

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
"КРАСНОЯРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ПРОФЕССОРА В.Ф. ВОЙНО-ЯСЕНЕЦКОГО"
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

На правах рукописи

**ЛОПАТИНА
Ольга Леонидовна**

**ОКСИТОЦИН-ОПОСРЕДОВАННЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ
СОЦИАЛЬНОГО ПОВЕДЕНИЯ И РАЗВИТИЯ
ТРЕВОЖНЫХ СОСТОЯНИЙ**

03.03.01 - физиология

Диссертация
на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научные консультанты:
д.м.н., профессор
Салмина Алла Борисовна
M.D., Ph.D. профессор
Хигашида Харухиро

Красноярск 2017

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	8
Актуальность темы исследования	8
Цель исследования	13
Задачи исследования.....	13
Положения, выносимые на защиту	14
Научная новизна.....	15
Личный вклад соискателя.....	16
Практическая значимость работы	16
Внедрения в практику.....	18
Апробация работы.....	19
Публикации.....	20
Структура и объем диссертации.....	20
Финансовая поддержка работы	20
Благодарности.....	21
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	23
1.1 Окситоцин: синтез и высвобождение	23
1.2 Влияние окситоцина на поведение человека и животных.....	24
1.3 Вовлечение окситоциновых рецепторов во внутриклеточные каскады	30
1.4 Участие бифункционального рецептора-энзима CD38/АДФ-рибозилцилазы в высвобождении окситоцина из нервных клеток.....	32
1.5 Центральная ауторегуляция ОХТ при реализации социального поведения: молекулярные механизмы.....	35
1.6 Влияние социального опыта на обмен окситоцина.....	41
1.7 TRPM2, цАДФ-рибоза и осциляции внутриклеточного кальция в сигнализации окситоцина в клетках нейрональной природы	44
1.8 CD157/BST-1 - гомолога бифункционального рецептора-энзима CD38/АДФ- рибозилцилазы - во внутриклеточной сигнализации	47
ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	51
2.1 Объекты исследования	52

2.1.1 Мыши, дефицитные по гену <i>Cd38</i> (<i>Cd38</i> ^{-/-}).....	56
<i>Cd38</i> ^{-/-} - экспериментальная группа мышей (генетический фон - линия ICR). ...	56
2.1.2 Мыши, дефицитные по <i>Cd157/Bst1</i> (<i>Cd157</i> ^{-/-}).....	57
2.1.3 Фармакологические модели болезни Паркинсона (БП).	58
2.1.4 Мыши с экспериментальной нейродегенерацией (болезнь Альцгеймера). 59	59
2.1.5 Мыши с локальным нокдауном по CD38 и TRPM2	59
2.1.6 Культуры клеток	60
2.2 Тесты поведенческого фенотипирования животных	60
2.2.1 Поведенческие тесты для мышей в раннем постнатальном периоде	61
2.2.2 Поведенческие тесты для половозрелых мышей.....	61
2.3 Регистрация и анализ USV	67
2.4 Забор крови, спинномозговой жидкости и тканей головного мозга	68
2.5 Определение уровня окситоцина.....	69
2.6 Активность АДФ-рибозилциклизы	69
2.7 Введение экзогенного окситоцина	70
2.8 Антитела против CD157 кролика	70
2.9 Измерение температуры тела мышей	71
2.10 ПЦР-анализ	71
2.11 Иммуногистохимия.....	73
2.12 Плазмиды и трансфекция	76
2.13 Оценка синтеза NAADP	76
2.14 Высвобождение ОХТ из гипоталамуса.....	77
2.15 Микроперфузия головного мозга мыши.....	78
2.16 Эксперименты <i>in vitro</i>	79
2.16.1 Используемые материалы	79
2.16.2 ОТ-ПЦР для экспериментов <i>in vitro</i>	80
2.16.3 Измерение осцилляций $[Ca^{2+}]_i$	80
2.16.4 Клонирование и трансфекция кДНК окситоциновых рецепторов человека	81
2.17 Статистическая обработка результатов	82

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	83
3.1 Особенности нейроповеденческого статуса у взрослых мышей с делецией гена <i>CD157/BST1</i>	83
3.1.1 Общее состояние и локомоторная активность.....	83
3.1.2 Поведение во время экспозиции нового.....	86
3.1.3 Тревожное поведение и его коррекция.....	95
3.1.4 Депрессивно-подобное поведение и его коррекция.....	99
3.1.5 Социализация в трехкамерном тесте	101
3.1.6 Эмоциональные ответы <i>Cd157^{-/-}</i> мышей в тестах «Fear-conditioning» и «Startle response»	105
3.1.7 Коррекция пониженного уровня социализации с помощью экзогенного окситоцина	107
3.2 Экспрессия CD157 в различные периоды онтогенеза.....	109
3.2.1 Экспрессия CD157 в различных областях головного мозга у половозрелых <i>Cd157^{+/+}</i> мышей и мышей с делецией гена <i>Cd157</i>	109
3.2.2 Наличие CD157 в стволовых клетках мозга.....	116
3.3. Ферментативная активность CD157.....	116
3.4 Активность АДФ-рибозилцилазы	121
3.4.1 Активность АДФ-рибозилцилазы и уровень окситоцина в плазме крови у половозрелых мышей с делецией гена <i>Cd157</i>	121
3.4.2 Экспрессия мРНК у новорожденных и взрослых самцов мышей	122
3.5 CD38 и CD157 в процессах нейрогенеза	122
3.5.1 CD38 и CD157 в процессах нейрогенеза	124
3.5.2 CD38 и CD157 в процессах синаптогенеза.....	125
3.5.3. Особенности экспрессии CD38 и CD157 в клетках астроглиальной природы при экспериментальной нейродегенерации	127
3.6 Особенности развития и ультразвуковой коммуникации в период грудного вскармливания у <i>Cd157</i> нокаутных мышей.....	130
3.6.1 Результаты теста «Открытое поле» в экспериментальной модели аутизма	130

3.6.2 Групповая активность мышей самцов в «открытом поле».....	130
3.6.3 Ультразвуковая вокализация мышей самцов при социальной изоляции в раннем постнатальном периоде.....	134
3.6.4 Фармакологическая коррекция дефицита ультразвуковой вокализации..	138
3.6.5 Ультразвуковая вокализация мышей самцов <i>Cd157^{+/−}</i> при социальной изоляции в раннем постнатальном периоде.....	142
3.6.6 Контекст-специфичная (в процессе ухаживания самца за самкой) ультразвуковая вокализация у взрослых <i>Cd157^{+/−}</i> и <i>Cd157^{−/−}</i> мышей.....	142
3.6.7 Активность АДФ-рибозилцилазы в тканях головного мозга и уровень ОХТ в плазме крови <i>Cd157^{+/−}</i> и <i>Cd157^{−/−}</i> мышей-самцов в первые десять дней постнатального развития.....	145
3.7 Особенности развития и ультразвуковой коммуникации в период грудного вскармливания у <i>Cd38</i> нокаутных мышей.....	151
3.7.1 Локомоторная активность и ультразвуковая вокализация у <i>Cd38^{−/−}</i> мышей (модель экспериментального аутизма)	152
3.7.2 Уровень ОХТ в плазме крови и активность АДФ-рибозилцилазы в тканях головного мозга у <i>Cd38^{−/−}</i> мышей (модель экспериментального аутизма)	154
3.8 Осцилляции внутриклеточного кальция, индуцированные внеклеточным применением цАДФ-рибозой или окситоцином в нейрональных клетках грызунов NG108-15	157
3.8.1 Температура-чувствительное возрастание внутриклеточного кальция индуцируемое аппликациями цАДФ-рибозы или окситоцина в нейрональных клетках грызунов NG108-15	157
3.8.2 Ингибиование путем удаления внеклеточного кальция и TRPM2 антагонистом	158
3.8.3 Увеличение ингибиования $[Ca^{2+}]_i$ с помощью 8-bromo-cADPR	163
3.8.4 Окситоцин-индуцируемое повышение содержания кальция в клетках NG108-15, экспрессирующие рецепторы к окситоцину	165

3.9 Циклическая АДФ-рибоза и повышенная температура регулируют высвобождение окситоцина через CD38 и TRPM2 в гипоталамусе мышей при социальном или психологическом стрессе.....	168
3.9.1 Высвобождение OXT стимулируется циклической АДФ-рибозой и нагреванием <i>in vitro</i>	170
3.9.2 Высвобождение гипоталамического OXT у мышей с локальным нокдауном по CD38 или TRPM2 <i>in vitro</i>	173
3.9.3 Высвобождение OXT <i>in vitro</i> у социально стрессированных мышей	174
3.9.4 Высвобождение OXT <i>in vivo</i> при перфузии головного мозга с помощью цАДФ-рибозы у доминантных или подчиненных мышей.....	177
3.9.5 Высвобождение OXT <i>in vivo</i> при перфузии головного мозга с помощью cADPR у мышей доминантной и подчиненной группы.....	178
3.9.6 Высвобождение OXT <i>in vivo</i> при гипертермии у мышей - эффекты воздействии открытого поля.....	179
3.9.7 Уровень OXT в CSF во время гипертермии у мышей с инъекцией липополисахарида (LPS)	182
3.9.8 Механизмы стимулирующего высвобождения OXT на уровнях мРНК и белков CD38 и TRPM2.....	185
ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	190
4.1 Циклическая ADP-рибоза-, TRPM2- и OXT-зависимые осцилляции внутриклеточного кальция в клетках нейрональной природы.....	191
грызунов <i>in vitro</i>	191
4.2 Концентрация OXT в CSF и стресс	194
4.3 Социальные нарушения, гипертермия и аутизм	197
4.4 Тревожное и депрессивное поведение у взрослых мышей	198
с делецией гена CD157/BST1 (фактор риска болезни Паркинсона)	198
4.5 Нарушение ультразвуковой коммуникации в период грудного вскармливания у <i>Cd157</i> нокаутных мышей: временная коррекция окситоцином	206
4.6 CD157/BST-1 - нейрорегулятор	208

4.7 Эффекты делеции гена <i>Cd38</i> на процессы развития в ювенильном периоде у мышей-самцов. Роль экзогенного окситоцина.....	213
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	216
ВЫВОДЫ	219
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	221
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	224
ПРИЛОЖЕНИЯ	264

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Среди долгосрочных приоритетов развития нейронаук в предстоящие несколько десятков лет следует обозначить такие, как создание коллекций клеточных линий и линий животных, воспроизводящих социально значимые заболевания, в том числе заболевания центральной нервной системы, определение новых биологических мишеней, которые должны подвергаться воздействию синтетических молекул для предотвращения или ограничения патологического процесса; структурно-функциональная характеристизация тканей, клеток и клеточных элементов, обеспечивающих когнитивную функцию, выявление молекулярных и клеточных мишеней для диагностики, профилактики и терапии.

Известно, что социальные когнитивные функции включают получение информации, ее интерпретацию и формирование ответа на намерения, мнения, поведение, и лежат в основе социального взаимодействия. Много усилий было уделено расшифровке молекулярным основам социальной когниции и социального распознавания, но точные механизмы остаются неясными. Одной из основных проблем при изучении молекулярной основы данных процессов является то, что есть отсутствие четко ассоциированных изменений в структурах головного мозга, вовлеченных в этот процесс. Во многих психоневрологических расстройствах проявляются аберрантные социальные когниции и социальное распознавание (т.е. аутизм, шизофрения, депрессия, синдром ломкой X хромосомы, антисоциальное расстройство личности), а также других заболеваний головного мозга (например, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и т.д.) [13, 15, 33].

Нейрохимическая и нейрогенетическая основа нарушений социального поведения (связанных с такими проявлениями, как утрата социальной коммуникации, агрессия и др.) в том числе при заболеваниях, обусловленных

патологией развития центральной нервной системы, представляет собой актуальную проблему современной медицины. Разработка технологий ранней диагностики и коррекции таких патологических состояний представляет собой важную медико-социальную проблему в развитых странах.

Распространенность нейропсихических расстройств растет во всем мире. За период с 1990 по 2013 гг. число людей, страдающих от депрессии и/или тревожных расстройств, возросло почти на 50% — с 416 миллионов до 615 миллионов человек. По оценкам ВОЗ, во время чрезвычайных ситуаций от депрессии и тревожных расстройств страдает каждый пятый человек, во всем мире насчитывается 47,5 миллиона людей с деменцией. По данным Всемирной организации аутизма, в 2008 году 1 случай аутизма приходился на 150 детей, а в 2014 году - 65-67 случаев на 10000 новорожденных.

Расстройства аутистического спектра представляют собой группу нарушений развития, характеризующиеся дефицитом социального взаимодействия, а также ограниченными, повторяющимися и стереотипными моделями поведения. Симптомы обычно проявляются в возрасте до 3 лет и отражают драматические события в развивающемся головном мозге. Сложный характер этих нарушений в сочетании с отсутствием биологических маркеров для диагностики создает проблемы в осуществлении контроля за распространенностью аутизма [34, 35]. В связи со значительным ростом заболеваемости, а также разнообразной клинической картиной, характерной для заболеваний аутистического спектра, обусловленной разнородностью этиологических факторов и механизмов патогенеза, особенно актуальной становится проблема изучения клеточно-молекулярных механизмов патогенеза [24, 25, 32].

По своей сути, такого рода исследования отражают развитие представлений о новых механизмах нейропластичности, индуцированной воздействием факторов социальной природы. Формирование иерархии социальных связей протекает с участием социальных мотиваций и взаимодействий, информационной обработки социальных стимулов и формированием социальных воспоминаний, и активации

каскадов молекулярных механизмов. Установлено, что нейротрансмиттеры, гормоны и нейропептиды, вовлечены в каждый из этих процессов. В фокусе исследований последнего десятилетия – биологические эффекты нейропептидов (окситоцин, вазопрессин) в регуляции социального поведения [130, 194].

Люди, как социальные существа, биологически настроены на формирование избирательных и устойчивых связей друг с другом. Эти социальные связи обеспечивают защиту и комфорт на протяжении всей жизни [358]. Множество генетических, эпигенетических, поведенческих, неврологических и когнитивных процессов работают в унисон, чтобы сформировать смысловые и нейрохимические сети, которые необходимы для полноценного существования человека [220]. Предполагается, что гормон окситоцин (OXT), синтезируемый в гипоталамусе головного мозга, участвует в формировании и реализации социального поведения у животных и человека [56, 100, 293], включая сексуальное поведение, социальные взаимодействия между индивидумами, материнское [117, 139] и отцовское поведение [140], взаимодействие матери с новорожденным [54, 231, 261], социальное распознавание [197, 388] и социальную память [66, 415]. Также, например, показаны неклассические эффекты вазопрессина при нейродегенерации [5, 38].

Эффекты окситоцина, однако, могут быть положительными в разной степени, что зависит от уровня родительской заботы и/или неблагоприятных условий в окружающей среде человека в раннем возрасте. Например, недавние генетические исследования показали, что однонуклеотидные полиморфизмы в гене OXT рецепторов в комбинации с факторами окружающей среды формируют риски возникновения психических расстройств и других поведенческих отклонений. Например, результатом положительной взаимосвязи генотипов OXT рецепторов и внешних факторов является реализуемое поведение - эмпатия [400] и доверие [212], или, наоборот, при комбинации с неблагоприятными условиями возникают состояния зависимости [258, 278], создавая «почву» к развитию депрессии и тревоги. Генетическая изменчивость в гене OXT рецепторов может модулировать риск психических и поведенческих симптомов, и это может быть

обусловлено комбинацией кумулятивных генетических эффектов в локусе OXT рецепторов. Было показано, что совокупный показатель генетического риска в отношении OXT рецепторов, CD38 и рецепторов к вазопрессину, ранее связанный с психопатологией, социализацией и заботой матери, ассоциирован с наличием травмы у детей, тем самым прогнозируя более высокий уровень посттравматического синдрома, тревожных расстройств, расстройств поведения и синдром дефицита внимания и гиперактивности [121], что также подтверждает роль гена OXT рецепторов во взаимодействии с факторами окружающей среды [349].

Несмотря на значительные успехи в «складывании мозаики» генетических и молекулярных каскадов обмена OXT, все еще остается открытым вопрос, как происходит регуляция секреции окситоцина гипоталамусом и его выделение в кровь нейрогипофизом при реализации социального поведения. До сих пор нет однозначной картины этио- и патогенеза дефицита социализации и нарушений социальной памяти [120, 148, 253, 289]. Молекулярные механизмы регуляции поведенческих реакций могут быть связаны с CD38/АДФ-рибозилцилазой, бифункциональным рецептором/энзимом, присутствующем во многих тканях организма, и катализирующим образование циклической АДФ-рибозы (цАДФ-рибоза) и NAADP [164, 224, 226]. цАДФ-рибоза и NAADP являются эндогенными регуляторами внутриклеточной мобилизации Ca^{2+} и высвобождения окситоцина [165].

Обнаружено, что CD38 участвует в регуляции секреции окситоцина, и нарушение экспрессии CD38 ассоциировано с развитием аутистических форм поведения у экспериментальных животных и человека [193].

Было экспериментально доказано существование позитивной обратной связи окситоцин-индуцированного высвобождения OXT при реализации социальных взаимодействий на примере родительского поведения. Повторный родительский опыт способствует запуску молекулярных механизмов ауторегуляции окситоцина [235, 243, 244]: OXT, связываясь с OXT рецепторами, индуцирует молекулярные каскады активации АДФ-рибозилцилазы и синтез

цАДФ-рибозы в клетках гипоталамуса и нейропиофиза у мышей-самцов дикого типа. Опосредованная окситоцином активация АДФ-рибозилцилазы носит доза-зависимый характер и протекает с непосредственным участием протеинкиназы С (РКС) [242].

Значительный объем работ был выполнен по изучению роли CD38 в регуляции секреции окситоцина в гипоталамо-гипофизарной системе и контроле социального поведения млекопитающих. Был осуществлен сравнительный анализ распространенности заболеваний аутистического спектра в России и Японии, комплексная оценка нейропсихического и поведенческого статуса детей с аутизмом, поиск нового гена-кандидата при аутизме. Впервые была обнаружена гетерозиготная мутация в гене, кодирующем CD38, у лиц мужского пола с аутизмом, что хорошо согласуется с ранее полученными экспериментальными данными о CD38-опосредованной регуляции секреции окситоцина в головном мозге и нарушении этого механизма при аутизме [273, 274].

Циклическая АДФ-рибоза является продуктом активности АДФ-рибозилцилазы и трансмембранный CD38 и действует, в основном, как внутриклеточный вторичный мессенджер в нервной системе, однако, не было исследований об активности цАДФ-рибозы в нейронах. Известно, что меластатин-связанный канал транзиторного рецепторного потенциала 2 (TRPM2; ранее названный TRPC7 или LTRPC2) с активностью гидролазы АДФ-рибозилцилазы является Ca^{2+} -проницаемым ионным катионным каналом и может активироваться посредством β -НАД $^+$, АДФ-рибозилцилазы и цАДФ-рибозы. Кроме того, предполагается, что каналы TRPM2 могут взаимодействовать с рецепторами, функционирующими через активацию цАДФ-рибозы [55, 151]. Однако, поскольку было очень мало сообщений об активации АДФ-рибозилцилазы рецепторами, за исключением мускариновых, ангиотензиновых и брадикининовых [98, 162], остается открытым вопрос об активации TRPM2 посредством цАДФ-рибозы при активации рецепторов к окситоцину.

Наряду с CD38 и его ролью в реализации социального поведения, все большее внимание в данном контексте привлекает гомолог CD38, CD157/антиген

стромальных клеток костного мозга -1 (BST-1). CD157/BST-1, одноцепочечная молекула, заякоренная с G-белком, принадлежащая к семейству АДФ-рибозилциклиз и обладающая гидролазной активностью для АДФ-рибозы, поддерживает выживание и функцию β -лимфоцитов и гемопоэтических или кишечных стволовых клеток. Хотя CD157/BST1 является локусом риска при болезни Паркинсона, мало что известно о функции CD157 в нервной системе и его вкладе в процессы нейрогенеза.

Цель исследования

Изучить молекулярные окситоцин-опосредованные механизмы пластичности головного мозга, лежащие в основе тревожных состояний, реализации социального поведения и реакций на действие социальных факторов, для разработки новых методов диагностики и лечения заболеваний, проявляющихся нарушениями эмоциональной сферы и реализации социального поведения (расстройства аутистического спектра, состояния тревожности, хроническая нейродегенерация).

Задачи исследования

1. Исследовать вклад цАДФ-рибозы и каналов TRPM2 в процессы ауторегуляции ОХТ через ОХТ рецепторы и сигнализации нейрональных клеток, опосредованные высвобождением внутриклеточного кальция.
2. Установить возможные молекулярные пути инициации окситоцин-индуцируемых и цАДФ-рибоза-опосредованных осцилляций $[Ca^{2+}]_i$.
3. Оценить возможность TRPM2 каналов выступать в качестве молекулы-мишени при заболеваниях, ассоциированных с нарушением социального поведения и стрессоустойчивости.

4. Обозначить роль экспрессии CD157 в нервной системе и в развитии нарушений реализации социального поведения, а также возможность использования *Cd157^{-/-}* мышей как модели заболеваний, ассоциированных с нарушением социализации и нейро-социальной пластиности.
5. Изучить вклад CD157 и CD38 в процессы нейро- и синаптогенеза, и их роль в развитии экспериментальной хронической нейродегенерации.
6. Оценить роль CD157 в механизмах секреции и реализации эффектов окситоцина.
7. Обосновать и протестировать в эксперименте потенциальную возможность применения экзогенного ОХТ в качестве модулятора нейро-социально-коммуникативной пластиности, дополнив существующую концепцию позитивной обратной связи при введении экзогенного ОХТ и реализации социального поведения на молекулярном и поведенческом уровнях.

Положения, выносимые на защиту

1. Каналы TRPM2 и цАДФ-рибоза опосредуют температурно-зависимое высвобождение кальция и участвуют в ОХТ-индуцируемой активации ОХТ рецепторов.
2. Каналы TRPM2 могут быть рассмотрены как новые молекулы-мишени при заболеваниях, ассоциированных с нарушением социального поведения и аберрантной чувствительностью к стрессовым факторам.
3. CD157 выступает как мультисистемный регулятор, и кодирующий его ген является геном-кандидатом и риск-фактором развития состояний беспокойства и тревожности, нарушенной чувствительности к стресс-факторам.
4. CD157 и CD38 участвуют в процессах развития головного мозга, нейропластиности за счет регуляции центральной секреции ОХТ, а также в процессах нейровоспаления при нейродегенерации.

5. Экзогенный ОХТ инициирует процессы нейропластиности через каскады активации ОХТ рецепторов с последующей положительной обратной связью в реализуемом социальном поведении и может выступать модулятором нейро-социальной когниции.

Научная новизна

В результате проведённой исследовательской работы изучены новые механизмы нейропластиности применительно к реализации сложных форм поведения, обусловленные эффектами центральной секреции окситоцина.

Впервые идентифицированы новые механизмы регуляции секреции окситоцина, определяющие характер социальных взаимодействий, а также влияние окситоцина на процессы функциональной активности клеток головного мозга в норме и при повреждении головного мозга на ранних этапах развития организма.

Впервые показаны участие каналов TRPM2 в ОХТ-индуцируемой активации ОХТ рецепторов и возможность рассмотрения TRPM2 и его кодирующего гена как молекулярных мишеней при заболеваниях, ассоциированных с нарушением социального и эмоционального поведения.

Впервые продемонстрировано, что CD157 может выступать как мультисистемный регулятор и его кодирующий ген может быть геном-кандидатом и должен быть учтен как фактор риска развития состояний тревожности.

Впервые обнаружено участие CD157 и CD38 в процессах пролиферации клеток головного мозга и его пластичности как в норме, так и при нейродегенерации.

Получены принципиально новые данные о влиянии окситоцина на пластичность лимбико-гипоталамо-гипофизарной системы на разных этапах развития головного мозга в норме и при патологии.

