосу-

Таблица 4. Сравнение ключевых поведенческих показателей спонтанной альтернации в тесте Y-образного лабиринта у зебраданию

Группа	Медиана	Q1	Q3	IQR	Критерий Вилкоксона, W	Значение p
Повторения (%)						
Контроль ТПМ	7.58	4.9	11.04	6.14	25.5	<0.01
	13.85	10.86	21.65	10.79		
Чередования (%)						
Контроль ТПМ	33.7	29.42	49.28	19.86	133	<0.001
	14.36	9.84	21.87	12.03		

Статистически значимые различия между группами выделены жирным шрифтом (критерий Вилкоксона-Манна-Уитни, $p < 0.05$, $n = 16-17$ в группе). Q1 – первый квартиль, Q3 – третий квартиль, IQR – межквартильный размах. ТПМ – травматическое повреждение мозга.

Таблица 5. Сравнение содержания моноаминов в мозге зебраданио на фоне нейротравмы

Группа	Медиана	Q1	Q3	IQR	Критерий Вилкоксона, W	Значение <i>p</i>
Норадреналин (пг/мг ткани)						
Контроль	1825.61	1736.71	1922.6	185.89	86	0.005
ТПМ	1250.67	1082.43	1466	383.56		
Дофамин (пг/мг ткани)						
Контроль	281.42	260.62	333.32	72.7	51	0.971
ТПМ	294.76	224.18	326.57	102.38		
Серотонин (пг/мг ткани)						
Контроль	367.21	330.52	394.06	63.54	64	0.315
ТПМ	310.89	273.36	385.85	112.49		
ГБК (пг/мг ткани)						
Контроль	44.11	36.23	67.7	31.47	48	0.912
ТПМ	55.5	8.36	92.27	83.91		
ДОФУК (пг/мг ткани)						
Контроль	19.07	11.85	21.41	9.56	57	0.631
ТПМ	14.57	13.22	19.29	06.08		
5-ГИУК (пг/мг ткани)						
Контроль	405.9	380.46	433.45	52.99	60	0.481
ТПМ	391.03	342.72	412.89	70.17		

Статистически значимые различия между группами выделены жирным шрифтом (критерий Вилкоксона–Манна–Уитни, $p < 0.05$, $n = 10$ в группе). Q1 – первый квартиль, Q3 – третий квартиль, IQR – межквартильный размах. ТПМ – травматическое повреждение мозга, ГБК – гомованилиновая кислота, ДОФУК – дигидроксифенилуксусная кислота, 5-ГИУК – 5-гидроксииндолуксусная кислота.

Таблица 6. Сравнение экспрессии генов *casp3a*, *tnfa* и *isg15* в теленцефалоне зебраданио на фоне нейротравмы

Группа	Медиана	Q1	Q3	IQR	Критерий Вилкоксона, W	Значение <i>p</i>
<i>casp3a</i> (относительный уровень экспрессии)						
Контроль	1.04	0.7	1.26	0.56	46	0.16
ТПМ	0.64	0.38	0.86	0.49	46	
<i>tnfa</i> (относительный уровень экспрессии)						
Контроль	0.54	0.45	01.01	0.56	42	0.33
ТПМ	0.4	0.26	0.79	0.52	42	
<i>isg15</i> (относительный уровень экспрессии)						
Контроль	1.03	0.8	1.39	0.59	0	<0.001
ТПМ	25.81	16.37	30.93	14.55	0	

Статистически значимые различия между группами выделены жирным шрифтом (критерий Вилкоксона–Манна–Уитни, $p < 0.05$, $n = 8$ в группе). Q1 – первый квартиль, Q3 – третий квартиль, IQR – межквартильный размах. ТПМ – травматическое повреждение мозга.

дов, растяжение и разрыв аксонов, гибель нейронов и глиальных клеток [44]. В ходе первичных повреждений происходит неспецифическая гибель клеток. Первичные повреждения инициируют возникновение вторичных повреждений, которые проявляются в системных нарушениях (отек мозга, увеличение внутричерепного давления, ишемия), а также активацией физиологических и клеточных механизмов, таких как эксайтотоксичность, нейровоспаление, окислительный стресс,

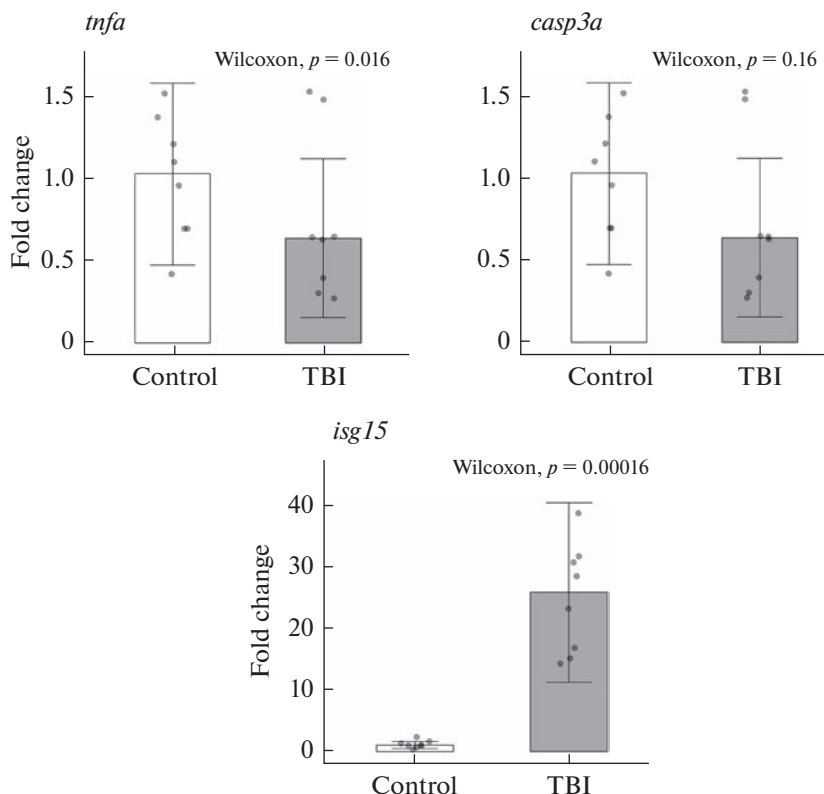


Рис. 6. Влияние травматического повреждения мозга (ТБИ) на относительный уровень экспрессии (fold change) генов *casp3a*, *tnfa* и *isg15* в теленцефалоне зебрании ($n = 8$ в группе). Данные нормированы относительно гена *eefla1l1*. Control – контрольная группа. Данные представлены как медиана $\pm$ межквартильный размах.

митохондриальная дисфункция, программируемая клеточная смерть [12]. Вторичные повреждения могут развиваться в течение часов, дней или даже недель после первичной травмы, а также выходить за пределы места первоначального повреждения, затрагивая соседние и отдаленные области мозга, и именно от характера и тяжести вторичных повреждений во многом зависят итоговые функциональные последствия ТПМ.

Хотя ТПМ приводит к неспецифической смерти нервных клеток в результате некроза в первые минуты после травмы, клинические и экспериментальные данные указывают на важность “второй волны” клеточной гибели за счет апоптоза и других механизмов программируемой смерти клеток [45]. При ТПМ происходят характерные апоптотические изменения морфологии клеток (сморщивание, фрагментация ядер, конденсация хроматина, образование апоптотических телец), а также маркеров фрагментации ДНК и активации проапоптотических белков [46–50], прежде всего каспаз, которые расщепляют белки и вызывают гибель клеток (каспазы 3, 6 и 7) либо активируют другие каспазы (каспазы 2, 8 и 9) [51]. При ТПМ наиболее распространенной причиной апоптоза является чрезмерный уровень внутриклеточного кальция, вызванный эксайтотоксичностью [12], что приводит к активации каспаз и разрушению клеточных структур при апоптозе. Кроме того, апоптоз инициируется связыванием лигандов смерти (ФНО- α) с соответствующи-

ми рецепторами [52], также активируя каскад каспаз и, в результате, апоптоз. Помимо апоптоза, описано еще несколько механизмов программируемой смерти клеток, активируемых в результате ТПМ, в том числе некроптоз, аутофагия, пироптоз и ферроптоз [53–55].

В настоящем исследовании травматическое повреждение конечного мозга зебраданию привело к выраженным поведенческим нарушениям, свидетельствуя об успешности постановки модели нейротравмы. Так, на 4-й день после ТПМ рыбы демонстрировали гиполокомоцию, выраженную в снижении преодоленной дистанции в тесте незнакомого аквариума, а также в нарушении рабочей памяти, выраженное в снижении относительного количества чередований и увеличении количества повторений в тесте Y-образного лабиринта. Эти данные согласуются с результатами других работ на модели зебраданию, в которых повреждение мозга вызывало подобные поведенческие изменения [56–58], а также с моделями ТПМ на млекопитающих, в которых когнитивные и моторные нарушения являются одними из наиболее распространенных функциональных последствий травмы мозга [59–61].

Интересным наблюдением является значительное увеличение экспрессии *isg15* в группе с ТПМ (рис. 5). Данный ген кодирует убиквитин-подобный белок ISG15 (interferon-stimulated gene 15), который может связываться с другими белками-мишенями в процессе ISG-илирования (ISGylation), похожем на убиквитинирование [62]. Показано, что ISG15 может играть важную роль в патогенезе ТПМ, о чем свидетельствует многократное увеличение экспрессии его гена *ISG15*, а также степени ISG-илирования белков в моделях нейротравмы на мышцах и пациентов с ТПМ [63]. Более того, активация этого гена наблюдается при повреждениях нервной ткани различной этиологии, что позволяет говорить о ISG15 как об общем маркере повреждений нейронов. Тем не менее, физиологическая функция ISG15, а также функциональные последствия его активации в ответ на травму, еще плохо изучены [64]. Результаты настоящей работы впервые указывают на активацию системы ISG15 при ТПМ у зебраданию, что свидетельствует о высокой эволюционной консервативности данного ответа, и позволяет использовать зебраданию в качестве модели для ISG15-ассоциированных патологий.

Любопытно, что повреждение теленцефалона не оказало влияния на уровень экспрессии генов каспазы-3 и ФНО- α (рис. 5). Каспаза-3 является ключевым фактором апоптоза, а ФНО- α – важным провоспалительным цитокином, участвующим в инициации нейровоспаления при ТПМ, а также индуктором апоптоза. Увеличение экспрессии генов этих биомаркеров описано в моделях ТПМ как на рыбах [65–67], так и на млекопитающих [28, 68–71]. В настоящей работе отсутствие эффекта на них после примененного ТПМ может быть связано с более поздним сроком забора проб для анализа (4 дня после травмы), когда основная острая фаза воспалительного ответа уже миновала. В пользу такого предположения говорит резкое увеличение уровня экспрессии *tnfa* в первые часы после травмы, сменившееся постепенным снижением, с возвратом к физиологическим значениям на 3–4-й день в той же модели ТПМ [66]. Увеличение экспрессии гена каспазы-3 в модели ТПМ рыб наблюдалось через 20 ч после повреждения, но не через 3 дня [65]. Аналогично, в моделях на грызунах увеличение экспрессии гена ФНО- α наблюдается в первые часы после травмы мозга, после чего этот показатель возвращается к норме [28, 68]. Напротив, увеличение экспрессии гена каспазы-3, а также содержания активированной формы этого белка у млекопитающих наблюдается через дни или даже месяцы с момента травмы [69–71]. Таким образом, настоящее исследование указывает как на сходства, так и на различия молекулярного ответа на нейротравму у зебраданию и млекопитающих.