Личный вклад соискателя

Основные научные результаты по теме исследования получены лично автором. Совместно с научными консультантами определены цели, задачи, объем исследования, его этапы и направления. Соискателем самостоятельно разработаны протоколы и схемы экспериментов, сформированы экспериментальные группы. Соискатель осуществляла подробную работу с литературой, нейроповеденческое тестирование животных, забор биологического материала, анализ биологических образцов и интерпретацию полученных данных.

Участие соискателя в работе представлено в опубликованных трудах. Личный вклад соискателя при выполнении комплексных экспериментальных исследований составил от 45 до 90%, в подготовку докладов и публикаций в соавторстве – 40-80%.

Индекс Хирша автора диссертации по результатам 2017 года - 12 (по базе данных Web of Science), 13 (по базе данных Scopus), 12 (по базе данных РИНЦ).

Практическая значимость работы

В фокусе исследований – молекулярные механизмы развития так называемого «социального мозга», то есть структур и процессов, определяющих взаимодействие организма в социуме (социальное распознавание, социальная память, привязанность, доверие, родительское поведение).

Полученные результаты формируют новое представление о процессах, ответственных за секрецию и биологическую активность окситоцина, в контексте его регуляторного влияния на процессы социального распознавания и социального поведения как в норме, так и при развитии заболеваний, ассоциированных с нарушением социальных взаимодействий и эмоциональной сферы.

Проведенные исследования позволяют идентифицировать новые молекулы-мишени для фармакологической модуляции процессов секреции окситоцина и коррекции нарушенных форм социального поведения при заболеваниях центральной нервной системы различного генеза.

В процессе работы изучены новые, ранее неизвестные, молекулярные механизмы развития аутизма. На основании полученных результатов предложена новая экспериментальная модель аутизма, и могут быть созданы другие экспериментальные модели заболеваний, связанных с нарушениями социального поведения в развивающемся и зрелом мозге, а также новые диагностические и фармакотерапевтические подходы, лекарства-кандидаты при заболеваниях головного мозга, ассоциированные с нарушениями социального поведения.

Полученные результаты могут быть использованы при создании нейротехнологий, связанных с управлением механизмами реализации интегративных функций мозга и сложных форм поведения, применимых в неврологической и психиатрической практике.

Результаты проведенных исследований имеют не только фундаментальное, но и прикладное значение в следующих направлениях развития биомедицины:

1) создание коллекций клеточных линий и линий животных, воспроизводящих социально значимые заболевания, в том числе заболевания ЦНС;

2) определение новых биологических мишеней, в том числе гормонов, ферментов, рецепторов, сигнальных внутриклеточных молекул, которые должны подвергаться воздействию синтетических молекул для предотвращения или ограничения патологического процесса;

3) структурно-функциональная характеризация тканей, клеток и клеточных элементов, обеспечивающих когнитивную и социальную функцию;

4) выявление молекулярных и клеточных мишеней, а также эффекторных молекул для диагностики, профилактики и терапии заболеваний головного мозга.

Внедрения в практику

Экспериментальный подход, использующий моделирование социальных взаимодействий на лабораторных мышах, может быть полезен для изучения механизмов ауторегуляции секреции окситоцина в целом – от нормы до глубокой (генетической) патологии; для исследования механизмов действия и эффективности различных фармакологических препаратов с потенциальными антидепрессивными и анксиолитическими свойствами в условиях, приближенных к клиническим, и разрабатывать эффективные стратегии фармакологической коррекции уровней окситоцина на разных стадиях нарушения социальных взаимодействий.

Определение динамических изменений в механизмах секреции и высвобождения окситоцина при реализации социальных взаимодействий поможет разрабатывать и предлагать релевантные методы фармакологической коррекции нарушений социального поведения в зависимости от уровня дефицита социального ответа и уровня окситоцина, как на уровне животного, так и в последующем, с учетом экспериментальных данных, полученных в клинических испытаниях, на уровне человека.

Области применения полученных результатов: нейробиология развития, нейрохимия, неврология, нейрофармакология, неонатология, психиатрия.

Направления практического внедрения полученных результатов: 1) планирование и проведение доклинических трансляционных исследований с использованием моделей заболеваний ЦНС на животных; 2) оптимизация диагностических алгоритмов в неонатологии, неврологии, психиатрии; 3) разработка новых фармакотерапевтических стратегий, направленных на нормализацию интегративных функций головного мозга; 4) разработка научно-обоснованных критериев прогноза развития заболеваний головного мозга, ассоциированных с нарушением сложных форм поведения, в разные периоды онтогенеза.

Результаты, полученные в ходе диссертационного исследования, внедрены в учебный процесс кафедры биохимии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии (курс биохимии для студентов, курс «Нейробиология развития» для последипломного образования (аспиранты)), научный процесс НИИ молекулярной медицины и патобиохимии ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, научный и образовательный процесс Медицинской Школы Университета г. Канадзава.

Апробация работы

Основные положения работы были доложены и обсуждены на российских и международных конференциях в виде устных и стендовых докладов: Neurotalk-2017 (Spain, 2017); NeuroFrance-2017 (France, 2017); 12th Göttingen Meeting of the German Neuroscience. (Germany, 2017); Эстафета вузовской науки (Москва, 2017); V Съезд физиологов СНГ (Дагомыс, 2016); The 9th International Symposium on Neuroprotection and Neurorepair (Germany, 2016); IX Всероссийская конференция «Нейроэндокринология – 2015» (Санкт-Петербург, 2015) 11th Göttingen Meeting of the German Neuroscience (Germany, 2015); NAD A3 (Asian 3 countries) Meeting and The 3rd Summit for Child Mental Development of Kanazawa University (Japan, 2014); 10 The Brain Conferences - The Social Brain (Denmark, 2014); 9th FENS Forum in Neuroscience (Italy, 2014); Международный конгресс по нейронаукам (Красноярск, 2014); The European Winter Conference on Brain Research/EBBS (France, 2013); The 10th WCNH (UK, 2013); 16th EFNS Congress (Sweden, 2012); Пятый международный конгресс по нейронаукам (Калининград, 2012); XIX Российский национальный конгресс «Человек и лекарство» (Москва, 2012); «Ломоносов 2012» (Москва, 2012).

Публикации

По результатам работы опубликовано 26 работ, в том числе 21 статья в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 3 статьи в других изданиях, 1 монография, 2 главы в монографиях на английском языке.

Структура и объем диссертации

Диссертация оформлена в соответствие с Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р7.0.11-2011, изложена на 277 страницах машинописного текста, состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, содержащего 423 источников (40 отечественных и 383 иностранных), 13 приложений.

Диссертационная работа иллюстрирована 5 таблицами, 81 рисунком.

Ссылки и список литературы оформлены при использовании программы работы с библиографией «Zotero» и автоматическим подключением ГОСТ 7.0.5.-2008 (numeric, sorted alphabetically, Russian; <https://www.zotero.org/>).

Финансовая поддержка работы

Эксперименты в рамках данной работы проведены при поддержке грантов:

- грант Министерства здравоохранения РФ для выполнения научных фундаментальных исследований (2014-2016 гг.).
- грант Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ РФ (НШ-10241.2016.7).

Исследования выполнены с применением современных методов (молекулярно-генетические, аналитические, биохимические и пр.), в тесном сотрудничестве с ведущими исследовательскими центрами зарубежных стран,

занимающимися изучением механизмов развития головного мозга в норме и при патологии (Япония).

- грант в области «Комплексных исследований в области нейропсихиатрических расстройств», осуществляемый в рамках Программы стратегических исследований нейронаук Министерства образования, культуры, спорта, науки и технологий Японии (grant-in-aid from “Integrated research on neuropsychiatric disorders” carried out under the Strategic Research Program for Brain Sciences by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (MEXT))
- грант Японского агентства медицинских исследований и разработок (grant of the Japan Agency for Medical Research and Development (AMED))
- грант Академии совместных научно-исследовательских программ (Academia Collaborative R&D Programs (COI) from MEXT).

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность:

- к.м.н. Юлии Константиновне Комлевой и к.фарм.н. Яне Валерьевне Гориной за совместную работу в области нейробиологии и нейрохимии, за помощь в организации и реализации исследовательской деятельности, анализе полученных данных и подготовки рукописей к публикации в реферируемых научных журналах;
- Сигеру Йокояма, Казуми Фурухара, Терико Юхи, Чихару Тсуджи, Дуо Джин, Сарват Амина, Хонг-Хианг Лиу, Мингун Лианг, Тору Йошихара, Ширин Актер, Азам Факхрул, Сатоко Нино, Катсухико Исихара, Динг Зонг (Университет г.Канадзава, Япония) за долговременное научное сотрудничество в области современной нейронауки, за бесценный вклад в развитие научного мышления автора, за содействие в проведении экспериментов и подготовке публикаций международного уровня;

- коллективу НИИ молекулярной медицины и патобиохимии (ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, руководитель – д.м.н., профессор, А.Б.Салмина) за помошь в подготовке, представлении, публичной защите и обсуждении диссертации;
- коллективу Исследовательской лаборатории Центра изучения развития детей Университета г. Канадзава (Япония, руководитель – профессор Х. Хигашида) за помошь в освоении экспериментальных протоколов и проведении экспериментов.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Коммуникативная социализация - центральная черта человека как вида. Сложный комплекс социального познания и поведения человека традиционно служит для дифференциации людей от животных. Тем не менее, существует несколько основных элементарных компонентов человеческой социобиологической системы, которые присутствуют во многих видах животных, и, возможно, оставались относительно консервативными на протяжении всей недавней эволюционной истории [152, 256]. Выяснение генетических и биологических субстратов социального поведения помогает углубить понимание основы человеческой природы и улучшить способы использования генетических и биологических маркеров для предотвращения, диагностики и лечения людей с нарушениями социального поведения и эмоциональной сферы.

В настоящей главе рассматриваются современные представления о молекулярных механизмах нарушения развития головного мозга, вызванного действием факторов в перинатальном и раннем постнатальном периодах, молекулах (окситоцин, рецепторы к окситоцину, CD38, CD157, TRPM2), маркирующих дефицит социального поведения и социальной памяти (обзор литературы).

1.1 Окситоцин: синтез и высвобождение

Нейрогипофизный гормон окситоцин (OXT) был первым пептидным гормоном, структуру которого определили и впервые химически синтезировали в биологически активной форме в 1953 г [12]. Он назван в честь его способности облегчать роды за счет его матотонической деятельности («быстрое рождение» - ὡκυξ = быстрое, τοκοξ = рождение). Структура гена OXT была выяснена в 1984 году, а последовательность рецептора к OXT была зарегистрирована в 1992 году [135].

ОХТ состоит из девяти аминокислот (Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-GlyNH₂) с серным мостиком между двумя цистеиновыми группами [12]. Структура ОХТ очень похожа на другой нонапептид - вазопрессин (AVP), который отличается от ОХТ двумя аминокислотами. Благодаря дупликации генов ген ОХТ расположен на одной и той же хромосоме (хромосома 2 у мышей и 20я - у людей), так же как и ген AVP, но ориентирован в противоположном направлении транскрипции у млекопитающих. Оба ОХТ и AVP гена содержат три экзона и два интрана и являются высоко гомологичными. Эти два гена разделены межгенной областью (IGR), которая различается по длине у разных видов (например, 11 kb у крыс и человека и 3,6 kb у мыши). IGR обеспечивает регуляторные последовательности ДНК в консервативных частях как для ОХТ, так и для AVP [133, 412]. Препрогормон состоит из сигнального пептида, нанопептида (ОХТ) и нейрофизина.

ОХТ синтезируется в магногеллюлярных нейронах паравентрикулярных и супраоптических ядер гипоталамуса, а затем по нейронным проекциям попадает в нейрогипофиз, где накапливается в визикулях аксонов и далее высвобождается в кровоток (**рисунок 1**).

На настоящий момент известно, что ОХТ проявляет широкий спектр центральных и периферических эффектов. Действия ОХТ варьируются от модуляции нейроэндокринных рефлексов до установления сложных социальных форм поведения, связанных с социальным распознаванием, запоминанием, воспроизведением и уходом за потомством. В целом, циклический нонапептид ОХТ и его структурно родственные пептиды облегчают социальное познание и размножение у всех позвоночных на нескольких уровнях.

1.2 Влияние окситоцина на поведение человека и животных

Окситоцин является важным и полипotentным нейропептидом, обладающим ключевыми свойствами в регуляции комплекса социальных

взаимодействий и когнитивных функций на протяжении всей эволюции и жизненного цикла млекопитающих [8, 262, 286]: социальные контакты [182, 185], социальная познавательная деятельность, распознавание [395], агрессия [68, 97], беспокойство [221], состояние страха [177] и процесс затухания условных реакций страха [288] (**рисунок 2**).

Окситоцин привлекает к себе пристальное внимание из-за его разнообразного влияния на поведенческие функции у человека и животных (**рисунок 2**). Окситоцин выделяется в определенных участках мозга на соответствующую стимуляцию, где он регулирует не только нейроэндокринные и вегетативные функции, относящиеся к воспроизведству [39], но и просоциальное поведение (поддерживая когнитивные эффекты) и эмоциональные реакции, способствуя общим явлениям релаксации, доверия и психологической устойчивости [285].

Было показано, что высокий уровень окситоцина в плазме крови человека находится в положительной корреляции со степенью доверия и надежности [413], с позитивным непосредственным физическим контактом с партнером [145], сниженным уровнем гормонального ответа на психосоциальный стресс [368] и пониженным уровнем тревожности у пациентов с депрессией [58, 303].

Сниженный уровень окситоцина был найден у пациентов с шизофренией [74, 200] и расстройствами аутистического спектра [10, 47, 144]. Однако, до сих пор непонятно, насколько тесно периферический окситоцин связан с функцией нейропептидов ЦНС, которая непосредственно отвечает за эффекты поведения и психопатологию [40]. Справедливость оценки и интерпретации уровня периферического нейропептида по отношению к доступности его в ЦНС и влияние окситоцина на поведение являются весьма спорными и требуют дальнейших исследований [111, 248, 307, 377], что является важным аспектом трансляционной медицины.

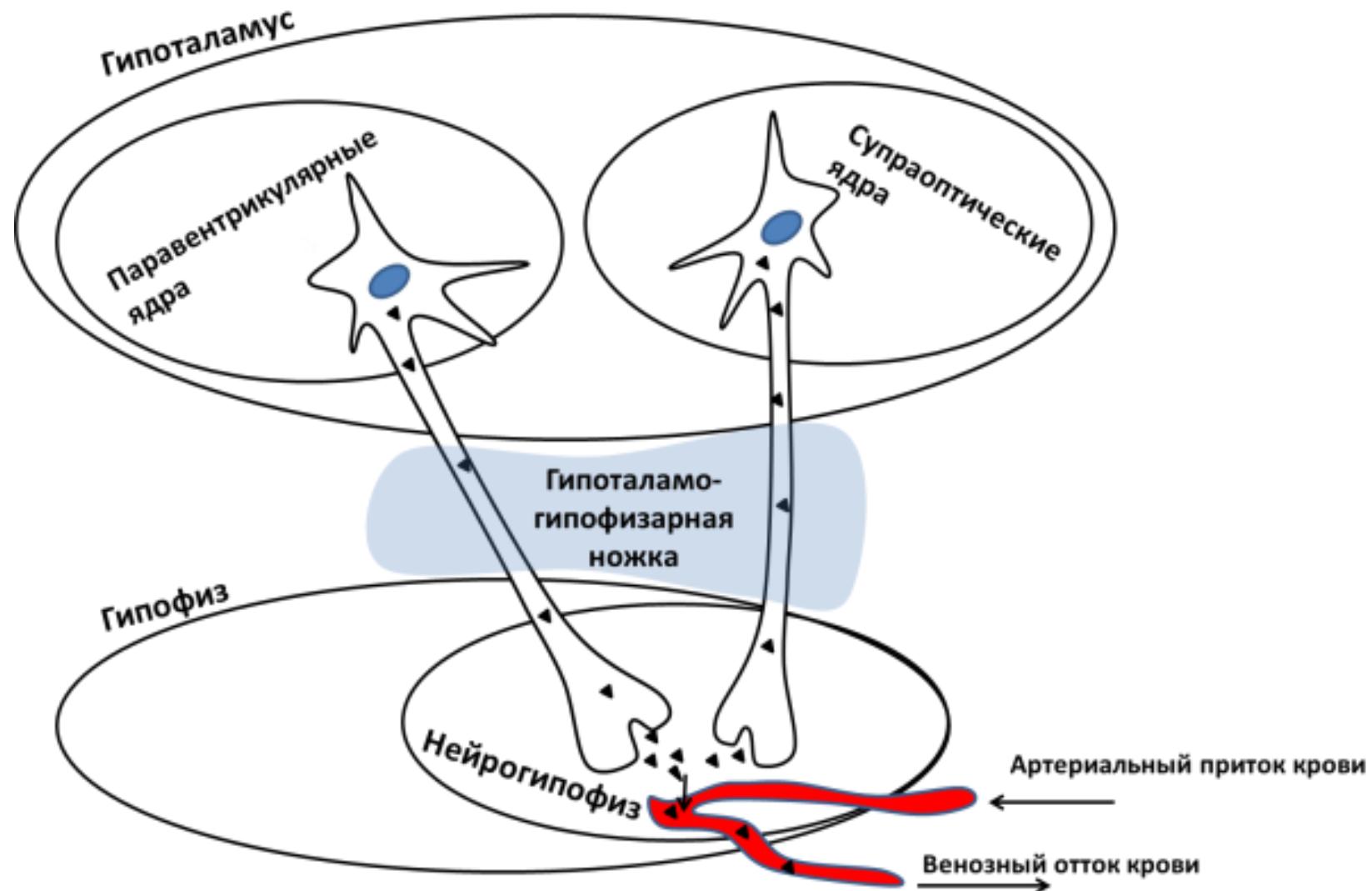


Рисунок 1 Синтез и высвобождение окситоцина. Чёрные треугольники – окситоцин.



Рисунок 2 Палитра центральных эффектов окситоцина.

Обнаружено, что функции окситоцина снижены при различных психических расстройствах с сопутствующим социальным дефицитом. Благодаря открытию, что окситоцин может быть не инвазивно доставлен в мозг человека [60] с последующим положительными ответами на уровне поведения и нейронов, становится возможным исследования применения окситоцина в трансляционной медицине. Такой подход является важной составляющей в разработке эффективного лечения при таких тяжелых психических расстройствах развития как, например, расстройства аутистического спектра [262, 299].

Введение окситоцина человеку внутрь головного мозга посредством внутрижелудочковой инъекции или интраназально оказывает различное влияние на социально-поведенческие реакции [249, 250]. Эти эффекты включают в себя:

- анксиолизис за счет уменьшения периферического кортизола и изменения соответствующего поведения [75, 103, 104, 313],
- изменения в родительском поведении [53, 172, 210],
- увеличение просоциального поведения, измеряемое доверием, щедростью, альтруизмом, отвращение к предательству, в поведенческих и/или функциональных МРТ исследований [52, 93, 209],
- изменения в восприятии лица, основанные на МРТ исследованиях, позволяющие выявить дифференциальную активность миндалины [178, 232];
- изменения взгляда с более сильной фиксацией на глазах [50, 150],
- улучшение социальной оценки собеседника или ментализацию (вероятно, связано с более выраженной фиксацией взгляда на глазах) [48, 105], в частности, при нарушениях, таких как аутизм [149, 385], шизофрения [106, 136], лобно-височная деменция [191, 215],
- позитивные изменения в социальной памяти [54, 178, 357].

Работы, выполненные с использованием моделей грызунов, убедительно показывают, что центральная роль окситоцина в посредничестве сложного социального поведения зависит от функции миндалевидного тела: окситоцин

воздействует на миндалину, что приводит к снижению страха [257, 324] и модулирует агрессию [61, 62, 131, 211]. Мыши, дефицитные по окситоцину, демонстрируют глубокую дисфункцию социальной памяти, но нормальное обоняние и пространственную память. Инъекции окситоцина восстанавливают социальную память [122, 193].

Окситоцин также выступает медиатором реакции страха, в том числе и социального страха, ингибируя возбуждение проецирующих нейронов из миндалины к стволу мозга [177, 379]. Таким образом, ОХТ снижает активацию миндалины и моделирует функциональные сети, связанные с обработкой страха [207, 211, 253].

Действие ОХТ в повышении доверия и просоциального поведения опосредовано, по крайней мере частично, через влияние на общую социальную оценку, включая межличностное восприятие угрозы. Ключевым игроком в обнаружении соответствующих стимулов в окружающей среде, в том числе в реакции на очевидные угрозы, является миндалина, стимулирующая также каскады возбуждения вегетативной нервной системы. Чрезмерная активация миндалины во время социальных контактов увеличивает тревогу, что, в свою очередь, приводит к социальной изоляции [200]. У человека, например, активация миндалины способствует увеличению прямого зрительного контакта [107, 389]. Существует доказательство того, что экзогенный ОХТ уменьшает активацию миндалевидного тела [75, 158, 249], способствуя увеличению восприимчивости многозначности социальных сигналов [338]. Это снижение физиологических и психологических реакций в ответ на угрозу, по крайней мере частично, протекает за счет нарастания просоциального поведения [348].

В совокупности все эти результаты свидетельствуют о том, что мобилизация эндогенной ОХТ системы мозга, рассматриваемая как у женщин, так и у мужчин, оказывает благоприятное воздействие, в частности ингибируя реакции, вызванные поведенческим, социальным и/или нейроэндокринным стрессом. Понимание, прогнозирование и коррекция молекулярных каскадов, лежащих в основе активации ОХТ важно при лечении клинических расстройств,

отмеченных дефицитом внимания и/или нарушением социального взаимодействия.

1.3 Вовлечение окситоциновых рецепторов во внутриклеточные каскады

Локальное высвобождение окситоцина в мозге вызывает возбуждение ОХТ нейронов путем активации окситоциновых рецепторов. ОХТ имеет только один тип окситоциновых рецепторов (OXTR) [135], локализованный на хромосоме 3р26.2. и принадлежащий к семейству рецепторов окситоцина и вазопрессина, класс А по международной базе данных IUPHA (2.1:OXY:1:OT; <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/GPCRListForward?class=A>). Рецепторы к ОХТ экспрессируются в разных тканях организма, но их локализация сильно варьируется как внутри, так и между видами.

Рецепторы к окситоцину экспрессируются в нейронах паравентрикулярных и супраоптических ядрах гипоталамуса и нервных окончаниях задней доли гипофиза, а также в других регионах головного мозга [194, 203]. ОХТ рецепторы представляют собой протеины, имеющие семь трансмембранных доменов, которые взаимодействуют с семейством G белков ($G_{\alpha q11}, G_s, G_i$) [377].

Активация окситоциновых рецепторов реализуется тремя различными механизмами с участием G-связывающих протеинов:

1. Основной механизм осуществляется через $G_q/PLC/InsP_3$ каскад. ОХТ связывается с OXTR, активируя $G_{\alpha q}/11$ и фосфолипазу С (PLC), которая расщепляет PIP2 (фосфоинозитолфосфат 2) до инозитолтрифосфата ($InsP_3$) и диацилглицерола (DAG). $InsP_3$ индуцирует кальций-зависимое высвобождение внутриклеточного кальция (CICR) посредством активации рецепторов к инозитолтрифосфату ($InsP_3R$), что приводит к высвобождению Ca^{2+} из внутреклеточных депо и активации протеинкиназы С (PKC) [135].

2. Активация протеина G_q является также причиной деполяризации мембраны, которая в свою очередь активирует VGCCs (потенциал-зависимые кальциевые каналы) и способствует выходу кальция через VGCCs. Таким образом, возрастание $[Ca^{2+}]_i$ стимулирует кальмодулин (CaM). Комплекс Ca^{2+}/CaM активирует кальмодулин киназу (CaMK), что вызывает сокращение мышц во время родов, или индуцирует активацию различных энзимов, таких как NOS и PI3K. DAG активирует протеинкиназу С путем различных клеточных ответов.