Наконец, повреждение теленцефалона вызвало значительное снижение уровня норадреналина в ткани головного мозга зебраданию (рис. 4). У зебраданию, как и у

млекопитающих, тела норадренергических нейронов локализованы в голубом пятне ствола головного мозга, откуда восходящие проекции направляются к другим отделам [72]. Учитывая локальность наносимой травмы, наблюдаемые нейрохимические изменения, вероятнее всего, связаны со вторичными повреждениями, вызванными ТПМ, нежели с механическим повреждением нервной ткани. Норадренергические нейроны, наряду с дофаминергическими, наиболее подвержены метаболическим нарушениям, возникающим в результате их повреждения [73]. Так, норадренергические нейроны голубого пятна демонстрируют высокую чувствительность к окислительному стрессу, вызванному нейровоспалением [74]. Показано снижение содержания норадреналина и уменьшение числа норадренергических нейронов в стволе мозга в ответ на проникающую травму сенсомоторной коры у крыс, что может быть связано с окислительным стрессом [75]. Поскольку норадреналин играет важную роль в регуляции многих функций ЦНС [76], снижение уровня этого моноамина в мозге зебрании может быть отчасти ответственно за наблюдаемые в работе когнитивные и моторные нарушения.

В целом, перспективность использования зебрании в моделях ТПМ связана с сочетанием этим организмом как эволюционно консервативных, так и отличных от млекопитающих особенностей. Так же, как у грызунов, ТПМ у зебрании вызывает развитие вторичных повреждений, связанных с эксайтотоксичностью, нейровоспалением, окислительным стрессом и апоптозом [57, 77, 78]. При этом рыбы обладают несопоставимо большей способностью к нейрорегенерации за счет интенсивного нейрогенеза — мозг взрослой зебрании содержит 16 зон активной пролиферации нейронов в сравнении с двумя у млекопитающих [79]. Таким образом, в то время как у млекопитающих ТПМ приводит к перманентному разрушению нейронных связей, аккумуляции вторичных повреждений и образованию глиального рубца, зебрании способны достаточно быстро регенерировать обширные повреждения без долгосрочных последствий [35]. Раскрытие молекулярных механизмов регенерации мозга у рыб может позволить определить потенциальные терапевтические мишени, способствующие репарации нейронов и функциональному восстановлению при повреждениях ЦНС у человека. Кроме того, сравнительный анализ ответа на травму мозга у зебрании и млекопитающих может дать ценную информацию о барьерах, препятствующих нейрорегенерации у высших позвоночных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом настоящее исследование показало, что нейротравма конечного мозга зебрании вызывает когнитивные и моторные нарушения, увеличение экспрессии *isg15* и снижение содержания норадреналина в мозге. Поведенческие изменения, наблюдаемые в настоящей модели, согласуются с таковыми в моделях на млекопитающих и у пациентов с ТПМ, что свидетельствует о ее трансляционном потенциале. Для зебрании активация экспрессии *isg15* в ответ на травму была показана впервые, что может указывать на наличие эволюционно консервативного механизма ответа на травму ЦНС, опосредованного ISG15. Кроме того, было впервые описано влияние ТПМ на состояние моноаминергических систем зебрании, что является важным дополнением к существующему описанию нейрохимических изменений в данной модели при нейротравмах.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование одобрено Этическим комитетом НМИЦ им. В.А. Алмазова МЗ РФ.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Настоящая работа поддержана средствами Санкт-Петербургского государственного университета (проект 93020614).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея статьи (А.В.К., К.А.Д., Н.П.И.), подготовка черновика статьи (Н.П.И., К.А.Д., Д.С.Г., А.В.К.), редактирование и подготовка финальной версии (Н.П.И., А.В.К.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны Антону Шевлякову, Алексею Икрину и Анастасии Москаленко (НТУ “Сириус”) за их помощь в выполнении исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Risdall JE, Menon DK* (2011) Traumatic brain injury. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 366: 241–250.
<https://doi.org/10.1098%2Frstb.2010.0230>
2. *Dewan MC, Rattani A, Gupta S, Baticulon RE, Hung Y-C, Punchak M, Agrawal A, Adeleye AO, Shrima MG, Rubiano AM* (2018) Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *J Neurosurg* 130: 1080–1097.
<https://doi.org/10.3171/2017.10.JNS17352>
3. *Parikh S, Koch M, Narayan RK* (2007) Traumatic brain injury. *Int Anesthesiol Clin* 45: 119–135.
<https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318078cfe7>
4. *Andriessen TM, Jacobs B, Vos PE* (2010) Clinical characteristics and pathophysiological mechanisms of focal and diffuse traumatic brain injury. *J Cell Mol Med* 14: 2381–2392.
<https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01164.x>
5. *Walker KR, Tesco G* (2013) Molecular mechanisms of cognitive dysfunction following traumatic brain injury. *Front Aging Neurosci* 5: 29.
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2013.00029>
6. *Galea OA, Cottrell MA, Treleaven JM, O’Leary SP* (2018) Sensorimotor and physiological indicators of impairment in mild traumatic brain injury: a meta-analysis. *Neurorehabil Neural Repair* 32: 115–128.
<https://doi.org/10.1177/1545968318760728>
7. *Mallya S, Sutherland J, Pongracic S, Mainland B, Ornstein TJ* (2015) The manifestation of anxiety disorders after traumatic brain injury: a review. *J Neurotrauma* 32: 411–421.
<https://doi.org/10.1089/neu.2014.3504>
8. *Yang C-C, Hua M-S, Lin W-C, Tsai Y-H, Huang S-J* (2012) Irritability following traumatic brain injury: divergent manifestations of annoyance and verbal aggression. *Brain Injury* 26: 1185–1191.
<https://doi.org/10.3109/02699052.2012.666374>
9. *Delic V, Beck KD, Pang KC, Citron BA* (2020) Biological links between traumatic brain injury and Parkinson’s disease. *Acta Neuropathol Commun* 8: 1–16.
<https://doi.org/10.1186/s40478-020-00924-7>
10. *Ding K, Gupta PK, Diaz-Arrastia R* (2016) Epilepsy after traumatic brain injury. *Transl Res Trauma Brain Injury Chapter* 14.
<https://doi.org/10.1201/b18959-19>
11. *Sivanandam TM, Thakur MK* (2012) Traumatic brain injury: a risk factor for Alzheimer’s disease. *Neurosci Biobehav Rev* 36: 1376–1381.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.02.013>
12. *Krishnamurthy K, Laskowitz DT* (2016) Cellular and molecular mechanisms of secondary neuronal injury following traumatic brain injury. *Transl Res Trauma Brain Injury, CRC Press/Taylor and Francis Group / Boca Raton (FL), Chapter* 5.
<https://doi.org/10.1201/b18959-10>
13. *Guerriero RM, Giza CC, Rotenberg A* (2015) Glutamate and GABA imbalance following traumatic brain injury. *Curr Neurol Neurosci Rep* 15: 1–11.
<https://doi.org/10.1007/s11910-015-0545-1>
14. *Hinzman JM, Thomas TC, Quintero JE, Gerhardt GA, Lifshitz J* (2012) Disruptions in the regulation of extracellular glutamate by neurons and glia in the rat striatum two days after diffuse brain injury. *J Neurotrauma* 29: 1197–1208.
<https://doi.org/10.1089/neu.2011.2261>

15. *Palmer AM, Marion DW, Botscheller ML, Swedlow PE, Styren SD, DeKosky ST* (1993) Traumatic brain injury-induced excitotoxicity assessed in a controlled cortical impact model. *J Neurochem* 61: 2015–2024.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb07437.x>
16. *Chamoun R, Suki D, Gopinath SP, Goodman JC, Robertson C* (2010) Role of extracellular glutamate measured by cerebral microdialysis in severe traumatic brain injury. *J Neurosurg* 113: 564–570.
<https://doi.org/10.3171/2009.12.jns.09689>
17. *Lakshmanan R, Loo JA, Drake T, Leblanc J, Ytterberg AJ, McArthur DL, Etchepare M, Vespa PM* (2010) Metabolic crisis after traumatic brain injury is associated with a novel microdialysis proteome. *Neurocrit Care* 12: 324–336.
<https://doi.org/10.1007/s12028-010-9342-5>
18. *Aiba I, Shuttleworth CW* (2012) Sustained NMDA receptor activation by spreading depolarizations can initiate excitotoxic injury in metabolically compromised neurons. *J Physiol* 590: 5877–5893.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.234476>
19. *Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B* (2015) Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 460: 72–81.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.137>
20. *Sattler R, Tymianski M* (2001) Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. *Mol Neurobiol* 24: 107–129.
<https://doi.org/10.1385/mn.24:1-3:107>
21. *Balu R* (2014) Inflammation and immune system activation after traumatic brain injury. *Curr Neurol Neurosci Rep* 14: 1–8.
<https://doi.org/10.1007/s11910-014-0484-2>
22. *Lehnardt S* (2010) Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: The role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia* 58: 253–263.
<https://doi.org/10.1002/glia.20928>
23. *Karve IP, Taylor JM, Crack PJ* (2016) The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *Br J Pharmacol* 173: 692–702.
<https://doi.org/10.1111/bph.13125>
24. *Loane DJ, Kumar A, Stoica BA, Cabatbat R, Faden AI* (2014) Progressive neurodegeneration after experimental brain trauma: association with chronic microglial activation. *J Neuropathol Exp Neurol* 73: 14–29.
<https://doi.org/10.1097/nen.0000000000000021>
25. *Burda JE, Bernstein AM, Sofroniew MV* (2016) Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Exp Neurol* 275: 305–315.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.03.020>
26. *Landeghem FKV, Weiss T, Oehmichen M, Deimling AV* (2006) Decreased expression of glutamate transporters in astrocytes after human traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 23: 1518–1528.
<https://doi.org/10.1089/neu.2006.23.1518>
27. *Das M, Mohapatra S, Mohapatra SS* (2012) New perspectives on central and peripheral immune responses to acute traumatic brain injury. *J Neuroinflammation* 9: 1–12.
<https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-236>
28. *Fan L, Young PR, Barone FC, Feuerstein GZ, Smith DH, McIntosh TK* (1996) Experimental brain injury induces differential expression of tumor necrosis factor- α mRNA in the CNS. *Mol Brain Res* 36: 287–291.
[https://doi.org/10.1016/0169-328x\(95\)00274-v](https://doi.org/10.1016/0169-328x(95)00274-v)
29. *Chio C-C, Chang C-H, Wang C-C, Cheong C-U, Chao C-M, Cheng B-C, Yang C-Z, Chang C-P* (2013) Etanercept attenuates traumatic brain injury in rats by reducing early microglial expression of tumor necrosis factor- α . *BMC Neurosci* 14: 1–12.
<https://doi.org/10.1186/1471-2202-14-33>
30. *Lu K-T, Wang Y-W, Yang J-T, Yang Y-L, Chen H-I* (2005) Effect of interleukin-1 on traumatic brain injury-induced damage to hippocampal neurons. *J Neurotrauma* 22: 885–895.
<https://doi.org/10.1089/neu.2005.22.885>
31. *Shohami E, Bass R, Wallach D, Yamin A, Gallily R* (1996) Inhibition of tumor necrosis factor alpha (TNF α) activity in rat brain is associated with cerebroprotection after closed head injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 378–384.
<https://doi.org/10.1097/00004647-199605000-00004>
32. *Babchenko VY, Belova AS, Bashirzade AA, Tikhonova MA, Demin KA, Zabegalov KN, Petersen EV, Kalueff AV, Amstislavskaya TG* (2022) Traumatic brain injury models in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurosci Behav Physiol* 52: 405–414.
<https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0777>
33. *Zulazmi NA, Arulsamy A, Ali I, Zainal Abidin SA, Othman I, Shaikh MF* (2021) The utilization of small non-mammals in traumatic brain injury research: A systematic review. *CNS Neurosci Ther* 27: 381–402.
<https://doi.org/10.1111/cns.13590>