Существует три механизма окситоцин-индуцированной деполяризации мембраны, описанные в различных типах нервных клеток: 1) подавление потенциал-активируемых K^+ токов; 2) активация неселективных катионных каналов; 3) активация устойчивого Na^+ -зависимого канала. Ингибирование $GABA_A$ рецепторов (деполяризация возможна, если $GABA$ выступает тормозящим модулятором) [377].

3. Дополнительный каскад активации OXT рецепторов реализуется через повышение активности MAP-киназы (митоген-активированные протеинкиназы, MAPK) и Rho киназы. В миометрии показано, что увеличение активности COX2 (циклооксигеназа 2) является медиатором возрастания продукции и секреции простагландинов. OXTR-опосредованное открытие кальциевых каналов протекает через активацию свободных $G_{\beta\gamma}$ субъединиц. OXT рецепторы взаимодействуют с G протеинами, G_s и G_i , которые принадлежат к каскаду AC (аденилатциклазы). Пролиферативный эффект включает MAPK-опосредованную активацию специфической транскрипции генов. Трофический эффект возникает за счет РКС-опосредованной индуцирования eEF2 (эукариотический фактор элонгации 2). Повышение активности Rho- и MAP-киназ, возрастание уровня внутриклеточного Ca^{2+} и секреции простагландинов способствует сократительным эффектам. Анти-пролиферативный эффект опосредовано наблюдается в некоторых клетках за счет субъединиц αiG протеина [99, 377]. Анти-пролиферативный G_i опосредованный эффект был описан как зависящий от транс-активации рецепторов к эпидермальному фактору роста (EGFR) и активации митоген-

активированной протеинкиназы через PLC/PI3K/c-Src-зависимый механизм, ведущий к устойчивому ингибиоранию клеточного цикла [323].

1.4 Участие бифункционального рецептора-энзима CD38/АДФ-рибозилциклизы в высвобождении окситоцина из нервных клеток

АДФ-рибозилциклиза (**рисунок 3**) катализирует образование циклической АДФ-рибозы (цАДФ-рибоза) и адениндинуклеотидфосфата никотиновой кислоты, выполняющих функцию мобилизаторов кальция из внутриклеточных депо, а также модуляторов активности калиевых ионных каналов М-типа [164].

цАДФ-рибоза синтезируется из NAD^+ бифункциональным ферментом семейства CD38 (**рисунок 4**). И этот же фермент может гидролизовать его до АДФ-рибозы. Катализ осуществляется через ковалентно-связанный интермедиат. Реакция гидролиза ингибируется АТФ и поэтому циклические формы АДФ-рибозы могут накапливаться.

АДФ-рибозилциклиза/НАД-гликогидролаза CD38 – бифункциональный рецептор/энзим – один из аденоzinидифосфат (ADP) рибозилциклиз, принадлежит к семейству мультифункциональных энзимов эриукаритических клеток; катализирующий реакции синтеза АДФ-рибозы и вызывающий его гидролиз: $\text{НАД}(+) + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{АДФ-рибоза} + \text{никотинамид}$. АТФ ингибирует гидролазную активность. Работа АДФ-рибозилциклизы является отражением клеточной активации и вместе с тем, усиливая выброс кальция из эндоплазматического ретикулума, этот вторичный посредник изменяет клеточный гомеостаз, опосредованный, в том числе, кальций-зависимыми протеазами.

Накоплены убедительные данные о том, что АДФ-рибозилциклиза играет ключевую роль в различных физиологических процессах [27–29], включая клеточную пролиферацию, сокращение мускулатуры, регенерацию стволовых клеток, секрецию гормонов [95]. Внеклеточный домен CD38 содержит энзимный участок, трансформирующий NAD^+ и NADP^+ в цАДФ-рибозу, АДФ-рибозу и

NAADP, которые участвуют в мобилизации внутриклеточного кальция. Баланс между реакциями контролируется внеклеточным pH [223].

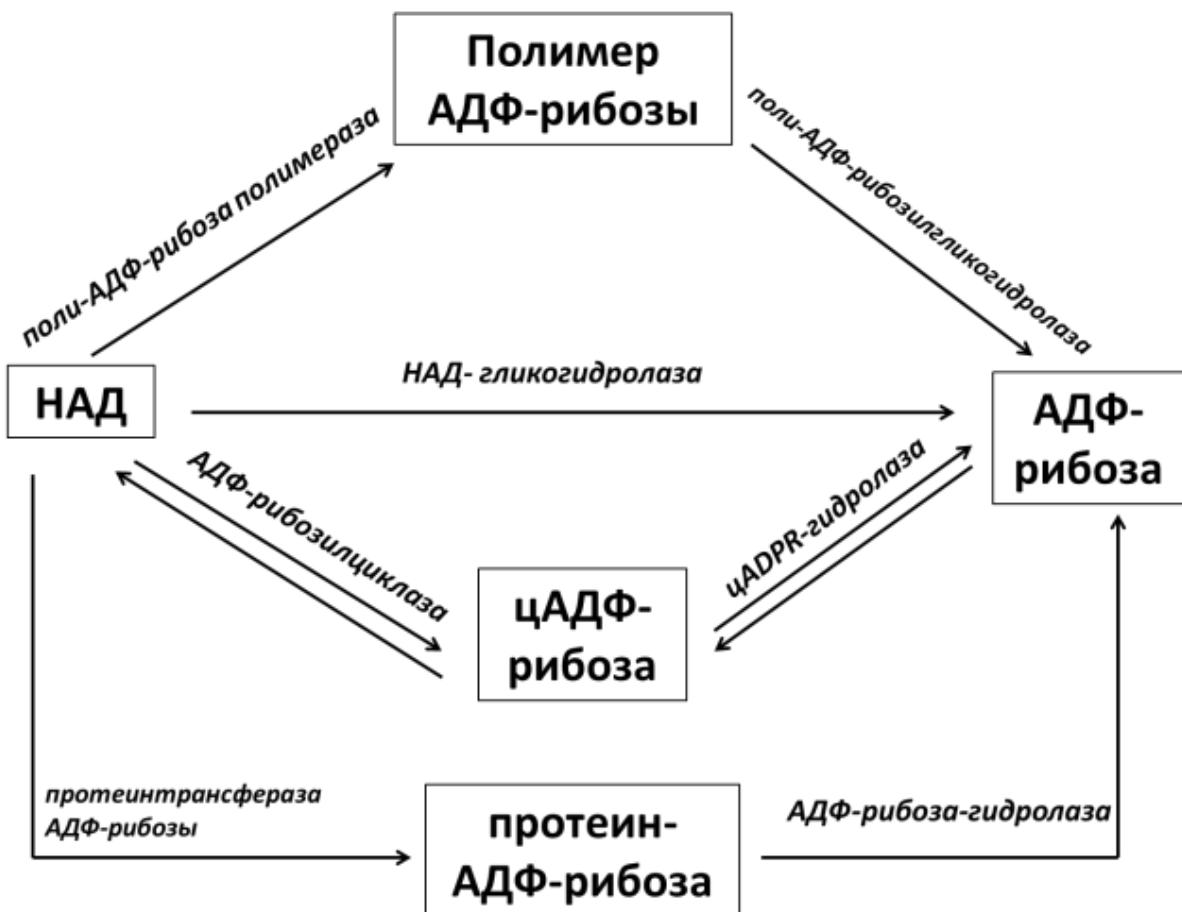


Рисунок 3 Метаболические пути образования и утилизации цАДФ-рибозы.

цАДФ-рибоза - универсальный второй мессенджер, регулирующий уровень Ca^{2+} через независимый путь инозитол-1,4,5-трифосфата (IP3) [176]. АДФ-рибоза активирует мембранный канал TRPM2 (transient receptor potential cation channel member 2), тогда как NAADP мобилизует Ca^{2+} из внутриклеточных кальциевых депо [308].

Лигандирование CD38 осуществляется путем типичного для антигенных рецепторов сигнального каскада, включая фосфорилирование тирозина внутриклеточных сигнальных трансдукторов, ядерных событий и долгосрочных эффектов, зависящих от активного синтеза белков. Как рецептор CD38 взаимодействует с несубстратным лигандом CD31 или с субстратным лигандом,

например, NAD^+ , вызывая мобилизацию Ca^{2+} , клеточную активацию, пролиферацию, дифференцировку и миграцию [95].

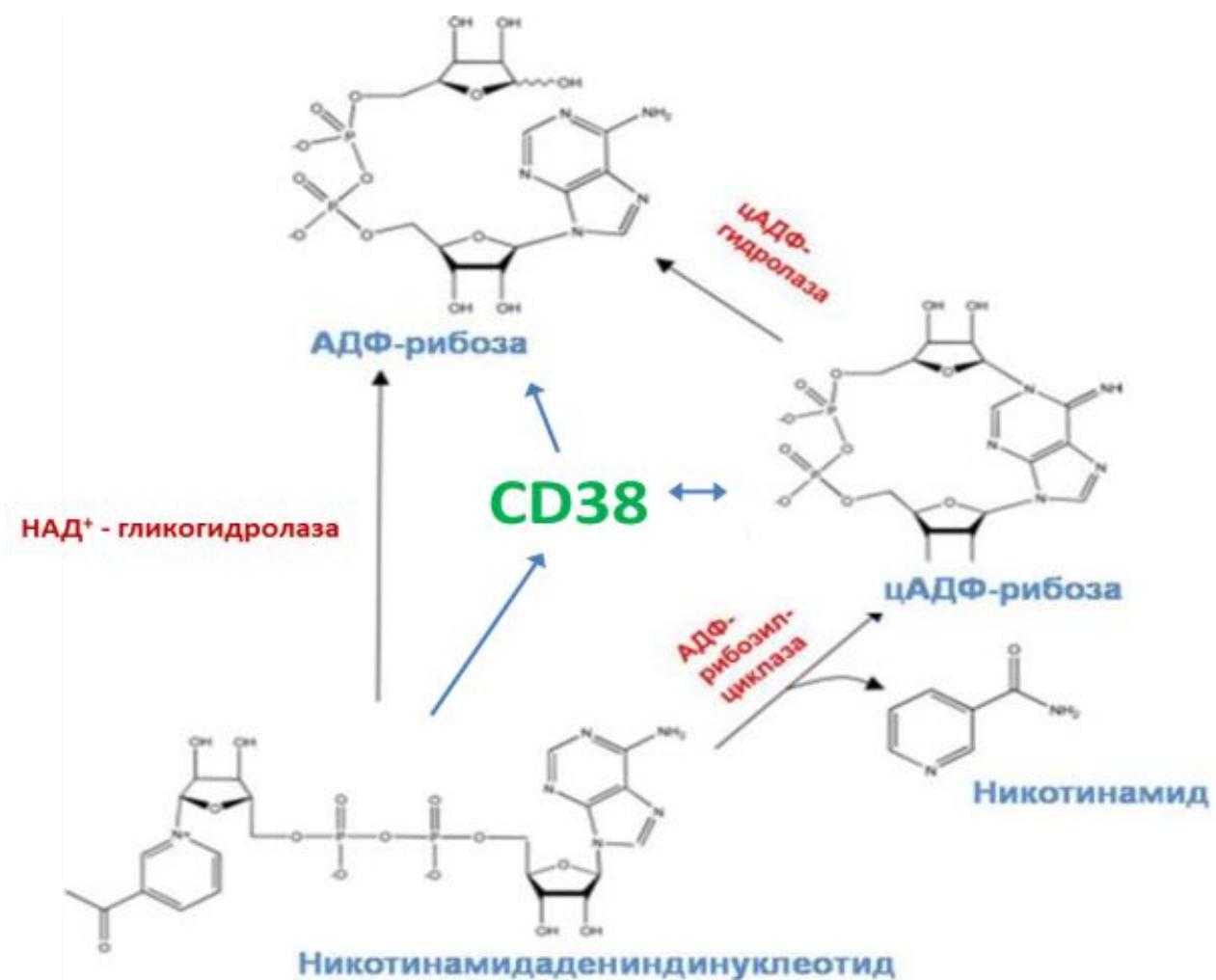


Рисунок 4 Участие CD38 в образовании и гидролизе цАДФ-рибозы.

Циклическая АДФ-рибоза известна как эндогенный регулятор внутриклеточной мобилизации Ca^{2+} во многих тканях организма, включая нервную систему [164, 166, 225]. Внутриклеточная концентрация цАДФ-рибозы регулируется разными путями. Один из таких механизмов, когда АДФ-рибоза образуется в клетках, активированных нейротрансмиттерами, например, при действии ацетилхолина через мускариновые рецепторы или глутамата через метаботропные рецепторы [162, 163], [59, 353].. Активация АДФ-рибозилциклизы/CD38 за счет мобилизации цГМФ – или цАМФ-зависящих протеиновых киназ - была показана у улиток (*Aplysiacalifornica*) [143], в ЛАК-клетках (лимфокин-активированные клетки) [314] и в сосудистых гладкомышечных клетках [59].

Было показано, что центральное высвобождение окситоцина в гипоталамусе зависит от активации CD38 и АДФ-рибозилциклизы и мобилизации внутриклеточного кальция [166] (**рисунок 5**). Активация протеинкиназ, которые путем фосфорилирования АДР-рибозилциклизы, ускоряют образование цАДР-рибозы, и она, в свою очередь, воздействуя на рианодиновые рецепторы в мембране эндоплазматического ретикулума, приводит к выходу Ca^{2+} в цитоплазму и стимулированию многих Ca^{2+} -зависимых внутриклеточных процессов, включая мышечное сокращение, активацию ферментов, экзо- и эндокринной секреции, в частности, высвобождение окситоцина.

1.5 Центральная ауторегуляция ОХТ при реализации социального поведения: молекулярные механизмы

В то время как секреция ОХТ в гипофизе хорошо изучена, механизмы, отвечающие за высвобождение ОХТ в других областях мозга через проекции ОХТ нейронов далеки от полного понимания. Центральное и периферическое высвобождение ОХТ регулируется независимо, но оба связаны с мобилизацией внутриклеточного Ca^{2+} .

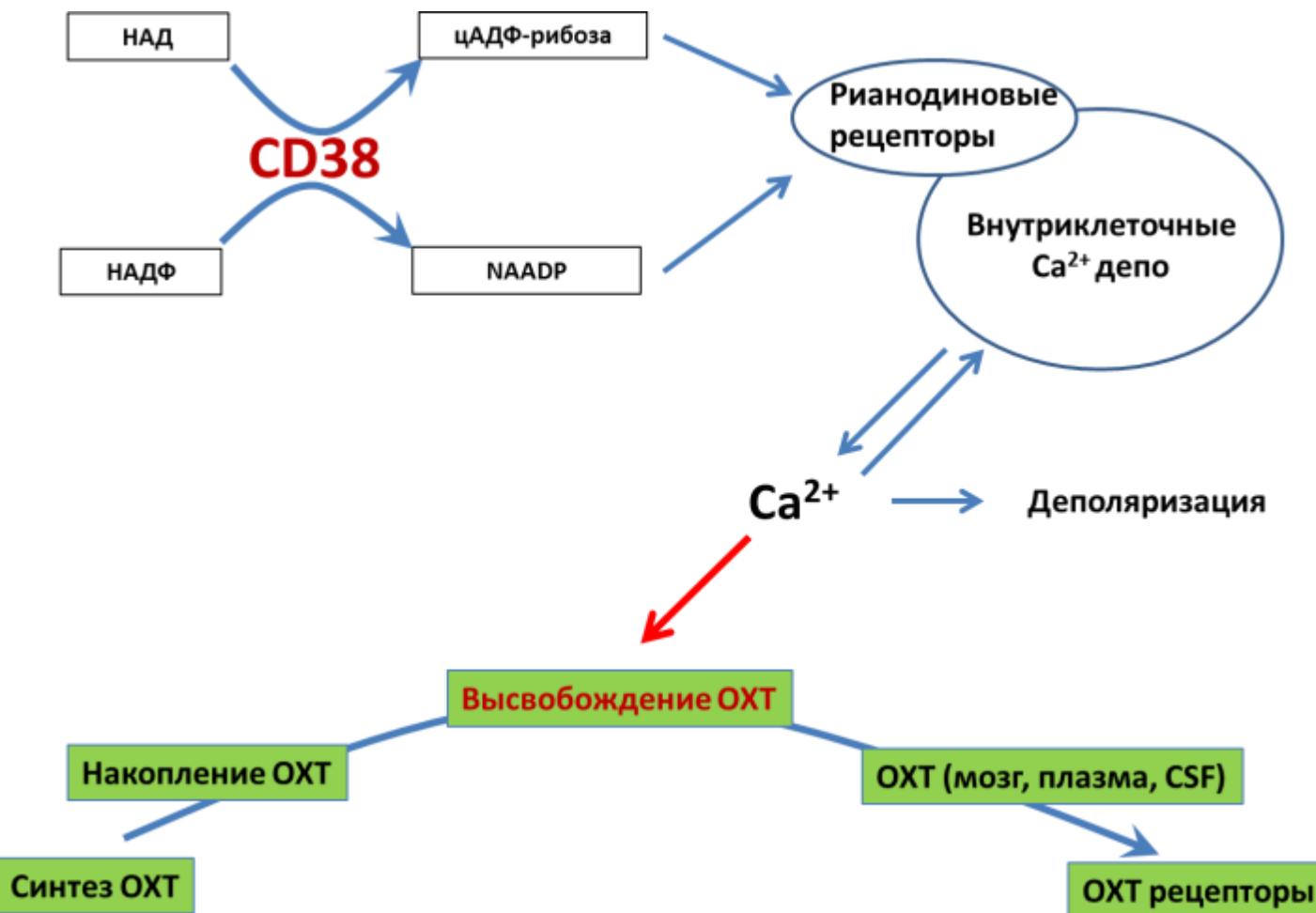


Рисунок 5 Высвобождение окситоцина посредством мобилизации кальция за счет активации CD38/АДФ-рибозилцилазы.

Окситоцин-индуцированное высвобождение окситоцина известно как ауторегуляция окситоцина [266, 267, 284]. В основе механизма положительной обратной связи ауторегуляции окситоцина лежит сомато-дendритное высвобождение окситоцина, связывание его с рецепторами и последующее повышение уровня внутриклеточного кальция [217]. Ауторегуляция окситоцина приводит к оптимизации электрической активности ОХТ нейронов, в основном, за счет внутриклеточных кальциевых депо [91, 245]. Таким образом, нейроны способны самостоятельно контролировать собственную электрическую активность путем соматодендритного высвобождения соответствующих пептидов.

Высвобождаясь из дендритов, нейропептиды оказывают свои эффекты и на значительном удалении от места высвобождения – дистанционно. Наиболее известна ауторегуляция окситоцина, имеющая место во время сокращений матки и лактации (**рисунок 6**) [267, 320]. Периферическая секреция ОХТ из аксонов нейронов вызвана деполяризацией мембраны в ответ на градиент потенциалов, вызванный физиологическими стимулами, такими как стимуляция сосков. Напротив, дендритная секреция ОХТ может не зависеть от деполяризации [247, 326].

Окситоциновые рецепторы, связываясь с G_{q/11} или G_i белками, ведут к продукции IP₃ и DAG через активацию фофолипазы С (PLC) [135], улучшают сигнализацию Ca²⁺ и протеинкиназы С (PKC). Эти PLC- и IP₃-зависящие каскады задействованы и при ауторегуляции окситоцина [217], определяя особенности поведения взрослого организма [329].

ОХТ моделирует широкий спектр социальных взаимодействий именно за счет активации процессов ауторегуляции в головном мозге: материнская и отцовская забота, сексуальное поведение, привязанность. У людей интраназальное введение ОХТ усиливает межличностное доверие, контакт «глаза в глаза», распознавание знакомых лиц, а также возможность понимания эмоций других людей [106, 107, 149, 209, 333]. Безусловно, разная степень экспрессии ОХТ и ОХТ рецепторов лежит в основе различий в проявлении социального поведения между видами, так и между индивидумами внутри вида [183, 184].

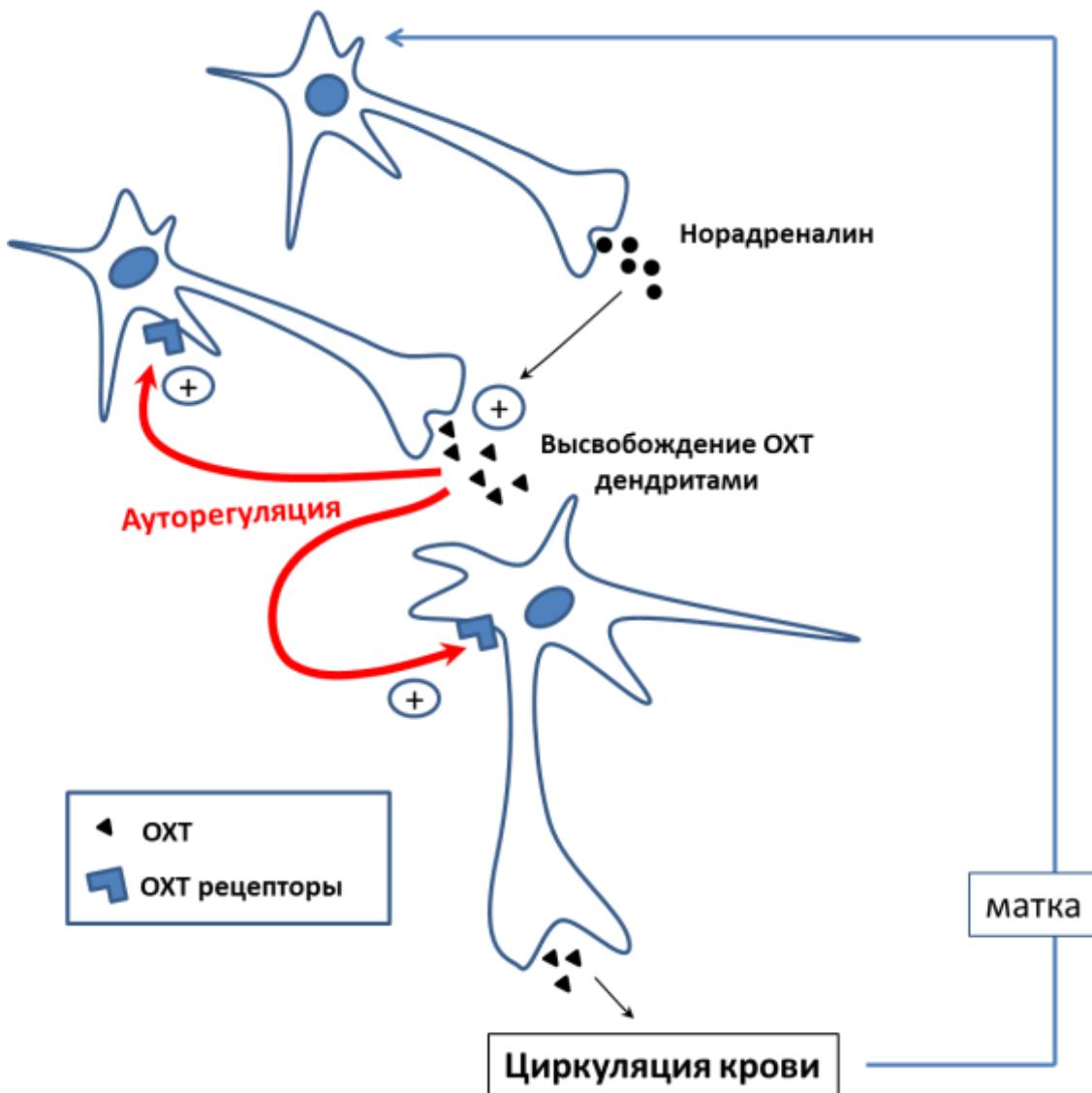


Рисунок 6 Активация механизмов ауторегуляции ОХТ в период родов и лактации [69].

Основные работы на животных моделях доказывают положительный вклад окситоцина на формирование социальных связей, как между индивидумами, так и между родителем и ребенком. Это обусловлено активацией ОХТ рецепторов и молекулярных каскадов ауторегуляции (когда стимуляция рецепторов способствует не только большему высвобождению собственного ОХТ) [230, 231]. Внутрижелудочные инъекции ОХТ вызывают положительные эффекты при реализации материнской заботы у крыс [305, 350], а инъекции антагонистов ОХТ

подавляют проявление родительской заботы [183]. У полевок OXTR в прилежащем ядре (NAcc) участвуют в регуляции спонтанного материнского поведения и формировании предпочтений [92, 301, 392, 410]. Увеличение внеклеточной концентрации OXT в NAcc увеличивает социально-сексуальные взаимодействия самки с самцом [326].

Таким образом, фармакологические и генетические исследования указывают на вовлеченность механизмов ауторегуляции OXT не только на период родов и лактации, но и при реализации разных видов социального поведения, как у животных, так и у человека, независимо от пола.

Было показано, что OXT-опосредованная активность АДФ-рибозилцилазы и увеличение $[Ca^{2+}]_i$ были чувствительны к эффектам модуляции протеинкиназы С и уровня цАДФ-рибозы, как в гипоталамусе, так и в задней доле гипофиза [242]. Результаты, полученные в экспериментах с самцами мышей, подтверждают наличие РКС-цАДФ-рибоза-зависимых механизмов ауторегуляции высвобождения OXT, специфичных не только для особей женского рода, но также и мужского, оказывают влияние на реализацию социального поведения.

Полученные данные демонстрируют, что воспроизводимые стимулирующее и ингибирующее эффекты GTP на активность АДФ-рибозилцилазу в гипоталамусе и гипофизе различны. Введение высоких концентраций OXT приводит к снижению активности АДФ-рибозилцилазы и в тканях гипоталамуса, и в тканях нейрогипофиза. Анализ дозо-зависимого ответа в образовании цАДФ-рибозы в гипоталамусе показывает, что наибольшая чувствительность наблюдалась при инкубации с 100 нМ OXT [242].

Таким образом, положительная обратная связь РКС-цАДФ-рибоза-зависимого высвобождения OXT в гипоталамусе и нейрогипофизе может быть значимой для эффективной молекулярной коррекции дефицита социального поведения наряду с психологическими методиками (**рисунок 7**).

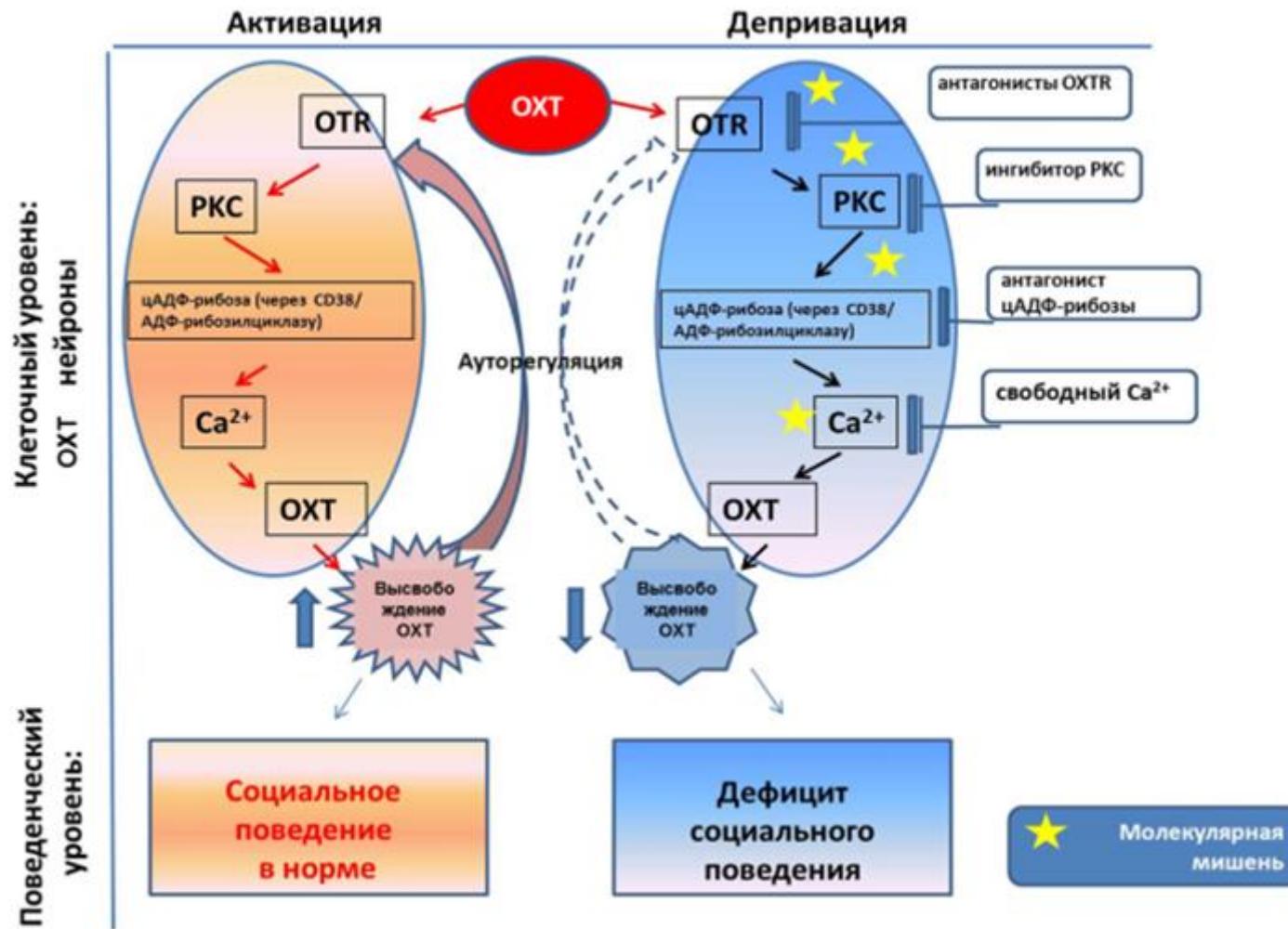


Рисунок 7 Позитивная обратная связь высвобождения ОХТ и сигнализация ОХТ при различных психофизиологических состояниях. ОХТ-окситоцин, ОХТР – окситоциновые рецепторы, РКС – протеинкиназа С.

1.6 Влияние социального опыта на обмен окситоцина

У крыс связывание OXT с OXT рецепторами вызывает биохимические и транскрипционные изменения, проявляющиеся в непосредственных и долгосрочных нейромодуляторных эффектах, связанных с OXT [71]. Ингибирование OXT рецепторов влияет на поведение, сопутствующее лактации [63, 306], повышает тревожность [63] и влияет на проявление материнской заботы [61, 116].

Эксперименты *in vitro* показали, что OXT стимулирует выброс окситоцина в гипоталамусе (паравентрикулярные и супраоптические ядра) [266]. Многие нейрональные ответы OXT важны для конкретных поведенческих или физиологических функций. Определение влияния сигнальных механизмов OXT-опосредованных эффектов высвобождения OXT на клеточный гомеостаз является принципиальным при рассмотрении молекулярных каскадов ауторегуляции в функционировании головного мозга млекопитающих [91, 218]. Поиск механизмов, которые управляют передачей OXT-зависимой био-поведенческой обратной связью, показал, что социальный опыт может модулировать пластичность головного мозга [182], а также синтез и сигнализацию OXT, как через поведенческие и молекулярные механизмы, так и на генетическом уровне [126, 265]. Одной из составляющих социального опыта [1] является репродуктивный опыт (включая беременность и роды) (**рисунок 8**).

Репродуктивный опыт является важным фактором для формирования материнского поведения, а дополнительный опыт в воспитании потомства - индуцирует положительное родительское поведение [297].

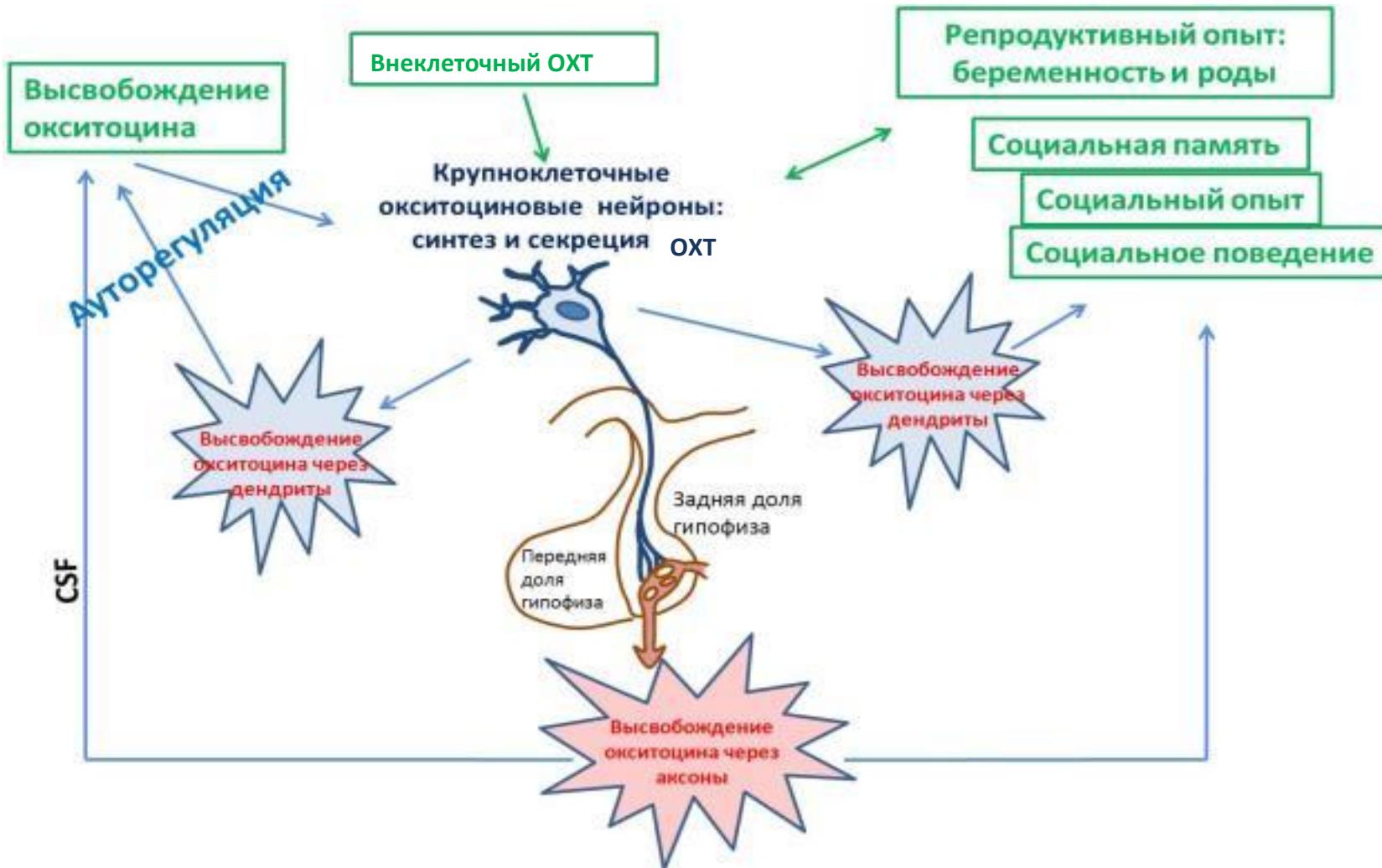


Рисунок 8 Положительная обратная связь социального опыта и социального поведения с ауторегуляцией окситоцина (ОХТ).

Поскольку репродуктивный опыт моделирует поведенческие (родительское поведение), гормональные и нейрональные изменения у матери [304], было рассмотрено влияние родительского опыта на поведение у *Cd38^{+/+}* и *Cd38^{-/-}* мышей обоих полов, и доказано влияние родительского опыта на позитивную обратную связь механизмов ауторегуляции окситоцина, что имеет большое значение в понимании формирования родительского поведения, как у животных, так и у человека (рисунок 9) [243]. Важно отметить, что животные модели являются хорошим исследовательским инструментом для изучения нейробиологических механизмов, регулирующих когнитивные процессы, приводящие к развитию социальных отношений, и для расширения понимания человеческих состояний.

Окситоцин вовлечен в каждый из этих процессов. В частности, этот пептид способствует формированию социальной принадлежности и родительского поведения, что существенно для социального распознавания у грызунов, взаимодействии матери и ребенка у овец, созданию моногамных связей у полевок.

Конвергенции данных, полученных в исследованиях на животных, делает ОХТ рецепторы и CD38/АДФ-рибозилцилаза-опосредованные механизмы секреции ОХТ привлекательными кандидатами на роль модуляторов человеческих социальных взаимодействий, а также потенциальными терапевтическими мишенями для лечения психических расстройств, связанных с нарушениями в социальном поведении (включая аутизм) и дефицитом в формировании положительной обратной связи между родителем и ребенком.



Рисунок 9 Положительная обратная связь родительского поведения с социальным (родительским) опытом.

1.7 TRPM2, цАДФ-рибоза и осциляции внутриклеточного кальция в сигнализации окситоцина в клетках нейрональной природы

Как уже было упомянуто ранее, циклическая АДФ-рибоза является продуктом активности АДФ-рибозилциклизы и трансмембранных CD38 и действует, в основном, как внутриклеточный вторичный мессенджер в нервной системе [166, 222]. Известно, что действие цАДФ-рибозы стимулирует внутриклеточные рианодиновые рецепторы путем интернализации CD38 в фибробластах и астроцитах [70, 376]. Однако, данные о функциональной роли цАДФ-рибозы в нейронах немногочисленны.

Меластатин-связанный канал транзиторного рецепторного потенциала 2 (TRPM2, ранее названный TRPC7 или LTRPC2) обладает активностью гидролазы АДФ-рибозилциклизы, является Ca^{2+} -проницаемым ионным катионным каналом и может быть активирован с помощью β -НАД⁺, АДФ-рибозилциклизы и цАДФ-рибозы [181, 308]. Ген TRPM2 человека локализован в хромосоме 21q22.3, состоит из 32 экзонов (~90 kb [279]). Ген TRPM2 мыши содержит 34 экзона и охватывает около 61 kb [374]. Транскрипт TRPM2 человека ~ 6,5 и кодирует белок 1503 аминокислоты (1507 у мыши и крысы). Вычисленная молекулярная масса ~ 170 кДа [192]. Белковая структура TRPM2 включает шесть трансмембранных сегментов (S1-S6), фиксированных внутриклеточными N- и C-концами, с доменом образования пор, расположенным между S5 и S6 [280, 308]. Кроме того, N-конец TRPM2 имеет четыре гомологичных домена и IQ-подобный мотив связывания кальмодулина (CaM), который играет роль в модуляции активации канала [125, 331]. TRPM2 N- и C-концы обращены к цитозолю. Цитозольная ADPR связывается с областью TRPM2 NUDT9-H и открывает канал для притока кальция (Ca^{2+}) и натрия (Na^+). ADPR гидролизуется до рибозы 5-фосфата и монофосфата аденоцина (AMP) под действием ферментативной активности TRPM2 NUDT9-H. TRPM2-связывание с ADPR облегчается за счет перекиси водорода (H_2O_2), цАДФ-рибозы и Ca^{2+} . AMP действует как отрицательный регулятор открытия TRPM2 по ADPR, а 8-Br-cADPR ингибирует cADPR- и H_2O_2 -опосредованные эффекты [359].

Активация TRPM2 цАДФ-рибозой начинается при температуре тела ($>35^\circ\text{C}$) и участвует в секреции инсулина в панкреатических β -клетках [370]. Интересно, что H_2O_2 -опосредованное увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ через активацию TRPM2 отрицательно сказывается при проведении экспериментов при комнатной температуре и восстанавливается при 37°C [159, 391]. Кроме того, было показано, что температуры $> 35^\circ\text{C}$ могут активировать каналы TRPM2 или облегчать их активацию через АДФ-рибозу или цАДФ-рибозу в клетках крысины инсулиномы RIN-5F клетках [370]. Однако, механизмы, участвующие в температурно-зависимых регуляциях TRPM2, нуждаются в более детальном изучении.

Предполагается, что каналы TRPM2 могут соединяться с рецепторами, функционирующими через активацию цАДФ-рибозы [55, 162]. Однако, поскольку было очень мало сообщений об активации АДФ-рибозилциклизы рецепторами, за исключением мускариновых, ангиотензиновых и брадикининовых [98, 165], остается открытым вопрос об активации TRPM2 посредством цАДФ-рибозы при сигнализации рецепторов к окситоцину.

Концентрации цАДФ-рибозы и NAADP, необходимые для активации TRPM2, являются высокими по сравнению с физиологической концентрацией этих нуклеотидов. Однако эти нуклеотиды могут действовать синергично с цАДФ-рибозой и повышать чувствительность TRPM2 при гораздо меньших дозах. Связаны ли они напрямую с доменом Nudix или с различными кооперативными сайтами, или преобразуются в АДФ-рибозу, до конца не ясно. Тем не менее, многочисленные данные позволяют предполагать, что активация TRPM2 связана с путями, которые включают в себя генерацию этих нуклеотидов. Внеклеточный НАД⁺ может быть преобразован в АДФ-рибозу (ADPR), цАДФ-рибозу (cADPR) и NAADP с помощью CD38 и CD157. Внеклеточная АДФ-рибоза может затем связываться с рецепторами плазматической мембраны (например, P2Y-рецепторами) и увеличивать $[Ca^{2+}]_i$ через высвобождение Ca^{2+} из кальциевых депо посредством активации G-белков и PLC с последующим образованием IP3. H_2O_2 также может преодолевать плазматическую мембрану и мобилизовать АДФ-рибозу из митохондрий (как H_2O_2 , так и цАДФ-рибоза могут действовать синергично с АДФ-рибозой для активации TRPM2). АДФ-рибоза также генерируется из поли-АДФ-рибозы при повреждении ДНК, вызванном свободными радикалами (ROS), посредством активации пути PARP-1/PARG. Свободная цитозольная АДФ-рибоза будет действовать на NUDT9-H каналов липосомной и плазматической мембраны TRPM2, обеспечивая приток Ca^{2+} через плазматическую мембрану и/или высвобождение лизосомального Ca^{2+} , повышая концентрацию Ca^{2+} в цитозоле. Перегрузка Ca^{2+} может вызвать запрограммированную гибель клеток (апоптоз) и, возможно, некроз [3]. Наконец, внеклеточные сигналы, которые еще предстоит идентифицировать, могут

потенциально индуцировать образование внутриклеточной свободной АДФ-рибозы, которая может затем блокировать каналы TRPM2 в лизосоме и/или плазматической мембране и регулировать опосредуемую рецептором передачу сигналов [359].

С момента открытия TRPM2 было много важных результатов, которые вносили понимание в структуру белка и механизмы, регулирующие активность этого канала, включая экспрессию генов и его клеточную локализацию и функции. Этот канал обнаружил много интересных особенностей, которые делают его одним из самых универсальных и интригующих ионных каналов. Будущие эксперименты будут сосредоточены на механизмах, которые регулируют TRPM2. Обилие клеток, включая клетки нейрональной природы, в которых обнаружен TRPM2, и высокоинтеграционный характер этого канала позволяет предполагать обнаружение дополнительных клеточных регуляторных факторов. Дальнейшие исследования будут сосредоточены на сигнальных путях с позитивной регуляцией TRPM2, чтобы определить клеточные механизмы, которые мобилизуют АДФ-рибозу при физиологических и патологических состояний в ЦНС и в периферических тканях.

1.8 CD157/BST-1 - гомолога бифункционального рецептора-энзима CD38/АДФ-рибозилциклизы - во внутриклеточной сигнализации

В соответствии с нашим интересом относительно роли CD38 в регуляции социального поведения, мы обратили внимание на гомолог CD38, антиген стромальных клеток костного мозга - 1 (BST-1). BST-1 был впервые изолирован из клеточной линии стромальных клеток костного мозга [195], и ген *BST1* идентифицирован путем генного клонирования как *CD157* [189]. CD157/BST-1 вместе с CD38 принадлежат семейству NADаза/АДФ-рибозилциклизы, катализируя превращение NAD^+ и NADP^+ в цАДФ и адениндинофосфат никотиновой кислоты [96, 123, 151, 170, 187, 190, 222, 223, 225, 251, 312, 402].

CD157/BST-1 проявляет такой же дуализм в свойствах, как и CD38, в частности, рецепторную и ферментную активности в лейкоцитах и овариальных раковых клетках [269, 270], стромальных клетках костного мозга [187], миелоидных клетках [189]; [275]; [300], нейтрофилах и гемопоэтических стволовых клетках [132, 187, 251, 272, 309] (рисунок 10).

Интересно, что несмотря на важную роль CD157 в иммунной системе [240]; [343], ген *CD157/BST1* был идентифицирован как риск-фактор нейродегенерации, в частности, при болезни Паркинсона (БП), и как по меньшей мере, является «ответственным» за развитие одного из симптомов БП [82, 84, 85, 236, 263, 328, 332, 339, 346, 366, 381, 419, 421].

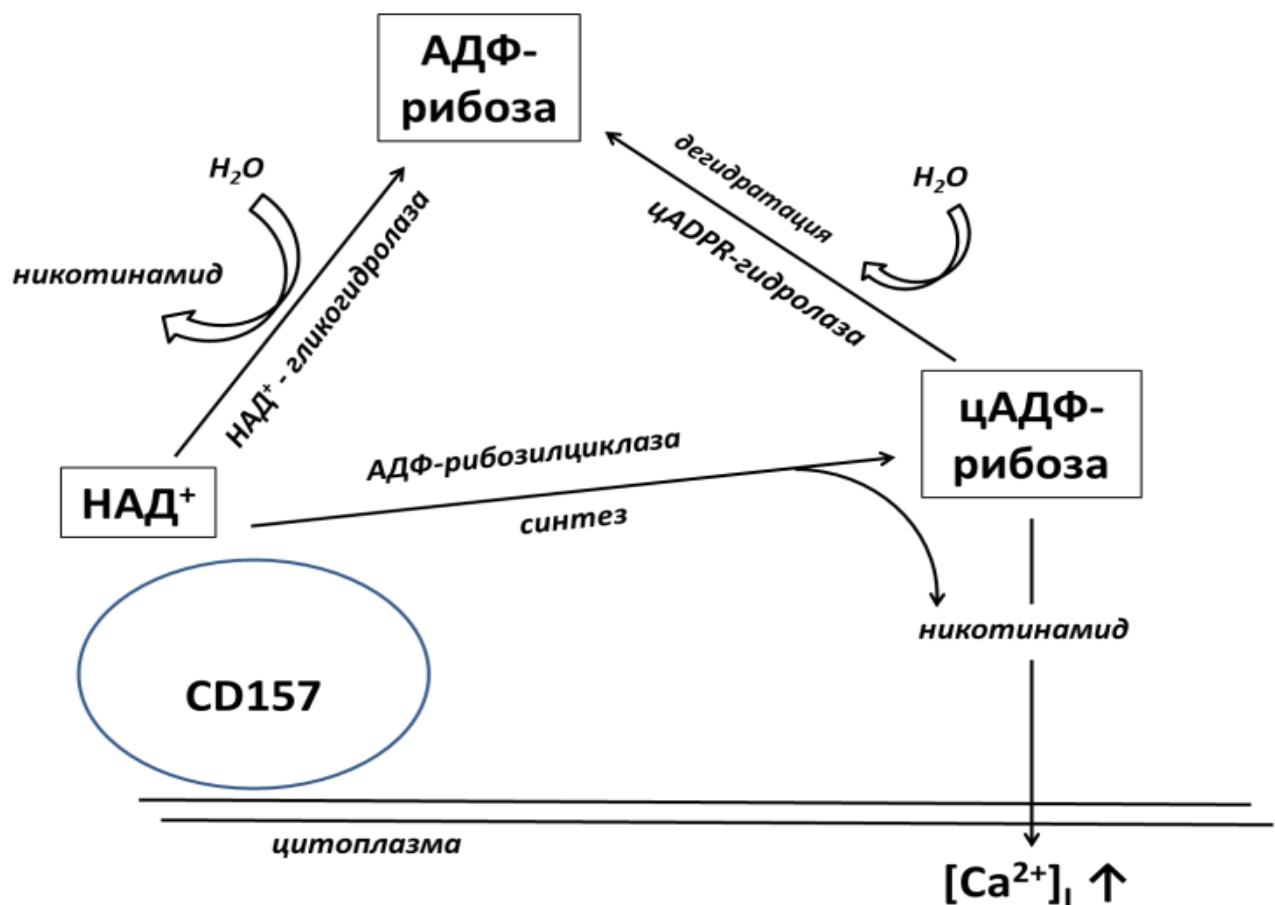


Рисунок 10 Каталитические свойства CD157.