34. Westerfield M (2007) The Zebrafish Book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*).
35. Schmidt R, Beil T, Strähle U, Rastegar S (2014) Stab wound injury of the zebrafish adult telencephalon: a method to investigate vertebrate brain neurogenesis and regeneration. J Vis Exp 90: e51753. <https://doi.org/10.3791/51753>
36. Levin ED, Bencan Z, Cerutti DT (2007) Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. Physiol Behav 90: 54–58. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.1718v2>
37. Egan RJ, Bergner CL, Hart PC, Cachat JM, Canavella PR, Elegante MF, Elkhayat SI, Bartels BK, Tien AK, Tien DH (2009) Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. Behav Brain Res 205: 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.06.022>
38. Cleal M, Fontana BD, Ranson DC, McBride SD, Swinny JD, Redhead ES, Parker MO (2021) The Free-movement pattern Y-maze: A cross-species measure of working memory and executive function. Behav Res Methods 53: 536–557. <https://doi.org/10.3758/s13428-020-01452-x>
39. Fontana BD, Cleal M, Clay JM, Parker MO (2019) Zebrafish (*Danio rerio*) behavioral laterality predicts increased short-term avoidance memory but not stress-reactivity responses. Anim Cogn 22: 1051–1061. <https://doi.org/10.1007/s10071-019-01296-9>
40. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. Methods 25: 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
41. Alburges ME, Narang N, Wamsley JK (1993) A sensitive and rapid HPLC-ECD method for the simultaneous analysis of norepinephrine, dopamine, serotonin and their primary metabolites in brain tissue. Biomed Chromatogr 7: 306–310. <https://doi.org/10.1002/bmc.1130070605>
42. Fontana BD, Cleal M, Gibbon AJ, McBride SD, Parker MO (2021) The effects of two stressors on working memory and cognitive flexibility in zebrafish (*Danio rerio*): the protective role of D1/D5 agonist on stress responses. Neuropharmacology 196: 108681. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108681>
43. Pearn ML, Niesman IR, Egawa J, Sawada A, Almenar-Queralt A, Shah SB, Duckworth JL, Head BP (2017) Pathophysiology associated with traumatic brain injury: current treatments and potential novel therapeutics. Cell Mol Neurobiol 37: 571–585. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0400-1>
44. Ladak AA, Enam SA, Ibrahim MT (2019) A review of the molecular mechanisms of traumatic brain injury. World Neurosurg 131: 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2019.07.039>
45. Akamatsu Y, Hanafy KA (2020) Cell death and recovery in traumatic brain injury. Neurotherapeutics 17: 446–456. <https://doi.org/10.1007/s13311-020-00840-7>
46. Clark RS, Kochanek PM, Chen M, Watkins SC, Marion DW, Chen J, Hamilton RL, Loeffert JE, Graham SH (1999) Increases in Bcl-2 and cleavage of caspase-1 and caspase-3 in human brain after head injury. FASEB J 13: 813–821. <https://doi.org/10.1097/00008506-200007000-00019>
47. Dressler J, Hanisch U, Kuhlisch E, Geiger KD (2007) Neuronal and glial apoptosis in human traumatic brain injury. Int J Legal Med 121: 365–375. <https://doi.org/10.1007/s00414-006-0126-6>
48. Ng I, Yeo T-T, Tang W-Y, Soong R, Ng P-Y, Smith DR (2000) Apoptosis occurs after cerebral contusions in humans. Neurosurgery 46: 949–956. <https://doi.org/10.1227/00006123-200004000-00034>
49. Zhang X, Graham SH, Kochanek PM, Marion DW, Nathaniel PD, Watkins SC, Clark RS (2003) Caspase-8 expression and proteolysis in human brain after severe head injury. FASEB J 17: 1367–1369. <https://doi.org/10.1096/fj.02-1067fje>
50. Zhang X, Alber S, Watkins SC, Kochanek PM, Marion DW, Graham SH, Clark RS (2006) Proteolysis consistent with activation of caspase-7 after severe traumatic brain injury in humans. J Neurotrauma 23: 1583–1590. <https://doi.org/10.1089/neu.2006.23.1583>
51. McIlwain DR, Berger T, Mak TW (2015) Caspase functions in cell death and disease. Cold Spring Harb Perspect Biol 7: 1–15. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008656>
52. Salvesen GS, Dixit VM (1999) Caspase activation: the induced-proximity model. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 10964–10967. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.10964>
53. Kenny EM, Fidan E, Yang Q, Anthonymuthu TS, New LA, Meyer EA, Wang H, Kochanek PM, Dixon CE, Kagan VE (2019) Ferroptosis contributes to neuronal death and functional outcome