Также новая роль CD157 была обнаружена в стволовых клетках: CD157 индуцирует образование цАДФР в клетках Панета, которые способствуют самообновлению стволовых клеток в кишечнике у мышей, находящихся на

низкокалорийной диете [405]. Кроме того, CD157 отвечает за пролиферацию стволовых и прогениторных клеток в легких [401]. Однако мало известно о роли CD157 в функционировании головного мозга при хронической нейродегенерации.

Недавно было обнаружено, что ген *CD157/BST1* ассоциирован и с другими заболеваниями, включая расстройства аутистического спектра (ПАС) [80, 408], что спровоцировало наш интерес в отношении животных с делецией гена *CD157/BST1* для оценки возможности использования *Cd157^{+/−}* мышей как модели ПАС или аутистически-подобного поведения с социальным дефицитом в отсутствие моторных дисфункций, особенно в раннем периоде развития (так как ранее это не было показано у *Cd157^{+/−}* мышей).

Социальное взаимодействие и общение – наиболее уязвимый поведенческий признак у детей с ПАС [102, 114]. Коммуникативные навыки формируются в раннем периоде жизни и требуют использования языка как основного инструмента при двухсторонней передаче информации [124, 213]. В то же время мыши – социальные животные с собственной системой коммуникации [124] с ультразвуковой вокализацией (USV) в различных контекстах [134, 201, 255, 290, 397]. USV мышей представляет собой целый комплекс с различными качественными (форма, частота, продолжительность, интенсивность звуков и т.д.) и количественными (количество производимых USV) [216, 334, 335] характеристиками; что, конечно, не является человеческим языком. Анализ USV у мышей был использован при изучении заболеваний развития на экспериментальных мышиных моделях, включая ПАС [360, 396]. В соответствии с разработанными протоколами исследования животных с экспериментальной моделью ПАС [94, 201, 398], анализ поведения в раннем постнатальном периоде вместе с регистрацией USV является достоверным методом оценки ранней задержки развития, и возможность фармакологической коррекции критична в долгосрочной перспективе развития заболевания. Формирование и поддержание социальных связей – сложный процесс [4], который включает в себя несколько уровней обработки информации в головном мозге [14]. Использование экспериментальных животных позволяет сосредоточиться на одном уровне

обработки за один раз и является необходимым приемом для понимания нейробиологии социальных взаимоотношений.

Таким образом, эксперименты, описанные в данной работе, направлены на: выявление эффектов делеции гена *CD157* на РАС-ассоциированные коммуникативные особенности - общий дефицит или задержка развития; оценку социального контекста на продуцирование USV; применение фармакологической коррекции при нарушении коммуникации аутистического типа; выявление новых молекул-мишеней для регуляции обмена окситоцина; исследование процессов CD38-, цАДФ-рибоза-, *CD157*-, TRPM2-опосредованной сигнализации окситоцина и процессов нейродегенерации в головном мозге с возможностью ее модуляции через активацию процессов ауторегуляции ОХТ.

Настоящее исследование имеет своей целью идентификацию механизмов патогенеза хронической нейроденегенерации и нарушений развития головного мозга, ассоциированных с изменением социального поведения и других интегративных функций мозга.

ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования в рамках диссертационной работы выполнены на базе НИИ молекулярной медицины и патобиохимии ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России (руководитель НИИ – проф. А.Б. Салмина, ректор университета – проф. И. П. Артюхов), Исследовательской лаборатории Центра изучения развития детей Университета г. Канадзава (Япония, руководитель – проф. Х.Хигашида), располагающими всем необходимым оборудованием для выполнения работы.

Степень достоверности полученных результатов. Все научные положения и выводы обоснованы благодаря: а) системному анализу поставленной проблемы, б) использованию современных методов нейробиологии и нейрохимии; в) должной выборке экспериментальных животных в соответствии с обозначенными задачам; г) достаточному количеству полученных экспериментальных данных; д) применению соответствующих методов статистического анализа.

Качество исследований обеспечивалось путем планирования, выполнения экспериментов и контроля полученных данных. **Планирование экспериментов** осуществлялось в соответствии с мировыми тенденциями в данной области исследований и использованием современных и релевантных экспериментальных подходов и методов. **Выполнение экспериментов** осуществлялось по описанным или оригинальным протоколам в соответствие с дизайном исследования с использованием методов рандомизации при формировании экспериментальных групп. **Контроль полученных данных** заключался в обнаружении и отслеживании случайных и систематических ошибок, которые могли исказить результат исследований; применении слепого метода оценки при анализе коллекций данных.

2.1 Объекты исследования

Объектами исследования являлись экспериментальные животные (**рисунок 11, 12**) и культуры клеток различных линий (**рисунок 13**).

Животные содержались в хорошо вентилируемом, освещенном, отапливаемом помещении со своевременной уборкой, при 12-часовом световом цикле, не более пяти в одной клетке со свободным доступом к пище и воде. Размер клетки: 300 мм × 160 мм × 110 мм. Подстил - опилки.

Гнездящиеся пары содержались отдельно (1 пара в клетке). На 21 день постнатального периода (PND) потомство отделяли от родителей и рассаживали по гендерному признаку. В эксперименте участвовали детеныши с PND 3,7,10 и взрослые особи (возраст – 8-12 недель).

Эксперименты на животных были одобрены Биоэтической комиссией и Локальным этическим комитетом ГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого (№ 70/2016 от 06.06.2016 г.) и проводились согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. N755), национальному стандарту Российской Федерации ГОСТ Р53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (Минздравсоцразвития России) от 23 августа 2010 г. N708н г. Москва "Об утверждении Правил лабораторной практики", в соответствии с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директиве Европейского сообщества (2010/63/ЕС).

Все эксперименты на животных были проведены в соответствии с Основными руководящими принципами для надлежащего проведения эксперимента на животных и соответствующей деятельности в научно-исследовательских учреждениях, находящихся под юрисдикцией Министерства образования, культуры, спорта, науки и техники Японии, и были утверждены Комитетом по экспериментам на животных Университета г. Канадзава.

IN VIVO - часть I

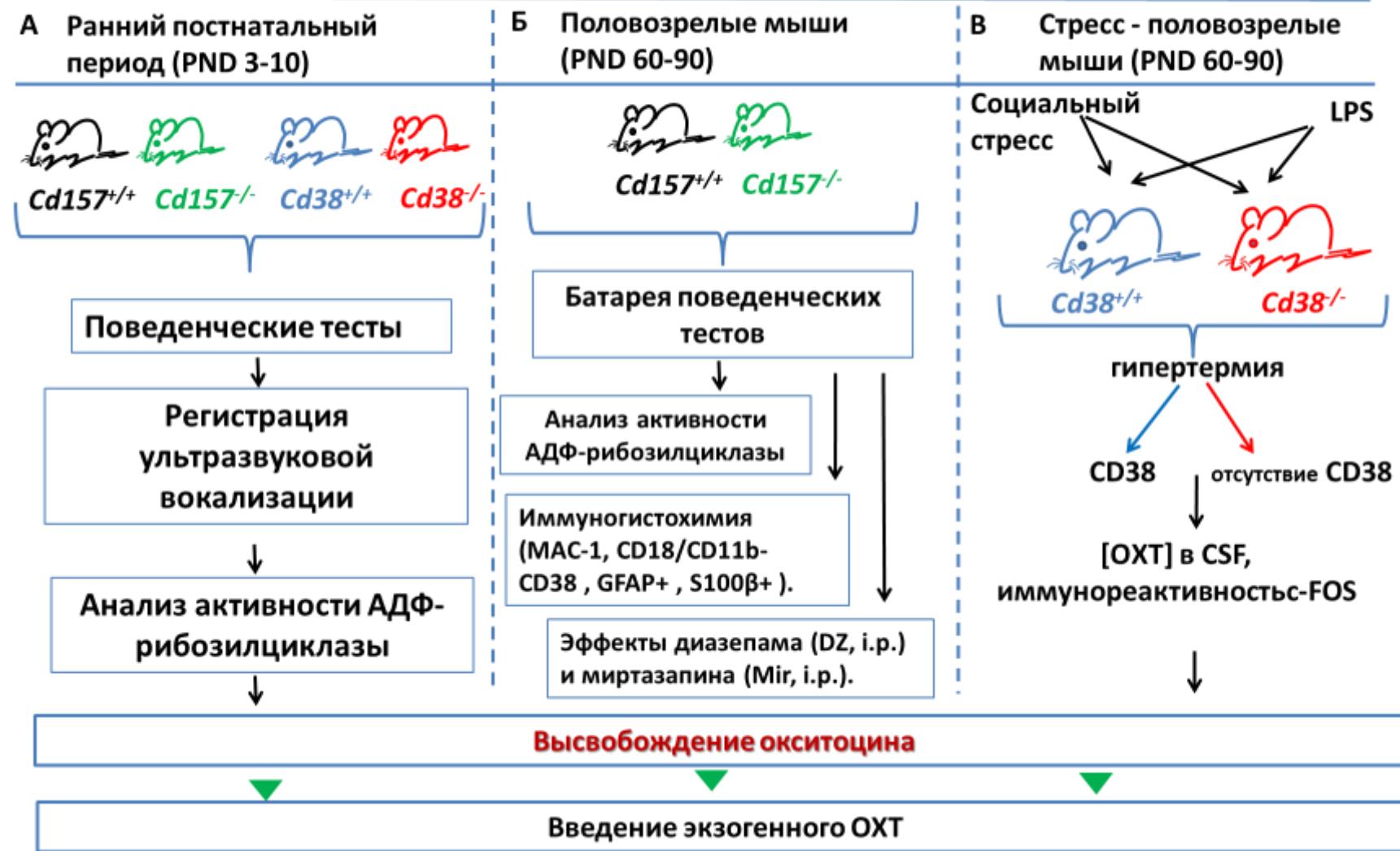


Рисунок 11 Дизайн блока исследовательской работы – *IN VIVO* - часть I.

IN VIVO - часть II

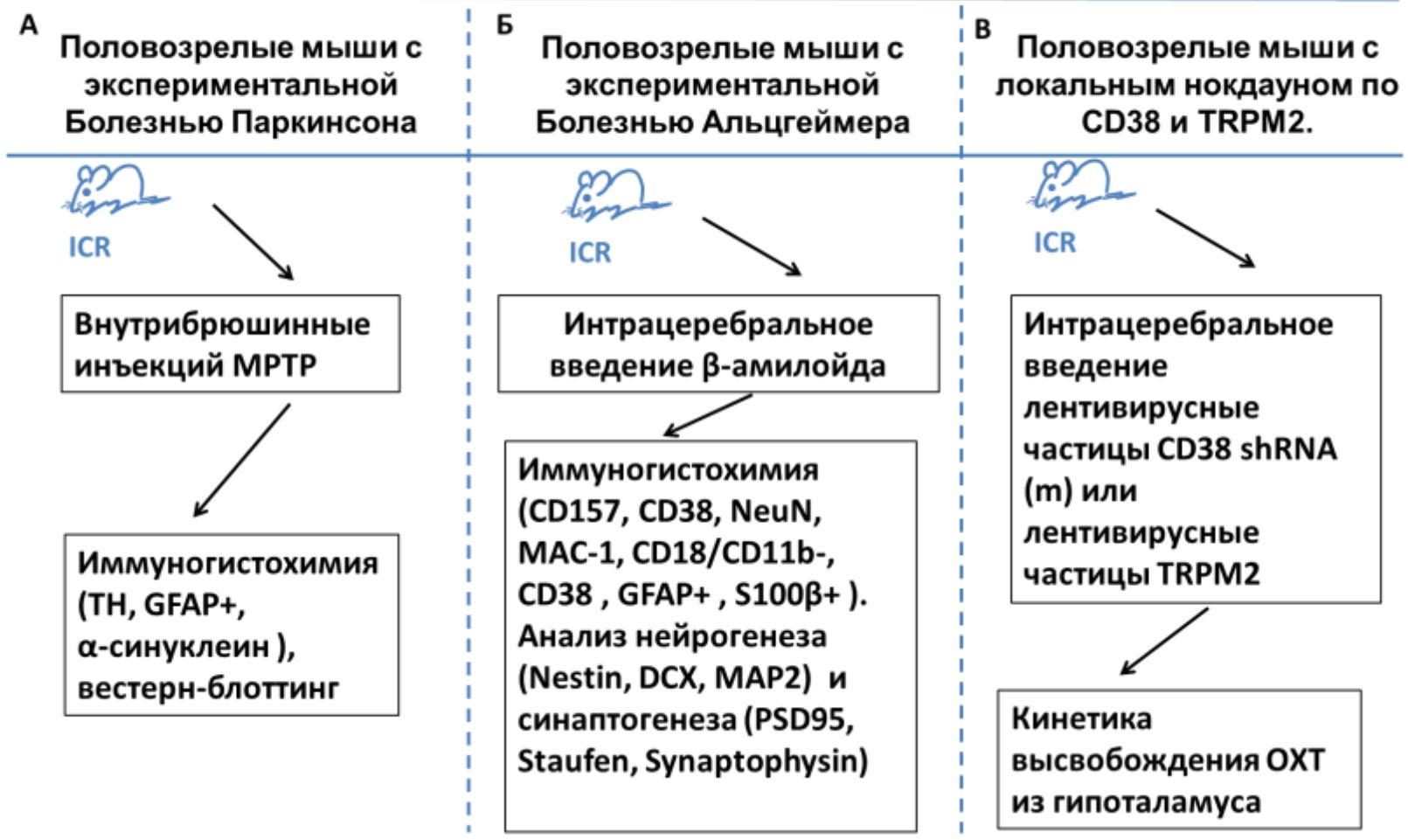


Рисунок 12 Дизайн блока исследовательской работы – *IN VIVO* - часть II.

IN VITRO

А Клетки NG108-15

Активность АДФ-рибозилциклизы

Осцилляции внутриклеточного
кальция при апликациях
модуляторов молекулярных
каскадов (цАДФ-рибоза, 2-АВР,
 β -NAD⁺, 8-бromo-цАДФ-рибоза).

Б Клетки НЕК293

Трансфекция НЕК-клеток
векторами генов *Cd157/BST-1*
или *Cd38* мыши.

Вестерн-блоттинг

Рисунок 13 Дизайн блока исследовательской работы – *IN VITRO*.

При планировании и проведении экспериментов на животных соблюдены «принципы 3R»: **Replacement** - использование альтернативных методов (культуры клеток); **Reduction** - минимизация количества животных в эксперименте; **Refinement** - минимизация факторов безосновательного стрессирования (боль, дискомфорт и др.) животных до, во время и после проведения испытания.

2.1.1 Мыши, дефицитные по гену *Cd38* (*Cd38*^{-/-})

Cd38^{-/-} - экспериментальная группа мышей (генетический фон - линия ICR). *Cd38*^{+/+} - контрольная группа - мыши дикого типа линии ICR.

Создание линии *Cd38*^{-/-}-мышей [198]: ТТ2 эмбриональные стволовые клетки трансфицировали с *Not*-I-cleaved *pCD38-loxP-DTA*. G418-резистентные клони анализировали с помощью Саузерн-блоттинга с зондом 1. Таргетные стволовые клетки вводили в 8-клеточные эмбрионы мышей ICR для производства зародышевой линии химер. Cre-содержащий плазмид (pBS185; Life Technologies) был микроинъектирован (2 мкг/мл) в мужской пронуклеус проникшего в яйцо спермия, полученного в результате скрещивания между мужским химером и (C57BL/6J × DBA) F₁ самки. Некоторые из новорожденных мышей (F1) несли удаленный аллель (5.3-kbp *Bam*HI-*Bam*HI фрагмент), что свидетельствует о потери CD38 экзоны 1 и NEO кассеты. Мыши, несущие мутации в гетерозиготном состоянии (*Cd38*^{+/+}) были скрещены между собой для производства гомозиготных мутантов (*Cd38*^{-/-}). Для ПЦР анализа использовали следующие последовательности праймеров CD38 cDNA:

5'-ACAGACCTGGCTGCCGCCTCCCTAG-3' (прямой)

5'-GGGGCGTAGTCTTCTTGTGATGT-3' (комплементарный).

2.1.2 Мыши, дефицитные по *Cd157/Bst1* (*Cd157*^{-/-}).

Cd157^{-/-} - экспериментальная группа мышей (генетический фон - линия C57BL/6).

Cd157^{+/+} - контрольная группа - мыши дикого типа линии C57BL/6.

Создание линии *Cd157*^{-/-} [190]: клоны геномной ДНК мыши выделяли путем скрининга геномной ДНК библиотеки, полученной из линии мышей 129/SV (Stratagene, San Diego, CA). Таргетный вектор готовили путем замены KpnI-SalI-фрагмента, содержащего экзоны с pMC1neo poly в направлении, противоположном ориентации транскрипции. *Cla*-I-линеаризированный таргетный вектор подвергали электропорации в E14.1 эмбриональные стволовые клетки. G418- и ганцикловир-резистентные клоны отбирали и скринировали с помощью ПЦР с праймером, соответствующим 5'-прямой последовательности направленного вектора (5'-TCCCTTGACAAGGAAGCCCCACTGAGTAGC-3') и праймера, комплементарного последовательности neo гена (5'-GAGGGATCGGCAATAAAAGACAGAATAAAAC -3'). Гомологичные рекомбинации подвергали Саузерн-блоттингу. Геномную ДНК из индивидуально выбранных клонов расщепляли с *Hind*-III и гибридизировали с 5'-фланкирующим зондом. Фрагмент ДНК ограниченный 6,4 кб соответствует дикому аллелю, в то время как 4,8-кб фрагмент - результат целенаправленного аллеля. Пять клонов, содержащих оба аллеля были выделены из 453 колоний, устойчивых к G418 и ганцикловиру. Таргетные ES клоны затем вводили в C57BL/6 (B6) бластоциты. Химерное потомство, полученное от одного клона, передавало мутации потомству, и было скрещено с B6 самками. Мыши, несущие мутации в гетерозиготном состоянии (*BST-1*^{+/+}), были скрещены между собой для производства гомозиготных мутантов (*BST-1*^{-/-}).

CD157^{+/+} мыши были получены путем обратного скрещивания *Cd157*^{-/-} мышей с C57BL/6 мышами. Потомство было генотипировано по описанному ранее протоколу [190].

2.1.3 Фармакологические модели болезни Паркинсона (БП).

Модель мышевой БП была создана путем внутрибрюшинных инъекций 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МРТР) (Sigma, St Louis, MO, USA, 20 мг/кг веса) 4 раза с 2 часовым интервалом [214]. Иммуногистохимический и биологический анализ проводили через 4 дня после инъекции МРТР. Вкратце, мозг разрезали на сечки толщиной 10 мкм с использованием криостата. Секции блокировали в PBS, содержащем 0,3% TritonX-100 и 3% BSA, в течение 1 ч при комнатной температуре и инкубировали при 4°C в течение ночи с использованием первичного анти-тирозингидроксилазы (TH) (Sigma; 1:1000) и анти-GFAP антителами (Millipore, Billerica, MA, USA, 1:500). Затем срезы промывали в 0,3% TritonX-100 в PBS и инкубировали с Alexa Fluor 488 (Invitrogen Molecular Probes, 1:200) и Cy3-labeled-IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA, 1: 100) в течение 1 ч при комнатной температуре. Изображение было выполнено с помощью конфокального микроскопа Nikon EZ-C1 (Токио, Япония). TH+ нейронные клетки в компактной области черной субстанции (SNpc) подсчитывали в двух репрезентативных срезах (Брегма -3,16 и -3,64 мм), как описано ранее [364].

Для вестерн-блоттинга образцы из полосатого тела головного мозга солюбилизировали в буфере, содержащем 1% NP40, 0,1% SDS и 0,2% дезоксихолата, и подвергали вестерн-блоттингу со следующими антителами: TH (Sigma), α-синуклеин (Santa Cruz), GFAP (Millipore) и β-актин (Sigma). Первичное связывание антител визуализировали с использованием системы ECL (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ, USA). Количественную оценку каждой полосы проводили с использованием Image J (версия 1.42, Wayne Rasband, National Institutes of Health, MD, USA).

2.1.4 Мыши с экспериментальной нейродегенерацией (болезнь Альцгеймера)

Экспериментальную нейродегенерацию альцгеймеровского типа (болезнь Альцгеймера, БА) индуцировали путем введения β -амилоида 1-42 (Sigma-Aldrich, USA) в CA1 зону гиппокампа (стереотаксические координаты $ML \pm 2,2$ мм, в AP – 3,2 мм, в DV – 2,5 мм) в соответствии с протоколом (Li et al., 2011). Миорелаксацию осуществляли с помощью ксилазина (1 мл/кг веса), анестезию – с помощью хлоргидрата (100-120 мг/кг веса, Sigma-Aldrich, USA). Мышей использовали через 3-4 недели после введения β -амилоида и развития нейродегенерации. Отложение амилоида в тканях головного мозга подтверждали окраской Тиофлавином S с наблюдением флуоресцирующих амилоидных бляшек зеленого цвета.

В качестве контрольной группы использовали ложно-оперированных животных, которым вместо β -амилоида вводили физиологический раствор в том же объеме.

2.1.5 Мыши с локальным нокаутом по CD38 и TRPM2

Для получения мышей с локальным нокаутом по CD38 и TRPM2 животных анестезировали хлоргидратом (100-120 мг/кг веса, Sigma-Aldrich, USA), покрывали хлопчатобумажной тканью для поддержания нормальной температуры тела на операционном столике при 25°C и фиксировали в стереотаксическом аппарате (Narishige Instrument Inc., Токио, Япония). Стереотаксические координаты определялись из стандартного атласа мозга мыши [128] для третьего желудочка: LR - 0 мм, AP - 0,7 мм, DV - 4,2 мм от брегмы. Затем $1,0 \times 10^6$ инфекционных единиц вируса (IFU), содержащих CD38 shRNA (m) лентивирусные частицы (sc-37246-v, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) или лентивирусные частицы TRPM2 shRNA (m) (SC -42675-v, Santa Cruz

Biotechnology Inc.), растворяли в 200 мкл модифицированной по Дульбекко среде с 25 мМ HEPES, pH 7,3. Раствор shRNA (5 мкл) микроинъецировали в третий желудочек со скоростью перфузии 0,2 мкл/мин в течение 25 мин с автоматическим инжектором, и иглу оставляли на 10 мин до ее снятия. Мышей использовали через 2 недели после выздоровления и эффективного заражения лентивирусами.

2.1.6 Культуры клеток

Нейрональные гибридные клетки NG108-15 (*нейробластомы мыши х-клетки глиомы крысы*), клетки HEK293 культивировали при 37°C в 90% воздуха, 10% CO₂ в DMEM, дополненной 5% FCS, 100 мМ гипоксантина, 0,1 мМ аминоптерина и 16 мМ тимицина [162]. Клетки дифференцировались в среде DMEM, дополненной гипоксантином, тимицином, 1% FCS и 0,25 мМ дигутирил-цАМФ, в течение 7 дней, как описано ранее [162, 291].

2.2 Тесты поведенческого фенотипирования животных

Все поведенческие тесты проводились за 4 часа до наступления темной фазы суток. Мыши проходили часовую адаптацию в комнате тестирования перед началом эксперимента. Все процедуры тестирования описаны ниже. Размер экспериментальных полей представлен как (ширина × длина × высота). После каждой сессии экспериментальное поле было обработано 80% спиртом и высушенено полотенцем.

2.2.1 Поведенческие тесты для мышей в раннем постнатальном периоде

Индивидуальная локомоторная активность в раннем постнатальном периоде. Мышь в возрасте 3-10 дней постнатального периода помещалась в центр открытого поля размером 22 см x 22 см x 10 см с нанесенной разметкой на поле – квадраты 4,5 x 4,5 см. В течение 3 минут регистрировалось количество пройденных мышью квадратов (**приложение А, левая панель**).

Групповая локомоторная активность в раннем постнатальном периоде основана на измерении площади занимаемой мышами территории. Четыре мышонка (PND3,7,10) располагали по четырем сторонам открытого поля (22 см x 22 см x 10 см). Каждые две минуты в течение 20 мин регистрировали занимаемую мышатами площадь (**приложение А, правая панель**).

2.2.2 Поведенческие тесты для половозрелых мышей

Анализ структуры следа половозрелых мышей.

Тест на определение отпечатков конечностей использовали для сравнения структуры следа [352]. Передние и задние конечности мышей покрывали черной нетоксичной краской и отпускали их в спонтанное пересечение тоннеля шириной 50 см (шириной 15 см), застеленным свежим листом белой бумаги [292]. Расстояние между центром отпечатка задней лап и центром предыдущей печати переднего отдела было записано в последовательности из 4 последовательных шагов, исключая следы, сделанные в начале и конце прогона (**приложение Б**).

Тест «Rota rod».

Для изучения возможностей координации движений и двигательных способностей была использована ускоряющая парадигма вращающегося стержня [188, 409]. Мышей тестировали 3 раза в день в течение 3 последовательных дней с

300-секундной программой ускорения (от 5 до 40 об/мин). Вычислялось латентное время падения со стержня.

Активность в домашней клетке.

Спонтанная активность мышей в знакомой среде (домашней клетке) регистрировалась с использованием системы мониторинга SmartCage (O'Hara & Co., LTD., Токио, Япония). Был запрограммирован 12-часовой цикл свет/темнота и светодиодная подсветка (08: 45-20: 45, период освещения, 20: 45-08: 45, темный период). Каждая мышь отдельно помещалась в клетку, и мыши могли получить доступ к воде и пищевым гранулам *ad libitum*. Размер пола каждой клетки составлял 17 × 25 см. Освещение в световом периоде составляло 50 люкс. Движение мыши регистрировали в течение 24 ч [352].

Тест «Открытое поле».

Тест используется для измерения локомоторного и тревожного поведение[345]. Открытое поле – квадратная коробка (600 × 600 × 200 мм), покрытая полипропиленовыми листами внутри. Очерчена центральная арена (300 × 300 мм). Каждое животное помещали в центр поля. Регистрацию вели в течение 10 мин с помощью цифровой видеосистемы и программного обеспечения ANY-maze (Stoeling Co., Wood Dale, IL, USA). Оценивали общую активность в открытой арене, время и пройденное расстояние в центральной зоне. Данная парадигма основана на идее, что мыши с повышенным уровнем тревоги предпочтут находиться вблизи защитной стены, а не подвергаться опасности на открытом пространстве. После каждого испытания лабиринт очищали влажным полотенцем и 1% гипохлоритом натрия с последующей обработкой 70% спиртом и протиранием насухо [235].

Тест «Открытое поле» расширенный – для оценки интереса к новому несоциальному и социальному объекту.

Лабиринт «Открытое поле», как описано выше. Тест состоит из трех сессий. Первая сессия: мышь помещают в открытое поле на 10 мин (сесанс привыкания). После привыкания отсаживали из открытого поля. В центр поля помещали неодушевленный предмет (проволочная клетка, металлический цилиндр и др.). В

следующем teste, сессия 1, мышь снова помещали в камеру открытого поля с новым несоциальным объектом (проволочной клеткой), и в течение следующих 10 мин регистрировали ее поведение. Впоследствии несоциальный объект был заменен на социальный (мышь-самец того же генотипа, что и контрольная группа). Тестируемое животное вновь запускали в лабиринт, сессия 2, на 10 мин. Оценивали процент времени нахождения в центральной зоне с объектом и количество входов в центральную зону с использованием цифровой видеосистемы и программного обеспечения для отслеживания видеосигнала ANY-maze. В конце каждого испытания, после 2 сессии, лабиринт, неодушевленный предмет и проволочная клетка для социального обрабатывалась 1% гипохлоритом натрия, а затем 70% -ным этианолом и протирались бумажными полотенцами насухо. Средний интервал времени между сессиями составлял 2-3 мин.

Тест «Трехкамерный лабиринт» - для оценки социализации и социальных предпочтений.

Лабиринт – трехкамерная прямоугольная коробка, покрытая прозрачным поликарбонатом. Перегородки имели дверные проемы, обеспечивающие доступ в каждую камеру. Для теста социального поведения была использована следующая процедура: сессия - привыкание. Испытуемую мышь сначала помещали в среднюю камеру и разрешали исследовать лабиринт в течение пяти минут со свободным доступом ко всем частям арены. Каждая из двух сторон содержала пустой проволочный каркас ($70 \times 90 \times 70$ мм). (В) Общительность. Сессия 1. Социализация. После привыкания к проволочной клетке (в левой камере) помещали незнакомую мышь (Stranger 1, наивную самку той же линии, что и контрольная группа). Еще одна проволочная клетка (в правой камере) была пуста, а испытуемая мышь помещалась в центральный отсек арены для всего лабиринта течение 5-минутной сессии со свободным доступом в две боковые камеры. Сессия 2. Социальное предпочтение. В правую камеру помещали вторую незнакомую мышь (Stranger 2, наивную самку той же линии, что и контрольная группа). Stranger 1 и Stranger 2 были из разных клеток. Количество времени, проведенного

в каждой камере, и количество входов в каждую камеру измерялись с использованием цифровой видеосистемы и программного обеспечения ANY-maze. В конце каждого испытания устройство распыляли 1% гипохлоритом натрия и 70% этианолом и протирали бумажными полотенцами. По мере необходимости, тест может быть проведен без второй сессии.

Тест «Открытое поле» двухуровневый – для оценки социализации и социального избегания.

Исследование социального избегания к новой мыши измеряли в двухэтапном тесте на социальное взаимодействие [83]. В первой 10-минутной сессии (цель отсутствовала) экспериментальной мыши было позволено свободно исследовать квадратную арену (600×600 мм), содержащую клетку из проволочной сетки ($70 \times 90 \times 70$ мм), расположенной в центре арены. Во второй 20-минутной сессии экспериментальную мышь вновь возвращали на арену с незнакомой особью (мышь-самец того же генотипа, что и контрольная группа) в клетке из проволочной сетки. Программное обеспечение для отслеживания треков животных (ANY-maze) использовалось для измерения времени, которое экспериментальная мышь проводила в «зоне взаимодействия» с социальным объектом.

Тест «Черно-белая камера».

Лабиринт – прямоугольная арена ($200 \times 600 \times 200$ мм), состоящая из двух отсеков, светлого (две трети, $400 \times 200 \times 200$ мм) и темного (одна треть, $200 \times 200 \times 200$ мм), как описано ранее [87]. Светлая камера – освещение 250 люкс, темная камера - 2 люкс. Данный тест полезен для прогнозирования анксиолитической или анксиоген-подобной активности у мышей. Он имеет преимущества быть быстрым и простым в использовании, не требуя предварительной подготовки животных. Каждую мышь помещали в центр световой камеры и оставляли свободно бегать между двумя камерами в течение 10 мин. Чтобы избежать субъективности, была также выполнена обратная парадигма: сначала мышь помещалась в темную камеру. С помощью видеосистемы ANY-maze регистрировалось латентное время первого входа

(всеми четырьмя лапами) в темную камеру, количество входов в темную камеру и расстояние, пройденное в светлой камере.

Приподнятый крестообразный лабиринт.

Данная арена широко используется при исследовании тревожно-подобного поведения уже много лет [233]. Лабиринт приподнят на 50 см над полом и состоит из центральной платформы (5×5 см) с двумя открытыми рукавами (5×25 см) и двумя закрытыми рукавами (5×25 см с 15 см непрозрачными стенками), протянутыми в противоположных направлениях. В начале каждого сеанса мышей помещали на центральную платформу мордой к открытому рукаву и регистрировали их активность (число входов в рукава, время нахождения в рукавах, пройденную дистанцию, время неподвижности и др.) в лабиринте в течение 5 мин с помощью программного обеспечения для отслеживания треков животных (ANY-maze).

Тест «Подвешивание за хвост».

Тест проводился в соответствии с ранее описанным методом [354]. Мышей индивидуально подвешивали за хвост на высоте 1 м над полом (закрепляя клейкой лентой, помещенной примерно на 1-2 см от кончика хвоста). Время неподвижности измеряли в течение 6 мин. Длительность неподвижности определяли как время, когда мышь полностью неподвижно и пассивно свисала, не двигая ни одной конечностью.

Тест «Принудительное плавание».

Испытание проводили в соответствии с описанным методом [310]. Мышей помещали отдельно в цилиндр (высота 25 см, диаметр 15 см), заполненный на глубину 10 см водой (25 ± 1 ° С) в течение 6 мин. После первых 2 мин активности общая продолжительность неподвижности регистрировалась в течение последних 4 мин теста. Продолжительность неподвижности определяли как время, в течение которого мышь оставалась плавающей пассивно, не делала попыток к побегу и показывала только медленные движения, чтобы держать голову над водой. Продолжительность поведения «скалолазания» определялась как время, в течение

которого мышь совершала сильные атакующие движения передними лапами против стенок цилиндра в течение 6 мин.

Тест «Acoustic startle response» и подавление реакции на пред-стимул – оценка эмоционального статуса (ответ на испуг).

Использовалась система для регистрации рефлексов испуга (O'Hara & Co., LTD.). Тестовая сессия была начата после помещения мышки в пластиковый цилиндр, где ее не трогали в течение 10 мин. Белый шум (120 дБ, 40 мсек) использовался в качестве стимула для испуга во всех испытаниях. Ответ мыши регистрировали в течение 140 мсек по окончании пред-стимула. Уровень фонового шума в каждой камере составлял 70 дБ. В парадигме торможения испуга и ингибиции пред-стимула звук пред-стимула был представлен за 100 мсек до пуска стимула. Интенсивность пред-стимульных звуков составляла 0, 75, 80, 85 и 90 дБ, и каждый звук был отдельно спарен с 120-дБ звуком-стимулом. Реакции в паре 0-дБ пред-стимула и 120-дБ звука-стимула использовали в качестве ответа на акустический пугающий стимул.

Тест «Fear conditioning» - оценка эмоционального статуса (ощущение страха).

Реакцию страха в условиях контекста и в присутствии ассоциативного стимула измеряли с использованием оборудования O'Hara & Co., LTD. Вкратце, обучение и тесты состояли из трех испытаний. Во время тренировки (1 день) мышь помещалась в испытательную камеру на 300 секунд. Белый шум (условный раздражитель) длительностью 60 дБ был представлен в течение 30 секунд, после чего следовало слабое (2 сек, 0,3 мА) электрическое напряжение, которое служило безусловным стимулом. Были представлены еще два пары стимуляции тона-шока с той же продолжительностью, что и первый стимул. Тестирование в контексте (2 день) проводилось через 24 ч в той же камере в течение 300 с. Тестирование в присутствии ассоциативного стимула (3 день) проводили с использованием измененного контекста с использованием другой текстуры пола и раскраски стен. Звуковой сигнал (30 сек) был представлен дважды в течение 300-секундной продолжительности теста. Движение животных регистрировалось с

использованием видеокамеры, продолжительность замирания анализировали с использованием исходной программы на основе Image J или программного обеспечение для отслеживания треков животных (ANY-maze).

Тест на социальное доминирование и парадигма стресса.

Аппарат для испытания состоял из 30 см гладкой прозрачной акриловой трубы с внутренним диаметром 3,5 см. Двух мышей располагали на противоположных концах трубы и одновременно отпускали. Побежденными считались животные, которые выходили из трубы с того же конца, в который были запущены. Затем две мыши были спарены и размещены вместе. Социальный статус, определенный в первый день, поддерживался и/или укреплялся психологическим стрессом с помощью парадигмы, известной как «смена клетки» [241, 317]. Этот стресс создавали помещением мышей в пустую чистую клетку каждый день около 9:30 утра. Социальный ранг оставался неизменным через 4 дня. Воздействие обонятельных и зрительных стимулов, связанных с новой средой, вызвало повышение температуры на $\sim 1^{\circ}\text{C}$ (с $36,1 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ в первый день до $37,1 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$ через 4 дня, $n = 5$, $P=0,01$) у подчиненных мышей, но не было увеличения температуры у доминантных мышей (от $36,4 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ до $36,3 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$, $n=5$).

2.3 Регистрация и анализ USV

Регистрация USV у социально-изолированных мышат (PND3,7,10). C57BL/6, *Cd157^{+/−}* и *Cd157^{−/−}* мыши-самцы (PND 3-10) были протестированы как описано ранее [234, 235]. Перед началом эксперимента клетка с родителями и детёнышами мышей была перенесена в комнату тестирования для адаптации. Затем одного детеныша изолировали от родителей, помещали в стеклянный контейнер в звуконепроницаемой камере ($700 \times 600 \times 600$ мм, микрофон располагался в 5 см над детенышем) [344] и регистрировали USV в течение 3 мин (приложение В).

Контекст-специфичная (в процессе ухаживания самца за самкой) регистрация USV у взрослых мышей. C57BL/6 и Cd157^{−/−} мыши-самцы (возраст – 10 недель) были индивидуально помещены в клетки с последующей 5-минутной сессией спаривания с незнакомой самкой той же линии. Ультразвуковая вокализация регистрировалась в течение всей 5-минутной сессии.

Анализ USVs. Количественная и качественная оценка ультразвуковой вокализации мышей проводилась слепым методом относительно генотипа мышей. Число ультразвуков, их частота и продолжительность анализировалась с помощью USV монитора (Miromachi Kikai Co., Tokyo, Japan). «Click»-подобные ультразвуки (продолжительность \leq 40 мсек) не учитывались при анализе вокализируемого спектра [235]. Каждый «слог» был классифицирован как один из 7 следующих категорий - upward (Up), downward (Down), chevron, complex, harmonic, plate, “V”-call - на основе внутренних изменений основного тона, длины и формы [146, 334, 414], **приложение 4**.

2.4 Забор крови, спинномозговой жидкости и тканей головного мозга

Все образцы крови и тканей головного мозга были забраны независимо от поведенческого тестирования. Анестезию мышам проводили путем интраперитонеального введения хлоргидрата (100-120 мг/кг веса, Sigma-Aldrich, USA). Забор крови в количестве 0.1-0.2 мл осуществляли путем транскардиальной пункции; образцы центрифугировали 15 мин при 1600 *g* и 4°C. Образцы плазмы крови (~50-100 μ l/mouse) хранились при –80°C.

Гипоталамус извлекали в соответствие со стереотаксическим координатами [128], гомогенизировали в 10 mM Tris-base (pH 7.4) с использованием стеклянного гомогенизатора. В свежеприготовленном гомогенате регистрировали активность АДФ-рибозилциклизы [143]. Измерение белков проводились с использованием набора Bio-Rad protein assay kit и с бычьим сывороточным альбумином в качестве стандартов (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Спинномозговую жидкость (CSF) собирали в соответствии с протоколом, описанным для отбора проб CSF у мышей без обнаруживаемого загрязнения плазмой [127, 237]. Мышей внутрибрюшинно анестезировали хлоргидратом (100-120 мг/кг веса, Sigma-Aldrich, USA). Кожа была выбрита на шее, а сагиттальный разрез был сделан на коже ниже затылка. Подкожные ткани и мышцы были разделены. Капиллярную трубку вводили через твердую мозговую оболочку и образцы спинномозговой жидкости собирали с помощью 1-мл шприца с иглой. CSF замораживали сразу на сухом льду, а затем переносили в морозильник -80°C.

2.5 Определение уровня окситоцина

Для определения уровня окситоцина в плазме крови использовали иммуноферментный набор реагентов (Oxytocin ELISA kit, Assay Designs, Ann Arbor, MI) [193, 418].

2.6 Активность АДФ-рибозилциклизы

Оценку активности АДФ-рибозилциклизы проводили в гомогенатах гипоталамуса мышей при использованием техники с участием никотинамидгуаниндинуклеотида [143]. Кратко, 2 мл реакционной смеси содержали 60 мкМ NGD⁺, 50 мМ Tris-HCl (pH 6.6), 100 мМ KCl, и 10 мкМ CaCl₂. Измерения флуоресценции проводили при 37°C, экстинкции 300 нм, эмиссии 410 нм на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5300 PC (Киото, Япония) в течение 10 мин с регистрацией точек каждые 15 сек. Активность АДФ-рибозилциклизы рассчитывалась исходя из образования циклической GDP-рибозы (cGDP) и представлена в виде нмоль образования GDP/ (мин x мг белка) [193, 242].

2.7 Введение экзогенного окситоцина

OXT (Sigma-Aldrich, USA) вводили мышатам-самцам (PNDs 7-10) интраперitoneально (10 нг/мышь). Индивидуальная и групповая локомоторная активность, а также регистрация USV, забор образцов крови и тканей головного мозга, проводилась через 30, 60, 120 мин после введения OXT. В качестве контроля использовали введение PBS.

OXT (Sigma-Aldrich, USA) вводили половозрелым мышам самцам в тестах на социально поведение за 20 мин до начала теста в количестве 0,3 мл (100 нг/кг массы тела). В качестве контроля использовали введение PBS.

2.8 Антитела против CD157 кролика

В этом исследовании использовали полученные в Японии [196] антитела, специфически распознающие CD157 (BST-1) мыши. Кратко: CD157-антисыворотка была получена иммунизацией кроликов химерным слитым белком CD157 мыши и Fc-частью человеческого IgG1 (mBST-1Fc), а реакционная способность к человеческому IgG и мышенному CD38 была поглощена сефарозой 6 IgG человека и трансфектантом, BAFmCD38, соответственно. В некоторых экспериментах с гистохимическим окрашиванием головного мозга мышей также использовались mAb CD157 (клон BP-3, Becton Dickinson, NJ, США). Были получены одинаковые результаты окрашивания обоими антителами.

Взрослых мышей умерщвляли посредством транскардиальной перфузии с помощью 4,0% параформальдегида в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS, Gibco, Life Technologies, Tokyo). Затем селезенку удаляли, фиксировали в течение ночи и подвергали криозашите в PBS, содержащем 15 и 30% сахарозы. Селезенку разрезали на секции толщиной 20 мкм с использованием замораживающего микротома. Секции промывали в PBS для промывки соединения ОСТ и permeabilizировали 0,3% TritonX-100 в PBS в

течение 30 мин. Затем секции блокировали в PBS, содержащем 0,3% TritonX-100 и 3% BSA (бычий альбумин, FV, pH 5,2, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) в течение 1 ч при комнатной температуре и инкубировали в течение 2 ночей при 4°C с первичной антимышечной CD157-антисывороткой (1:100). Секции промывались 0,3% TritonX-100 в PBS и инкубировались с козьим антikроличьим IgG Alexa Fluor 488 (Invitrogen Molecular Probes, Tokyo, Japan, 1:200) и DAPI (Dojindo, Kumamoto, Japan, 1:2000) до 1 ч при комнатной температуре. Изображение было выполнено с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus IX71 (Токио, Япония).

2.9 Измерение температуры тела мышей

Ректальную температуру мыши измеряли путем введения терморезистивного зонда длиной до 2 см в прямую кишку мыши. Цифровые записи температуры были получены с точностью 0,1°C с использованием цифрового термометра (модель NS-TC10, Neuroscience Inc., Токио, Япония). Зонд погружали в силиконовое масло до введения и удерживали в прямой кишке до установления стабильной ректальной температуры (~ 5 сек).

2.10 ПЦР-анализ

ОТ-ПЦР

Суммарную РНК выделяли из селезенки мыши и субрегионов головного мозга с использованием TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). кДНК синтезировали из 0,5 мкг полной РНК с использованием ReverTra Ace-α (Toyobo, Осака, Япония) в соответствии с протоколом производителя. ПЦР проводили на градиенте S Mastercycler ep (Эппендорф, Гамбург, Германия), используя следующие условия: 1 цикл при 94°C в течение 30 с, затем 25 или 30 циклов при 94°C в течение 30 с, 58°C в течение 30 сек и 72°C в течение 40 сек, с конечной

стадией удлинения при 72°C в течение 1 мин. Использованные последовательности праймеров, как описано ранее [190]. Продукты ОТ-ПЦР разделяли электрофоретически на 1,2% гелях и окрашивали бромидом этидия. Интенсивность полосы измеряли по фотографиям с использованием изображения J. Данные показывали как интенсивность CD157, деленную на интенсивность β-актина того же образца.

ПЦР в реальном времени.

Суммарную РНК экстрагировали из тканей мозга ICR мышей с использованием мини-набора RNeasy Lipid Tissue Mini (74804, Qiagen Science, MA, USA) в соответствии с инструкциями производителя и обратно транскрибировали в кДНК с использованием системы синтеза SuperScript™ First-Strand Synthesis System для RT- PCR (11904-018, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). кДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР-анализа в реальном времени, где реакции проводили с использованием системы ViiA™ 7 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, США). Каждый образец анализировали в трех повторностях в 20 мкл реакционной смеси для амплификации, содержащей 10 мкл FAST qPCR MasterMix Plus (315-81021, Eurogentec, Seraing, Belgium), 1 мкл TaqMan Gene Expression Assay (CD38, Mm01220906_m1, TRPM2, Mm00663098_m1, Applied Biosystems), 2 мкл кДНК-матрицы и 7 мкл свободной от нуклеазы воды на MicroAmp Fast 96-луночном планшете реакции. Полученные значения для генов были нормированы на экспрессию мРНК GAPDH (Mm99999915_g1, Applied Biosystems). Количественную ПЦР в реальном времени проводили с использованием ПЦР системы реального времени ViiA™ 7, основанной на методе относительной стандартной кривой, где относительные изменения экспрессии гена мишенью нормализовались против GAPDH. Количественную эффективность ПЦР определяли с помощью серии разведений 1:5 для каждого эксперимента.

2.11 Иммуногистохимия

Перед иммуногистохимическими процедурами срезы головного мозга промывали в PBS и инкубировали в PBS, содержащем 0,3% Triton X-100 (Sigma) и 10% нормальной лошадиной сыворотки (Invitrogen) в течение 1 часа. Затем срезы инкубировали с антителами против NeuN (1:200, Chemicon, Temecula, CA, USA) при комнатной температуре в течение 12 часов. Образцы промывали PBS и инкубировали с красителем Alexa Fluor 488 (1:200) при комнатной температуре в течение 3 часов. После промывки PBS секции инкубировали с раствором Hoechst 33258 (Sigma) 10 мг/мл для визуализации ядра. Изображение было выполнено с использованием Axio Observer.A1 (Zeiss, Йена, Германия).

Участки миндалины сначала инкубировали с первичными мышиными антителами к CD157 и затем промывали 0,3% TritonX-100 в PBS и инкубировали 1 ч с козьим антикроличьим IgG Alexa Fluor 488 (1:200) и DAPI (Dojindo, 1:2000) при комнатной температуре. Затем срезы промывали PBS, содержащим 0,3% TritonX-100 и покрывали анти-фэйдом [43]. Изображение было выполнено с использованием микроскопа Olympus IX71. Изображения были проанализированы с помощью программного обеспечения MetaMorph (Molecular Devices, Downingtown, PA, США) [160].

Окрашивание по Нисслю.