- after traumatic brain injury. *Crit Care Med* 47: 410.
<https://doi.org/10.1097/ccm.0000000000003555>
54. Zhang L, Wang H (2018) Autophagy in traumatic brain injury: a new target for therapeutic intervention. *Front Mol Neurosci* 11: 190.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00190>
 55. Zhao P, Li C, Chen B, Sun G, Chao H, Tu Y, Bao Z, Fan L, Du X, Ji J (2020) Up-regulation of CHMP4B alleviates microglial necroptosis induced by traumatic brain injury. *J Cell Mol Med* 24: 8466–8479.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.15406>
 56. Chaoul V, Awad M, Harb F, Najjar F, Hamade A, Nabout R, Soueid J (2022) Saffron Extract Attenuates Anxiogenic Effect and Improves Cognitive Behavior in an Adult Zebrafish Model of Traumatic Brain Injury. *Int J Mol Sci* 23: 11600.
<https://doi.org/10.3390/ijms231911600>
 57. McCutcheon V, Park E, Liu E, Sobhebidari P, Tavakkoli J, Wen X-Y, Baker AJ (2017) A novel model of traumatic brain injury in adult zebrafish demonstrates response to injury and treatment comparable with mammalian models. *J Neurotrauma* 34: 1382–1393.
<https://doi.org/10.1089/neu.2016.4497>
 58. Tikhonova MA, Maslov NA, Bashirzade AA, Nehoroshev EV, Babchenko VY, Chizhova ND, Tsiulskaya EO, Akopyan AA, Markova EV, Yang Y-L (2022) A novel laser-based zebrafish model for studying traumatic brain injury and its molecular targets. *Pharmaceutics* 14: 1751.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081751>
 59. Chou A, Krukowski K, Jopson T, Zhu PJ, Costa-Mattioli M, Walter P, Rosi S (2017) Inhibition of the integrated stress response reverses cognitive deficits after traumatic brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: E6420–E6426.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1707661114>
 60. Fujimoto ST, Longhi L, Saatman KE, McIntosh TK (2004) Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. *Neurosci Biobehav Rev* 28: 365–378.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.06.002>
 61. Zohar O, Schreiber S, Getslev V, Schwartz J, Mullins P, Pick C (2003) Closed-head minimal traumatic brain injury produces long-term cognitive deficits in mice. *Neuroscience* 118: 949–955.
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(03\)00048-4](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(03)00048-4)
 62. Mirzalieva O, Juncker M, Schwartzburg J, Desai S (2022) ISG15 and ISGylation in human diseases. *Cells* 11: 538.
<https://doi.org/10.3390/cells11030538>
 63. Nakka VP, Mohammed AQ (2020) A critical role for ISGylation, ubiquitination and, SUMOylation in brain damage: implications for neuroprotection. *Neurochem Res* 45: 1975–1985.
<https://doi.org/10.1007/s11064-020-03066-3>
 64. Kang JA, Kim YJ, Jeon YJ (2022) The diverse repertoire of ISG15: More intricate than initially thought. *Exp Mol Med* 54: 1779–1792.
<https://doi.org/10.1038/s12276-022-00872-3>
 65. Demirci Y, Cucun G, Poyraz YK, Mohammed S, Heger G, Papatheodorou I, Ozhan G (2020) Comparative transcriptome analysis of the regenerating zebrafish telencephalon unravels a resource with key pathways during two early stages and activation of wnt/ β -catenin signaling at the early wound healing stage. *Front Cell Dev Biol* 8: 584604.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.584604>
 66. Kanagaraj P, Chen JY, Skaggs K, Qadeer Y, Connors M, Cutler N, Richmond J, Kommidi V, Poles A, Afrunti D (2020) Microglia stimulate zebrafish brain repair via a tumor necrosis factor- α -initiated inflammatory cascade. *BioRxiv* 2020–10.
<https://doi.org/10.1101/2020.10.08.330662>
 67. Yin G, Du M, Li R, Li K, Huang X, Duan D, Ai X, Yao F, Zhang L, Hu Z (2018) Glia maturation factor beta is required for reactive gliosis after traumatic brain injury in zebrafish. *Exp Neurol* 305: 129–138.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.04.008>
 68. Knoblach SM, Fan L, Faden AI (1999) Early neuronal expression of tumor necrosis factor- α after experimental brain injury contributes to neurological impairment. *J Neuroimmunol* 95: 115–125.
[https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(98\)00273-2](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(98)00273-2)
 69. Glushakova OY, Glushakov AO, Borlongan CV, Valadka AB, Hayes RL, Glushakov AV (2018) Role of caspase-3-mediated apoptosis in chronic caspase-3-cleaved tau accumulation and blood–brain barrier damage in the corpus callosum after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 35: 157–173.
<https://doi.org/10.1089/neu.2017.4999>
 70. Kaneko Y, Tajiri N, Yu S, Hayashi T, Stahl CE, Bae E, Mestre H, Franzese N, Rodrigues Jr A, Rodrigues MC (2012) Nestin overexpression precedes caspase-3 upregulation in rats exposed to controlled cortical impact traumatic brain injury. *Cell Med* 4: 55–63.
<https://doi.org/10.3727/215517912x639306>