Замороженные срезы головного мозга окрашивали 0,5% ацетатом тионина (Nacalai Tesque) при комнатной температуре в течение 1 мин. Изображения с низким увеличением были получены с помощью микроскопа BZ-9000 поколения II (Keyence, Осака, Япония).

c-FOS иммунореактивность.

После 10-минутного теста в открытом поле, мозг мышей сразу же фиксировали 4% параформальдегидом в PBS в течение ночи. После того как мозг был криозащен в PBS, содержащем 15 и 30% сахарозы, мозг разрезали на секции толщиной 20 мкм с использованием замораживающего микротома.

Секции обрабатывали, как описано выше, и инкубировали в течение ночи при 4°C с первичными антителами к c-Fos (Santa Cruz, Dallas, TX, USA, 1:200). Секции мозга окрашивали козьим антикроличьим IgG Alexa Fluor 488 (1:200) и DAPI (1:2000) в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем срезы промывали раствором PBS, содержащим 0,3% TritonX-100, и покрывали анти-фейдом. Изображение было выполнено с использованием микроскопа Olympus IX71. Изображения были записаны с помощью программного обеспечения MetaMorph. C-Fos-позитивные клетки подсчитывали вручную, используя следующие параметры: диаметр флуоресценции < 13,5 мкм и интенсивность флуоресценции > 498,6. Средняя интенсивность флуоресценции была в пределах 5-кратного диапазона.

CD38, TRPM2 и OXT иммуноокрашивание.

Иммуногистохимия для CD38, TRPM2 и OXT проводили, как описано ранее [193]. Анестезированных мышей перфузировали внутрисердечно холодным PBS с последующим холодным 4% параформальдегидом (PFA) в PBS. Головной мозг удаляли и фиксировали в течение ночи в 4% -ном растворе (PFA при 4°C. Мозг нарезали на микротоме в срезах толщиной 20 мкм. Участки предварительно инкубировали в блокирующем растворе (3% BSA и 0,3% Triton X-100 в PBS) в течение 1 часа и затем инкубировали с кроличьим поликлональными антителами к мышиному CD38 (sc-7049, Santa Cruz Biotechnology Inc.), Кроличье поликлональные антителами к крысиному TRPM2 (C-концу) (LS-C141843, LifeSpan BioScience, Seattle, WA, USA) и мышиные моноклональные антитела к мышиному OXT (PS38, ATC CRL 1950) в блокирующем растворе в течение 12 ч при 4°C. После трех промывок промывочным буфером срезы инкубировали с козьими антителами против кроличьего IgG в сочетании с Alexa Fluor 488 (Invitrogen) в блокирующем растворе в течение 1 часа при комнатной температуре. Изображения были получены с помощью инвертированного микроскопа Olympus IX71, оборудованного охлаждаемой CCD-камерой (Cool SNAP HQ2, Roper Scientific, Tucson, AZ, США). Количество иммунопозитивных ядер в каждом отделе головного мозга регистрировали и анализировали с использованием

программного обеспечения Metamorph (Molecular Devices, Downingtown, PA, USA).

Оценка нейрогенеза и синаптогенеза в субвентрикулярной зоне зубчатой извилины мозга мыши методом имmunогистихимии.

Для оценки нейрогенеза использовались следующие маркеры: Nestin - акроним для маркера нейроэктодермальных стволовых клеток, представляющий собой белок, экспрессирующийся, главным образом, в нервных клетках, где он вовлечен в радиальный рост аксонов; Doublecortin (DCX) - белок, ассоциированный с микротрубочками, маркер незрелых нейронов, MAP2 - маркер нейробластов.

Для оценки синаптогенеза использовали следующие маркеры: PSD95 – маркер постсинаптической плотности; Staufen - РНК-связывающий белок, участвующий в локализации и транспорте дендритной мРНК; маркер нейрональных РНК гранул; Synaptophysin - интегральный гликопротеин мембранны, локализованный в пресинаптических везикулах нейронов (Abcam, UK).

Иммуногистохимию для оценки нейрогенеза и синаптогенеза проводили по методике свободноплавающих срезов [115] с последующей оценкой экспрессии маркеров с помощью конфокального микроскопа Olympus FV 10i (Япония). Количество иммунопозитивных клеток в субвентрикулярной зоне зубчатой извилины головного мозга регистрировали и анализировали с использованием программного обеспечения Metamorph (Molecular Devices, Downingtown, PA, USA). Оценивали пять полей зрения. Подсчитывали количество иммунопозитивных клеток (%) к общему числу клеток в поле зрения.

Оценка экспрессии CD38 и CD157 в ольфакторных луковицах мышей с экспериментальной нейродегенерацией.

Нарезку фиксированного мозга мышей с экспериментальной БА и ложной операцией осуществляли с помощью вибратора (Thermo Scientific Microm HM 650) и толщиной коронарных секций 50 мкм. Иммуногистохимию для оценки экспрессии проводили по методике свободноплавающих срезов [115] при использовании первичных антител к CD38 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology,

USA) и к CD157 (1:1000, Abcam, UK) с последующей визуализацией при помощи вторичных антител Alexa 488, 456 на конфокальном микроскопе Olympus FV 10i. Ядра клеток окрашивали с помощью DAPI (Sigma-Aldrich, USA). Оценивали экспрессию CD38 и CD157 в клетках мигрограмм (MAC-1, CD18/CD11b- Abcam, UK) и астроцитах (GFAP+, S100 β +) по пяти полям зрения в ольфакторных луковицах. Подсчитывали количество иммунопозитивных клеток (%) к общему числу клеток в поле зрения.

2.12 Плазмиды и трансфекция

Flag-mBST-1 и клон Flag-mCD38 клонировали из кДНК селезенки мыши. MBST-1 и mCD38 амплифицировали с помощью ПЦР с использованием праймеров: прямой mBST-1-EcoR I (5'-GCTCATAGAATGGCTGTCCAGGGAGGCCT-3'), реверсивный mBST-1-Xba I (5'-GGAATTCCATGGCTAACTATGAATTAGCC-3'), и реверсивный mCD38-Sal I (5'-ACGCGTCGACGCGTATTAAGTCTACACGATGGG-3'). Продукты ПЦР лигировали в вектор экспрессии pFLAG-CMV2. Клетки HEK293 трансфицировали плазмидами с использованием реагента для трансфекции Lipofectamine 2000 (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки использовали через 24 ч после трансфекции.

2.13 Оценка синтеза NAADP

Активность NAADP-синтеза очищенными белками (mBST-1, mCD38) измеряли с использованием комбинации реакции обмена оснований и циклического способа, как описано ранее с модификациями [41, 315]. Продукт ферментации, NAADP, измеряли после инкубации белков с 0,5 мМ НАДФ и 10 мМ никотиновой кислоты при 37°C в течение 1 часа в 50 мМ буфере ацетата натрия и уксусной кислоты (рН 4,5). Образцы обрабатывали 0,6 М PCA, и осадки

удаляли центрифугированием. РСА удаляли путем смешивания водного образца с 3 частями 2М КНСО₃. После центрифугирования при 15000g в течение 10 мин водный слой собирали и нейтрализовали 20 мМ фосфатом натрия (рН 8,0). Для удаления всех загрязняющих нуклеотидов образцы инкубировали в течение ночи со следующими гидролитическими ферментами при 37°C: 2,5 единицы/мл апиразы, 0,125 единиц/мл НАД -гликогидролазы, 2 мМ MgCl₂, 1 мМ NaF, 0,1 мМ PPi и 0,16 мг/мл NMN-аденилтрансферазы в 20 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 8,0). Энзимы удаляли фильтрованием с использованием фильтров Centricon 3. После гидролитической обработки добавляли щелочной фосфат (10 единиц/мл) для преобразования NAADP в NAAD и образцы инкубировали в течение ночи при 37°C. Щелочной фосфат удаляли фильтрованием с использованием фильтров Centricon 3. Образцы дополнительно инкубировали с циклическим реагентом (30 мкл), содержащим 2% этанола, 100 мкг/мл алкогольдегидрогеназы, 20 мкМ резазурина, 10 мкг/мл диафоразы, 10 мкМ рибофлавина 5'-фосфата, 10 мМ никотинамида, 0,1 мг/Мл BSA и 100 мМ фосфата натрия (рН 8,0) при комнатной температуре в течение 4 часов. Увеличение ресоруфиновой флуоресценции измеряли при длине волны возбуждения 544 нм и длине волны эмиссии 590 нм с использованием считающего устройства для флуоресцентных пластин (Spectra-Max GEMINI). Различные известные концентрации NAADP также были включены в реакцию циклирования для получения стандартной кривой.

2.14 Высвобождение ОХТ из гипоталамуса

Cd38^{+/+}, *Cd38^{-/-}* или мышей с локальным нокдауном по CD38 и TRPM2 анестезировали хлоргидратом (100-120 мг/кг веса, Sigma-Aldrich, USA). Получали один целый гипоталамус и помещали в 24-луночный планшет с несколькими лунками с 0,4 мл обычного раствора Локка, содержащего (в мМ): NaCl, 140; KCl, 5; MgCl₂ 1,2; CaCl₂ 2,2; Глюкоза, 10; HEPES, 10; Бычьего сывороточного альбумина (BSA), 0,01% доводили до рН 7,25 tris-HCl на водяной бане при 35°C.

Инкубационную среду заменяли 10 раз каждые 3 мин. После 11-й замены аликовты были сохранены после 3-минутной инкубации с гипоталамусом. цАДФ-рибоза была использована на 12-й замене среды. С 14-й замены температура была сдвинута до 38,5°C. Кроме того, с 10-й замены применяли 8- bromo-cADPR или 2-APB, и аликовты были сохранены с 8-й замены. В качестве альтернативы, температурный сдвиг был применен с 11-й замены, и аппликация цАДФ-рибозы была использована с 14-й замены среды. После 12 интенсивных промывок уровни ОХТ в инкубационной среде были постоянными вплоть до 18-й промывки. На 18-й замене среды уровень ОХТ был $1,04 \pm 0,11$ раза выше по сравнению с 12-й заменой (n=5).

2.15 Микроперфузия головного мозга мыши

Чтобы имплантировать микроперфузационный зонд, мышей анестезировали посредством внутрибрюшинной инъекцией хлоргидрата (100-120 мг/кг веса, Sigma-Aldrich, USA). Голову фиксировали в стереотаксической рамке (Narishige, Токио, Япония), и мышь готовили к операции путем бритья головы и дезинфекции кожи 70%-ным этианолом. Сферическая зубная дрель использовалась для просверливания 1 мм отверстия в черепе, оставляя твердую оболочку нетронутой. Затем твердая мозговая оболочка была проколота тонким пинцетом для создания определенного отверстия в мозговых оболочках. Используя стереотаксическую рамку, в три положения мозга медленно вставлялся проводящий зонд. Зонд был прикреплен к черепу с помощью двух анкерных болтов и биосовместимого зубного цемента. Все хирургические процедуры были завершены в течение 30 мин. Проводящий зонд использовался для обеспечения механической стабильности во время имплантации и на протяжении всего периода 2 недельного восстановления. Микроперфузационный зонд (длина коаксиальной трубы 4 мм, диаметр 2,5 мм) состоял из фторированной этилен-пропиленовой направляющей канюли 20-G и в день проведения экспериментов он

был заменен перед отбором проб для отвода и оттока. Эта трубка была соединена с двумя стеклянными шприцами (Hamilton, USA), помещенными в шприцевые насосы (Eicom, Осака, Япония). Микроперфузат закачивали в зонд со скоростью потока 2 мкл/мин и образцы отбирали при той же скорости потока. Отбор проб проводился в течение 2 часов. Оба микрозонда перфузировали без взятия пробы в течение 60 мин до того, как были собраны первые 30-минутные микроперфузаты. Микроперфузат смешивали в стерильных условиях с раствором, содержащим 154 мМ; NaCl, 2,2 мМ; CaCl₂, 5,6 мМ; KCl, 2,3 мМ; NaHCO₃ и 0,15% BSA (рН 7,4). Сразу же после применения цАДФ-рибозы через каждые 30 мин собирали четыре дополнительных микроперфузата. После окончания экспериментов мозг удаляли и замораживали, чтобы позднее оценить правильность места перфузии.

2.16 Эксперименты *in vitro*

2.16.1 Используемые материалы

цАДФ-рибоза - очищена, как описано Walseth et al. [380].

цАДФ-рибоза, 8-bromo-cADPR (8-бромо-цАДФ-рибоза), 8-бром-САДР, β -НАД⁺, 2-аминоэтоксидифенилборат (2-АРВ) и окситоцин были приобретены у Sigma Chemical Co. (Сент-Луис, Миссури, США).

Oregon Green 4881,2-бис (2-аминофенокси) этан-N, N, N, N-тетраацетат (ВАРТА) -1 АМ и Fura-2 АМ были приобретены у Molecular Probes (Eugene, OR, США) и Dojin (Кумамото, Япония), соответственно.

Среда для культивирования клеток: среда (DMEM), сыворотка (FCS) и Таq-полимераза - от Gibco / Invitrogen (Гранд-Айленд, Нью-Йорк, США) и Takara Biomedicals (Оцу, Япония), соответственно.

Реагент Fugene HD Transfection был приобретен у Roche Applied Science (Пенцберг, Германия).

2.16.2 ОТ-ПЦР для экспериментов *in vitro*

Клетки NG108-15, выращенные на 10-сантиметровых чашках Петри, дважды промывали фосфатно-буферным раствором и отделяли путем встряхивания, немедленно собирали в пробирки, свободные от РНКазы. Полную РНК выделяли из клеток, используя набор для выделения RNAspin Mini RNA illustra (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA) и обратную транскрипцию с использованием набора для синтеза первой нити кДНК (Life Science Inc., St Petersburg, FL, USA) в соответствии с требованиями протокола. Затем ПЦР проводили на термопреобразователе Eppendorf в оптимизированных условиях амплификации, включающие денатурацию при 95°C в течение 30 сек с последующим отжигом при 58°C в течение 30 сек и растяжением при 72°C в течение 1 мин. Праймеры, используемые для амплификации кДНК для TRPM2: прямой, 5' -ACT GGGACCACCAACTGA AG-3'; обратный, 5'-CCAGAA AGAGCCTCACGA AC-3'. Амплифицированный продукт с предсказанным размером 162 bp был подтвержден путем электрофореза на 1,2% агарозном геле.

2.16.3 Измерение осцилляций $[Ca^{2+}]_i$

Для мониторинга изменений внутриклеточных концентраций кальция, NG108-15 клетки инкубировали с 5 мкл проницаемого для клеток ацетоксиметилового эфира (AM) формы либо Oregon Green 488 ВАРТА-1, либо Fura-2, готовили разведением в нормальном диметилсульфоксидном буферном растворе в течение 1 ч при 37°C, как описано ранее [165]. Клетки, загруженные Oregon Green 488 ВАРТА-1, оценивали при длине волны экстинкции 485 нм, и эмиссии 538 нм с использованием прибора Argus 50 (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan). Нуклеотиды или другие реагенты вводили внеклеточно на клетках NG108-15 с использованием пипеток. Изображения регистрировали каждые 10 сек в течение 5 мин. Изменения интенсивности флуоресценции каждой клетки была расширена до плоскости X-t. Данные показанные как изменения

флуоресценции, деленные на флуоресценцию покоя (т.е. $\Delta F/F_0$) [242, 371]. Температуру столика микроскопа контролировали с помощью Термистор (400) (Eutech Instruments Pte Ltd, Сингапур) и телетермометра (YSI, Yellow Springs, США).

2.16.4 Клонирование и трансфекция кДНК окситоциновых рецепторов человека

Экспрессионная плазмида для окситоциновых рецепторов человека, слитая с флуоресцирующим зеленым цветом (EGFP), была сгенерирована. РНК человеческого мозга (1 мкг, Clontech, Маунтин-Вью, Калифорния, США) подвергали обратной транскрипции с использованием набора «Комплект синтеза кДНК первого транскриптора» (Roche Applied Science) согласно протоколу производителя. Полученную кДНК подвергали ПЦР с использованием ДНК-полимеразы KOD FX (Toyobo, Осака, Япония) в соответствии с протоколом изготовителя. Использовали праймеры: 5'-GTGGAGTCTCCAGGAGTGG-3' (прямой) и 5' -TATGCCAGCACAGCCTGAGC-3' (обратный). После обработки ExTaq (Takara, Otsu, Japan) в течение 10 мин при 72°C, амплифицировали и продукт клонировали в вектор pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) с получением pCHOXTR. В последствии, 1,4-kb EcoRI-фрагментов, полученные из pCHOXTR снова подвергали ПЦР, как описано выше, с использованием другого набора праймеров (прямой, 5'-CCGCAGGTGCACATCTTCTC-3'; обратный, 5'-GTGGATCCCGCCGTGGATGG-3', и амплифицированный фрагмент расщепляли с помощью PstII и BamHI. Полученный 0,46-kb PstI (1334)/BamHI (праймер) фрагмент вместе с 0,78-kb BamHI(556)/PstI(1334) фрагментом из pCHOXTR лигировали с расщепленным BamHI/BglII pEGFP-N3 (Clontech) с получением pHOXTREGFP. Сайты рестрикции эндонуклеазы были идентифицированы с помощью 5'-терминального нуклеотида (в соответствии с данными, депонированными в GenBank под номером доступа NM_000916). Клетки NG108-

15 трансфицировали pEGFP-hOXTR, как описано ранее [174]. Трансформированные клетки обрабатывали в течение 30 мин с помощью Fura-2 АМ перед интенсивной промывкой. Среда была удалена и заменена Ca^{2+} - содержащим сбалансированным солевым раствором Хэнкса. Клетки, экспрессирующие EGFP-метку окситоциновых рецепторов человека визуализировали при длине волны экстинкции 488 нм и эмиссии 340 и 380 нм.

2.17 Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программного пакета “GraphPad Prism 4” (версия 4.0, США).

Данные представлены в виде: среднее значение (Mean) \pm стандартная ошибка среднего (S.E.M.).

Критерий Колмогорова-Смирнова использовали для оценки нормальности распределения.

Сравнения двух групп проводили с использованием t-критерия Стьюдента (при условии нормального распределения в выборках), и U-критерий Манна—Уитни - при несоблюдении условий нормальности распределения.

Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) использовали при сравнении трех и более групп с одной переменной.

Для оценки взаимосвязи двух переменных (например, *Генотип x Возраст; Вводимое вещество x Категория USV* и др.) применяли двуфакторный ANOVA. Последующее попарное сравнение групп проводили с помощью *post-hoc* Bonferroni's, Tukey's или Sidak's тестов множественных сравнений.

Категориальные переменные сравнивали с помощью хи-квадрат (χ^2) теста.

Колокализацию иммунореактивности оценивали с использованием коэффициента корреляции Пирсона (РСС) и коэффициента перекрытия (ОС) с помощью программного обеспечения Olympus Fluoview (версия 4.0a, Япония).

Различия принимали статистически значимыми при $P \leq 0,05$.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Особенности нейроповеденческого статуса у взрослых мышей с делецией гена CD157/BST1

3.1.1 Общее состояние и локомоторная активность

Нами были использованы *Cd157*^{-/-} мыши самцы, воспроизведенные из замороженных *Cd157*^{+/+} яйцеклеток [190]. Эти мыши не экспрессировали CD157 в белом веществе селезенки (данные не представлены). *Cd157*^{-/-} мыши-самцы развивались нормально, как и контрольная группа – мыши дикого типа (*Cd157*^{+/+}) линии C57BL/6 в соответствие с ранее описанными данными [190], однако при отлучение от матери (PND 21) число нокаутных животных было в 2 раза меньше по сравнению с контролем. Нами не было обнаружено повреждения кожных покровов в связи с чрезмерным самогрумингом у *Cd157*^{-/-} мышей, что свидетельствует об отсутствии стереотипного поведения.

Паралич, трепет, ригидность, постуральная аномалия и непроизвольные движения не наблюдались. Движение и походка *Cd157*^{-/-} мышей соответствовали норме (рисунок 14А). В возрасте 8-10 недель двигательная активность мышей линии *Cd157*^{+/+} и *Cd157*^{-/-} была оценена в тесте «Rota rod» в течение 3 последовательных дней. Нами не было обнаружено разницы в моторных функциях, координации и обучении между экспериментальной и контрольной группами (рисунок 14Б). Латентное время падения с вращающегося стержня было одинаковым у мышей обоих генотипов, что свидетельствовало об отсутствии слабости в передних и задних конечностях, и дисфункции координации при движении.

Одним из отличительных признаков болезни Паркинсона является дегенерация дофаминергических нейронов в черной субстанции. Поэтому мы провели анализ тирозин-гидроксилаза позитивных клеток с помощью

имmunогистохимии или проанализировали уровень экспрессии мРНК тирозингидроксилазы у мышей обоих генотипов (**приложение Д**).

Нами не было обнаружено различий у мышей дикого типа и дефицитных по *Cd157*. Кроме того, были исследовано снижение тирозин-гидроксилаза-положительных клеток в черном веществе и стриатуме после введения 1-метил-4-фенил-1,2,3,6 тетрагидропиридина (МРТР). Мыши *Cd157*^{+/−}, обработанные МРТР, проявляли ту же чувствительность, что и мыши дикого типа, в отношении дегенерации нигро-стриатума вМРТР-индуцированной модели болезни Паркинсона. Нозерн-блоттинг показал, что уровень экспрессии мРНК а-синуклеина не различался между двумя генотипами, обработанными МРТР (**приложение Е**). Таким образом, результаты показывают, что мыши линии *Cd157*^{+/−} обладают хорошими моторными функциями, и не испытывают дефицита в моторном обучении и моторной памяти. Поэтому следует использовать другую модель или стареющих животных для того, чтобы оценить любые возможные долгосрочные эффекты изменения функций CD157.

Интересно отметить, что мониторинг активности мышей в домашних клетках показал, что уровень активности мышей в течение дня и ночи составлял примерно 40-4% от мышей контрольной группы (**рисунок 15**). Дневной и ночной ритмы были похожи у мышей дикого типа и мышей линии *CD157*^{+/−} в течение 7 дней. Мы отметили, что *CD157*^{+/−} мыши могут проводить достаточно долгое время без движения, что может привести к уменьшению общей двигательной активности в повседневной жизни. Поскольку это характерное поведение, по-видимому, вытекает из конкретных эмоциональных состояний, мы оценили их психологические реакции в серии тестов на социальное поведение.