71. Ringger NC, Tolentino PJ, McKinsey DM, Pike BR, Wang KKW, Hayes RL (2004) Effects of injury severity on regional and temporal mRNA expression levels of calpains and caspases after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 21: 829–841.
<https://doi.org/10.1089/0897715041526177>
72. Schweitzer J, Löhr H, Filippi A, Driever W (2012) Dopaminergic and noradrenergic circuit development in zebrafish. *Dev Neurobiol* 72: 256–268.
<https://doi.org/10.1002/dneu.20911>
73. Jenkins PO, Mehta MA, Sharp DJ (2016) Catecholamines and cognition after traumatic brain injury. *Brain* 139: 2345–2371.
<https://doi.org/10.1093/brain/aww128>
74. Wang Q, Oyarzabal EA, Song S, Wilson B, Santos JH, Hong J-S (2020) Locus coeruleus neurons are most sensitive to chronic neuroinflammation-induced neurodegeneration. *Brain Behav Immun* 87: 359–368.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.01.003>
75. Bueno-Nava A, Montes S, DelaGarza-Montano P, Alfaro-Rodriguez A, Ortiz A, Gonzalez-Pina R (2008) Reversal of noradrenergic depletion and lipid peroxidation in the pons after brain injury correlates with motor function recovery in rats. *Neurosci Lett* 443: 32–36.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.07.046>
76. Bari BA, Chokshi V, Schmidt K (2020) Locus coeruleus-norepinephrine: basic functions and insights into Parkinson's disease. *Neural Regen Res* 15: 1006.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.270297>
77. Kyritsis N, Kizil C, Zocher S, Kroehne V, Kaslin J, Freudenreich D, Iltzsche A, Brand M (2012) Acute inflammation initiates the regenerative response in the adult zebrafish brain. *Science* 338: 1353–1356.
<https://doi.org/10.1126/science.1228773>
78. Anand SK, Sahu MR, Mondal AC (2021) Induction of oxidative stress and apoptosis in the injured brain: potential relevance to brain regeneration in zebrafish. *Mol Biol Rep* 48: 5099–5108.
<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-549302/v1>
79. Schmidt R, Strähle U, Scholpp S (2013) Neurogenesis in zebrafish—from embryo to adult. *Neural Dev* 8: 1–13.
<https://doi.org/10.1186/1749-8104-8-3>

Behavioral, Genomic and Neurochemical Deficits Evoked by Neurotrauma in Adult Zebrafish (*Danio rerio*)

N. P. Ilyin^{a, b, c}, D. S. Galstyan^{a, b, c}, K. A. Demin^{a, b}, and A. V. Kalueff^{a, b, c, d, e, *}

^a*Institute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

^b*Almazov National Medical Research Center, St. Petersburg, Russia*

^c*Granov Russian Scientific Research Center for Radiology and Surgical Technologies,
St. Petersburg, Russia*

^d*Division of Neurobiology, Sirius University of Science and Technology, Sirius Federal Territory, Russia*

^e*Ural Federal University, Ekaterinburg, Russia*

*e-mail: avkalueff@gmail.com

Traumatic brain injury (TBI) is a serious biomedical problem with high prevalence and mortality risks. Understanding TBI in traditional (e.g., rodent) animal models often presents challenges due to the complexity of their brain and its limited regenerative capabilities. Here, we present novel data obtained using the zebrafish TBI model based on a stab wound of telencephalon, aiming to investigate behavioral and molecular consequences of TBI in zebrafish. Four days following the injury, adult zebrafish displayed hypolocomotion in the novel seen tank test and impaired working memory in the Y-maze test, paralleling behavioral deficits in rodent models and human TBI patients. Molecular analyses of key genes involved in the inflammatory response and cell death pathways revealed a remarkable upregulation of the interferon-stimulated gene 15 (*isg15*) in the injured telencephalon, a general biomarker for neuronal damage. Furthermore, noradrenaline (but not dopamine or serotonin) levels in whole-brain tissue declined following TBI, likely contributing to the observed cognitive deficits and implicating neurotransmitter dysregulation in TBI pathogenesis.

Keywords: traumatic brain injury, zebrafish, telencephalon, behavior, noradrenaline, *isg15*

DOI: 10.31857/S0869813923110134, EDN: GNVVSS



А.В. Калуев — авторитетный специалист в области трансляционной и молекулярной нейробиологии, нейрогенетики и биологической психиатрии. Родился 16 мая 1973 г. в Ленинграде в семье художников. Окончив с золотой медалью среднюю школу в 1989 г., в 16 лет он поступил на биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, который закончил в 1994 г. с красным дипломом по специальности “физиология”. В том же году он получил стипендию Президента России для обучения за рубежом, где (параллельно с аспирантурой) несколько лет работал исследователем в Бристольском и Бирмингемском университетах Великобритании. В 2002 г. им защищена кандидатская диссертация по физиологии на тему “Нейроактивные свойства пенициллинов и родственных бета-лактамных соединений” в Российском университете дружбы народов. Получив стипендию Правительства Финляндии, в 2003—2005 гг. А.В. Калуев работал в Медицинской школе Университета Тампере в Финляндии, где в 2005 г. защитил диссертацию на степень доктора философии (PhD) на тему “Неврологические нарушения у мышей с частично удаленным геном рецептора витамина Д”. В 2020 г. в СПбГУ им. академика С.П. Боткина им защищена докторская диссертация по физиологии на тему “Биологические основы моделирования процессов ЦНС и заболеваний мозга человека с использованием зебраданио (*zebrafish, Danio rerio*)”.

А.В. Калуев имеет обширный опыт работы за рубежом, в 2005–2008 гг. работая научным сотрудником Национального института психического здоровья (Бетесда, США), и в 2008–2012 гг. — доцентом физиологии в Медицинской школе Джорджтаунского университета и доцентом фармакологии в Медицинской школе Университета Тулейн (США). В 2014–2021 гг. он являлся почетным профессором нейробиологии и фармакологии в Гуандунском океаническом университете (Гуанчжоу, Китай) и профессором Школы фармацевтических наук Юго-Западного университета (Чунцин, Китай). С 2015 г. А.В. Калуев работает в России, являясь профессором и заведующим лабораторией биологической психиатрии Института трансляционной биомедицины СПбГУ, руководителем группы Национального медицинского исследовательского центра им. В.А. Алмазова МЗ РФ, ведущим научным сотрудником Химико-технологического института Уральского федерального университета, главным научным сотрудником Школы биологической и медицинской физики Московского физико-технического института, главным научным сотрудником лаборатории трансляционной биопсихиатрии НИИ нейронаук и медицины, руководителем группы направления “Нейробиология” Научно-технологического Университета “Сириус” и руководителем группы доклинического биоскрининга Российского научного центра радиологии и хирургических технологий им. акад. А.М. Гранова МЗ РФ.

Основные исследования А.В. Калуева посвящены изучению психических и неврологических заболеваний, а также выяснению механизмов их возникновения и поиску новых методов лечения на животных моделях. За последние десятилетия им разработаны новые подходы к тестированию широкого спектра препаратов и патологических состояний мозга на новом модельном организме — рыбе зебраданио, а также описаны особенности патогенеза рыб при моделировании ряда заболеваний мозга человека (стрессорные расстройства, аутизм, эпилепсия и нейродегенеративные заболевания). А.В. Калуевым показана эволюционная консервативность патологических процессов, происходящих в ЦНС зебраданио, что позволяет использовать этот организм для изучения заболеваний ЦНС и скрининга препаратов. Его группой выявлены промежуточные “гены-переключатели” тревоги и депрессии в модели социального стресса на мышах, и сформулирована гипотеза “переходных” генов ЦНС, ответственных за переключение и сопряжение коморбидных психических заболеваний. Им была подчеркнута роль серотонергической системы, в частности, гена и белка транспортера серотонина в аффективной патологии мышей и крыс, а также изучена генетическая модель дефицита гена ядерных рецепторов стероидного гормона витамина Д (у мышей) и показана его ведущая роль в патогенезе широкого спектра заболеваний мозга.

Большое внимание А.В. Калуев уделяет развитию регионального и международного сотрудничества, много лет коллаборируя с учеными США, Великобритании, Китая, Казахстана, Армении, Грузии и Белоруссии. Являясь членом международного наблюдательного совета Международной нейробиологической программы COBRAIN в Армении, он также принимает активное участие в организации и работе многих международных конференций. С 1997 г. А.В. Калуев — бессменный организатор Международных ежегодных конференций “Stress and Behavior”, регулярно выступает с многочисленными приглашенными лекциями и пленарными докладами. А.В. Калуев — член многих научных обществ, и с 2010 г. возглавляет Международное общество “Стресс и поведение” (ISBS) и Международный консорциум по нейробиологии зебраданио. Высокие научные результаты и плодотворная научно-организаторская деятельность А.В. Калуева отмечены научными наградами, в том числе наградой для молодых ученых Национального Альянса по изучению шизофрении и депрессии (NARSAD, 2008 г.), медалью Министерства

науки и высшего образования РФ за вклад в реализацию государственной политики в области образования и научно-технологического развития (2022 г.).

Лаборатория А.В. Калугева активно публикуется в престижных научных журналах, в том числе Science, Nature Reviews Neuroscience, Trends in Neuroscience, Trends in Pharmacological Sciences и Nature Biomedical Engineering. А.В. Калугев входит в редакционные советы Letters in Drug Discovery and Design, Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, Frontiers in Neurosciences (FBN), Neuroscience and Biobehavioural Reviews, Neurology, Psychiatry and Brain Research, Pharmacology and Drug Toxicology и ряда других международных журналов. Под его редакцией опубликованы первые в мире монографии по нейробиологии серотонинового транспортера, по нейробиологии груминга (2008 г.), а также по нейробиологии зебраданию (2012, 2017 гг.).

Помимо большой организаторской и международной деятельности, А.В. Калугев продолжает активную педагогическую деятельность. *“Хороший ученый должен быть удачливым, наблюдательным и немножко упрямым. При этом никогда не бойтесь мнения критиков, не бойтесь идти против течения — ведь все крупные научные мысли когда-то воспринимались в штыки”* — убежден А.В. Калугев. Сам же научный поиск в своих лекциях и беседах с коллегами он сравнивает с движением Поезда науки (the Train of Science): *“Поезд науки никого не ждет, он движется только вперед и на полной скорости”* — говорит ученый. А его коллеги и многочисленные ученики по всему миру уже хорошо знают, что такое Поезд науки, и часто используют это сравнение в своих лекциях и выступлениях.

Вклад в нейробиологию А.В. Калугева по достоинству оценен научным сообществом. Так, например, опубликованные им работы набрали более 23000 цитирований, сделав его одним из часто цитируемых российских ученых. В 2022 и 2023 гг. международным рейтингом ученых Research.com он назван самым цитируемым нейробиологом России. В 2021 г. А.В. Калугев избран членом Европейской академии по отделению нейронаук и физиологии, а в 2022 г. — Профессором РАН по секции медико-биологических наук Отделения медицинских наук РАН. Быть ученым, как показывает его научный путь — это значит не принадлежать себе, а полностью погружаться в мир неизведанного. В то же время, *“изучение мозга — самого сложного органа, подлинного венца эволюции — это большая привилегия и ответственность”* — подчеркивает А.В. Калугев.

Редакция журнала, а также коллеги и ученики Алана Валерьевича Калугева сердечно поздравляют его с юбилеем и желают крепкого здоровья, удачи и новых творческих свершений.