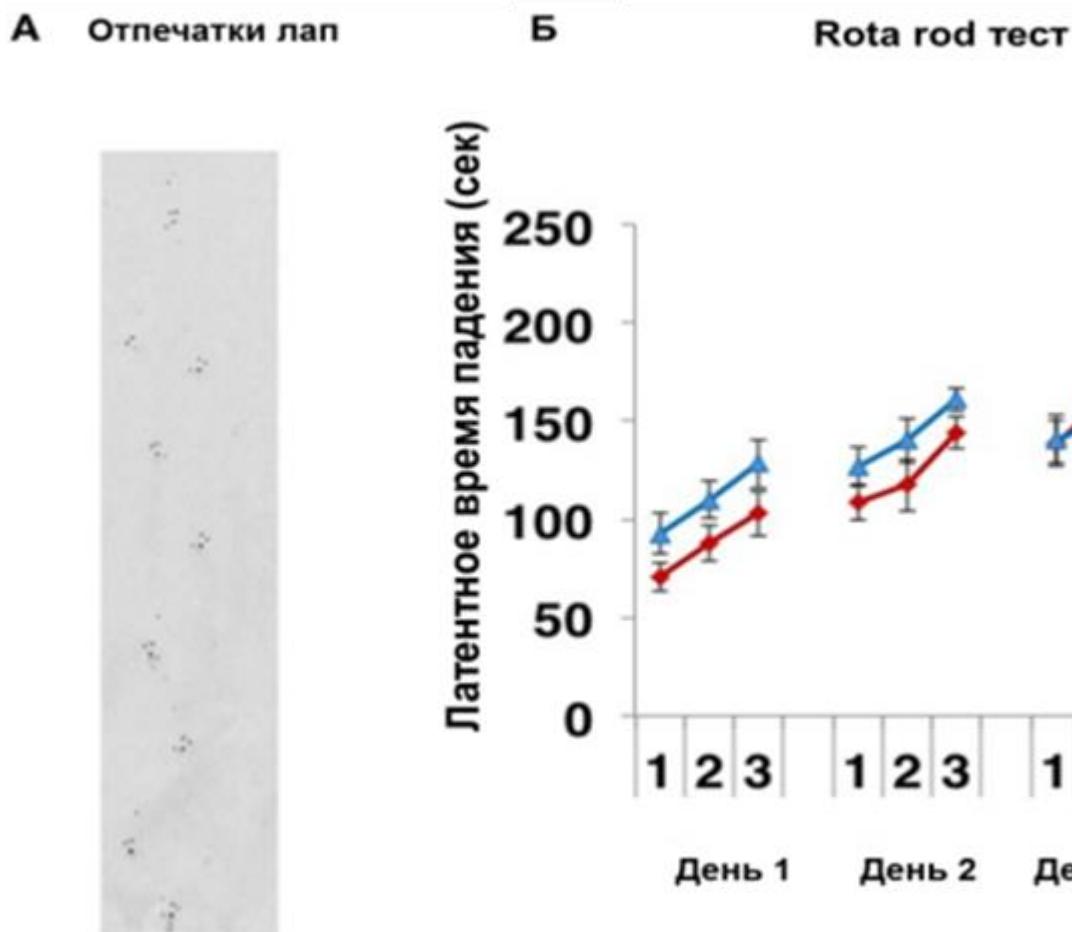
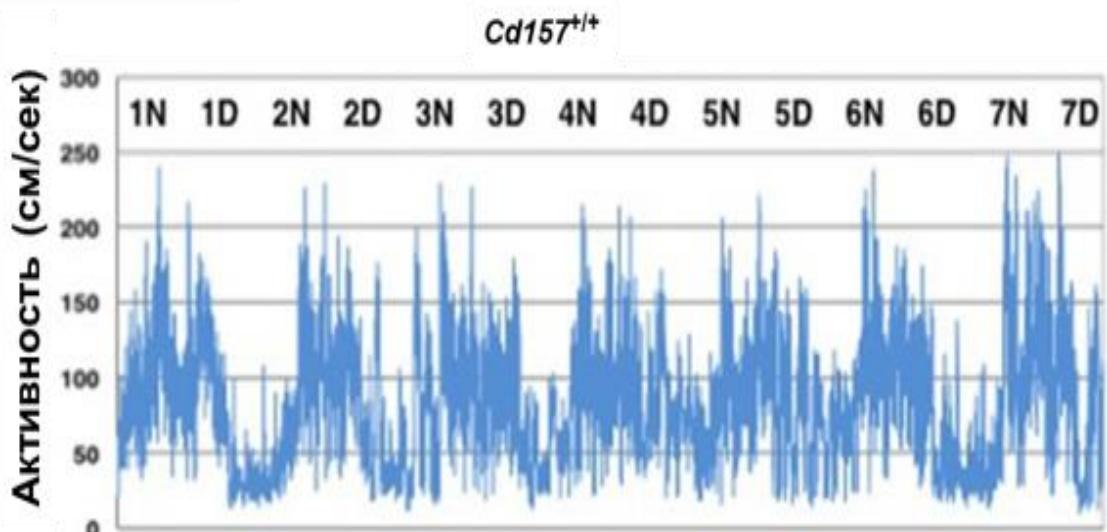


Рисунок 14 Тесты на моторную координацию. (А) Пример следа бегущей мыши. Паттерны следа не выявили нарушения координации движений у *CD157^{-/-}* мышей ($n=20$). (Б) Моторные обучение и память улучшались с каждой тренировкой (3 тренировки в день, 3 тренировочных дня) у мышей линии *Cd157^{+/+}* (голубой маркер, $n=10$) и *CD157^{-/-}* (красный маркер, $n=20$) в парадигме ускоряющегося вращательного стержня (5–40 rpm).

А



Б

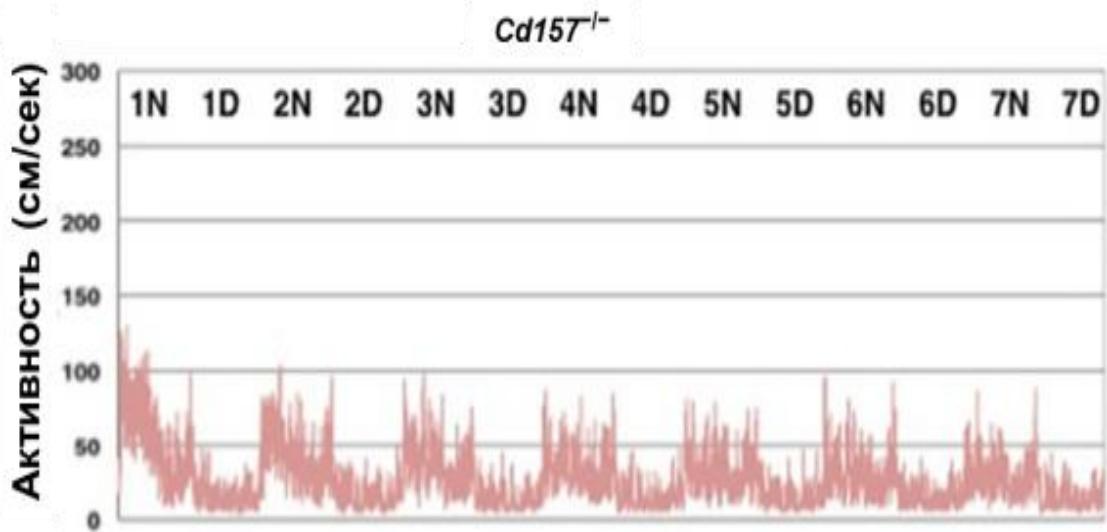


Рисунок 15 Спонтанная домашняя активность у мышей линии *Cd157^{+/+}* (А) и *Cd157^{-/-}* (Б). Активность контролировали 24-часовой видео регистрацией в течение 7 дней (n=8). Более высокие уровни активности указывают на темную фазу во время цикла 12:12 свет (D) – темнота (N) (включение света в 8:45, выключение света в 20:45).

3.1.2 Поведение во время экспозиции нового

Когда мышей подвергали воздействию новой среды в лабиринте «Открытое поле» (рисунок 16), то наблюдали по записанным трекам, что мыши-самцы линии

Cd157^{−/−} меньше исследовали территорию, особенно во внутренней зоне, по сравнению с контрольной группой (рисунок 17Б-В). Несмотря на то, что различий в поведении, наблюдавшихся во внешней зоне, не было (данные не представлены), процент времени нахождения во внутренней зоне был снижен у *Cd157*^{−/−} мышей (n=8, $P=0,0097$, рисунок 17А). Число входов во внутреннюю зону у *Cd157*^{−/−} мышей было меньше, чем *Cd157*^{+/+} мышей (n=8, $P=0,038$; рисунок 75Б). Напротив, средняя скорость *Cd157*^{−/−} мышей во внутренней арене была выше, чем у мышей дикого типа (n=8, $P=0,0262$, рисунок 75В).

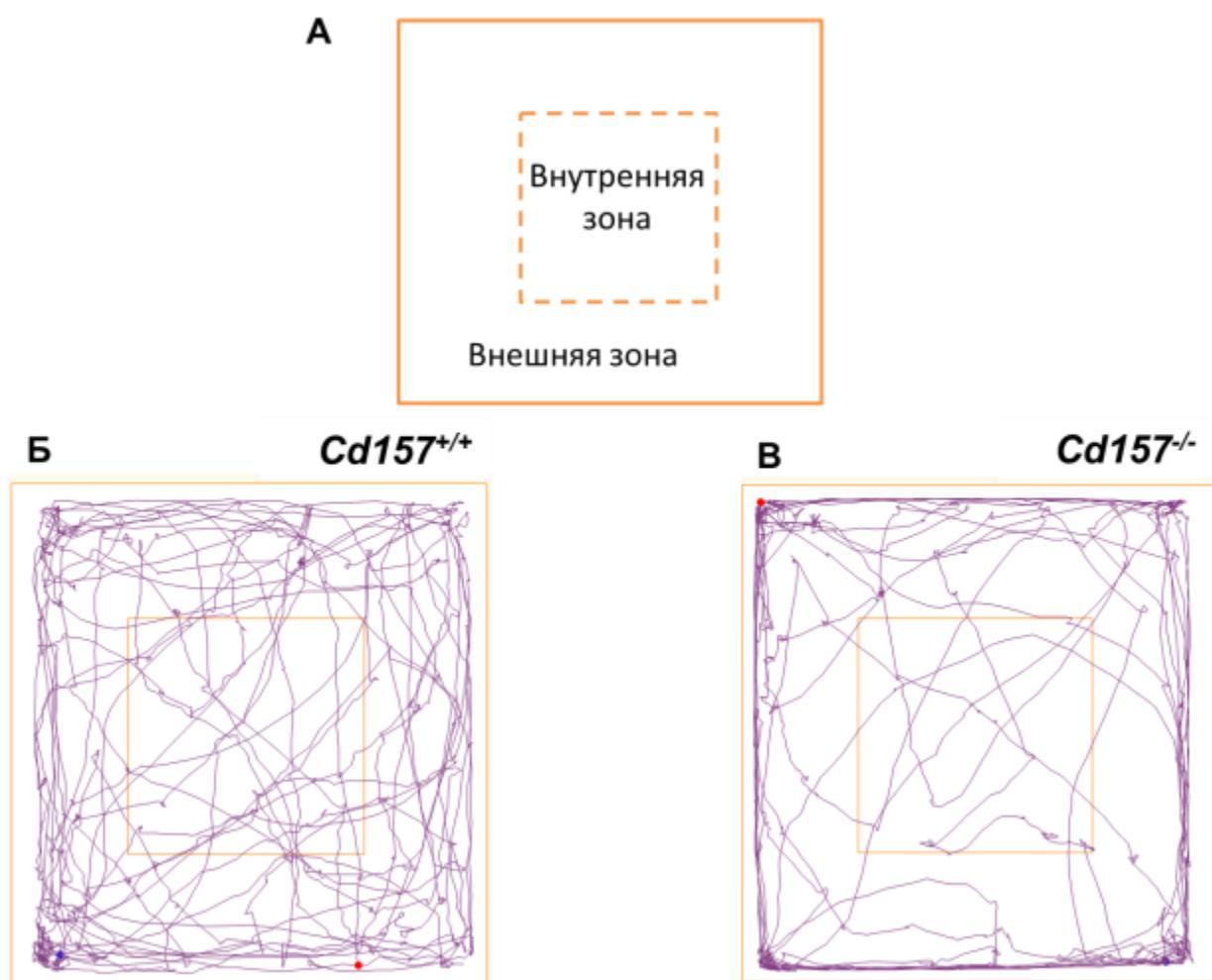


Рисунок 16 Схема эксперимента и треки движения в teste «Открытое поле» с участием взрослых самцов мышей. (А) Схема лабиринта в teste «открытое поле». **(Б, В)** Репрезентативные треки движения мышей *Cd157*^{+/+} и *Cd157*^{−/−} в открытом поле.

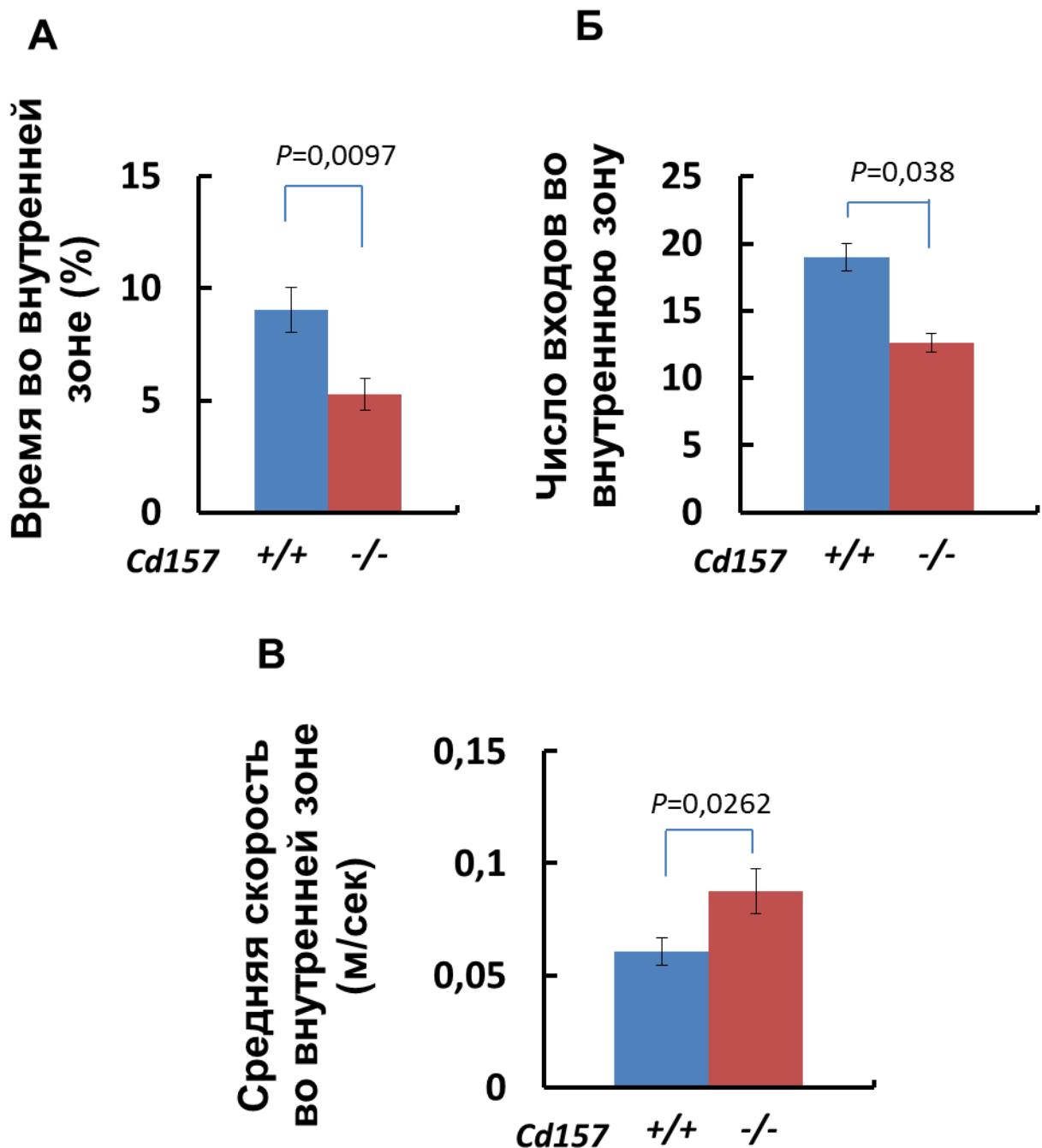


Рисунок 17 Анализ состояния тревожности в teste «Открытое поле» с участием взрослых самцов мышей. (А) Процент времени, проведенного во внутренней зоне; (Б) количество входов во внутреннюю зону; (В) средняя скорость во внутренней зоне. Синий маркер - *Cd157^{+/+}* мыши, красный маркер - *Cd157^{-/-}* мыши. $n = 8$, t-критерий Стьюдента.

Были проведены тесты на интерес к неодушевленному (несоциальному) новому объекту и социализацию (предпочтение социального объекта несоциальному) в одном и том же лабиринте «Открытое поле». Использование несоциального (неодушевленного) объекта (рисунок 18) подтвердило, что $Cd157^{-/-}$ самцы мышей проявляют повышенную тревожность и меньше проводят времени во внутренней зоне с объектом (рисунок 18Б-В, рисунок 19).

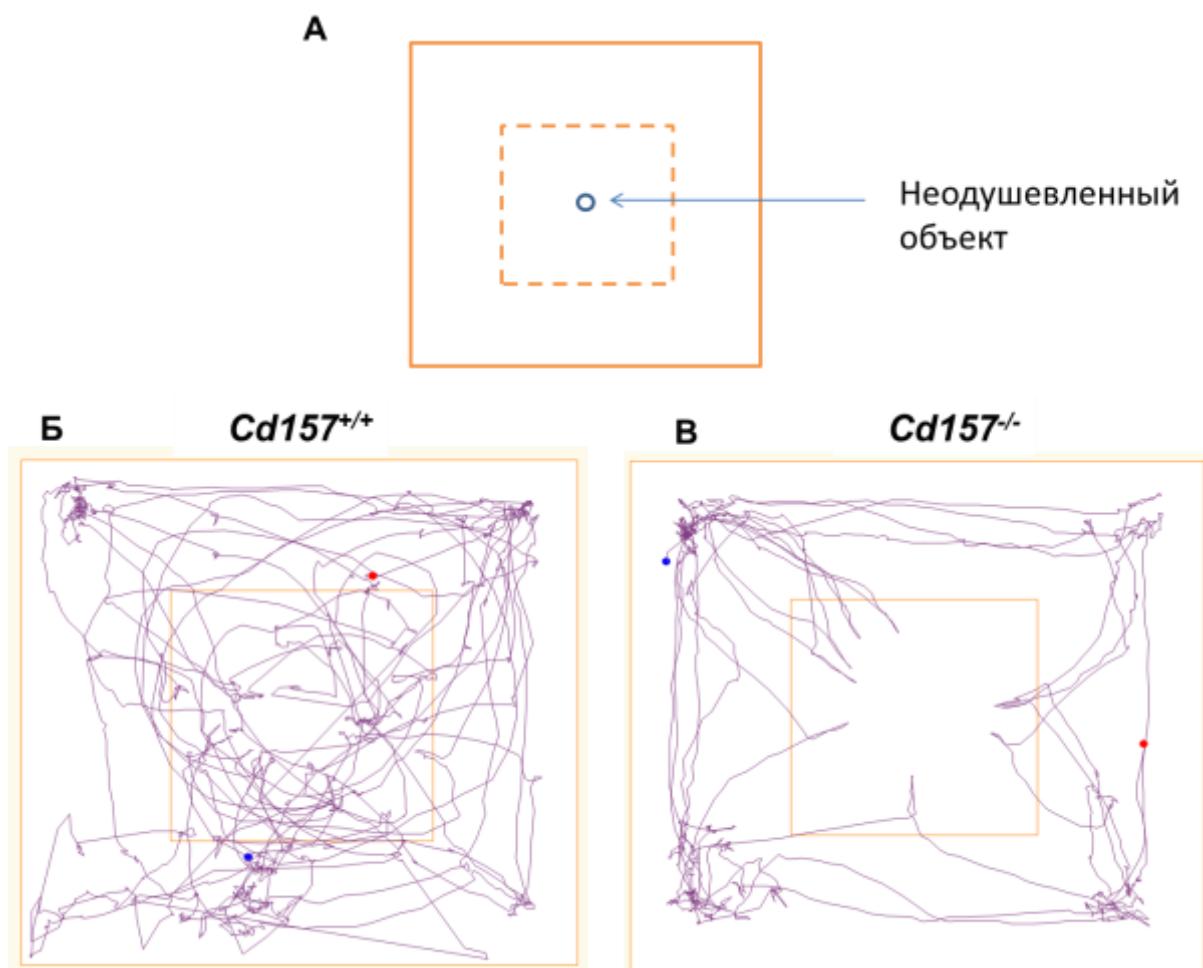


Рисунок 18 Схема эксперимента и треки движения в teste «открытое поле» с присутствием несоциального объекта в центре лабиринта. (А) Схема лабиринта в teste «открытое поле», в центре – неодушевленный предмет. (Б, В) Репрезентативные треки движения мышей $Cd157^{+/+}$ и $Cd157^{-/-}$ в открытом поле в присутствии неодушевленного объекта.

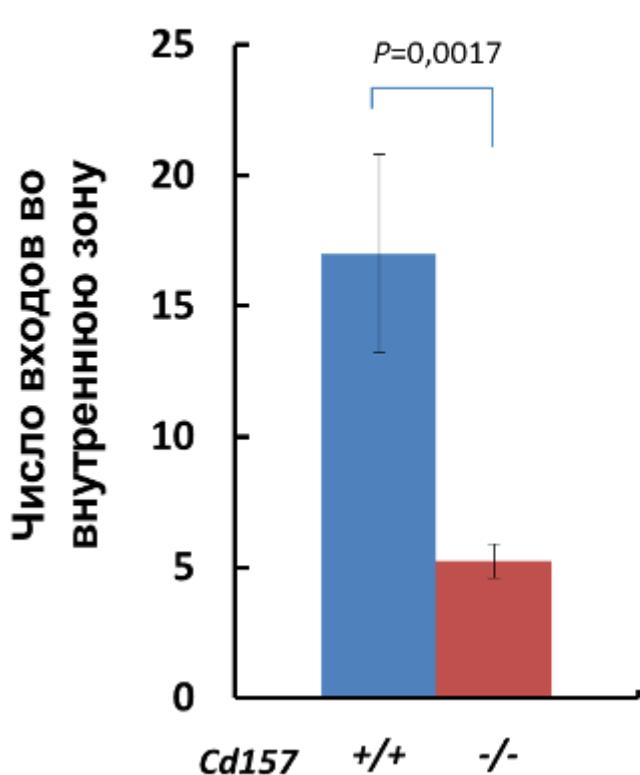
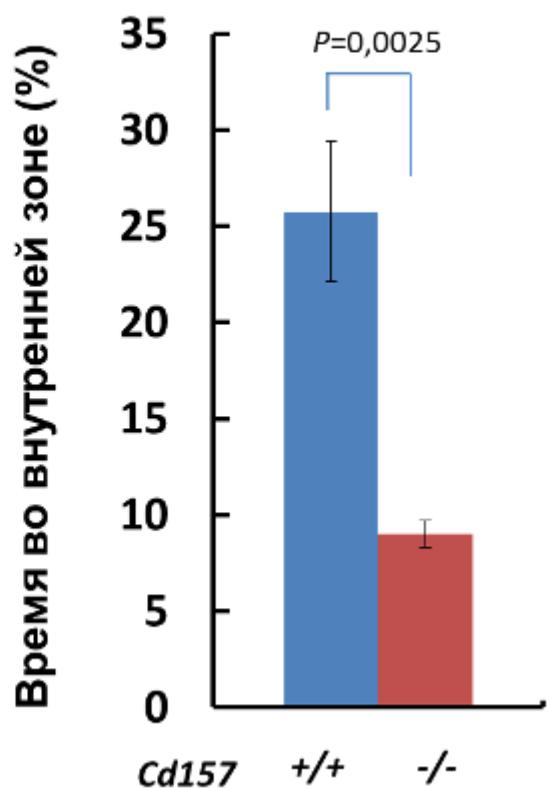
А**Б**

Рисунок 19 Анализ интереса к неодушевленному предмету в тесте «Открытое поле» с участием взрослых самцов мышей. Показано количество входов во внутреннюю зону (А) и процент времени, проведенного во внутренней зоне (Б) на арене с несоциальным (неодушевленным) объектом. Синий маркер - *Cd157*^{+/+} мыши, красный маркер - *Cd157*^{-/-} мыши. n=8, t-критерий Стьюдента.

Процент времени, проведенного близко к несоциальному объекту во внутренней зоне лабиринта «Открытое поле», был значительно короче у мышей *Cd157*^{-/-}, чем у мышей *Cd157*^{+/+} (n=8, P=0,0025, **рисунок 19**). Когда неизвестную мышь-самца использовали как социальный стимул (**рисунок 20**), нокаутные мыши проявляли повышенный интерес по сравнению с их интересом к несоциальному объекту (время во внутренней зоне на **рисунке 21Б** по сравнению с фигурой на **рисунке 19Б**, P=0,001). Тем не менее, *Cd157*^{-/-} меньше входили во внутреннюю зону (n=8, P=0,0074, **рисунок 21А**) и оставались там более короткое

время ($n=8$, $P=0,0351$, **рисунок 21Б**) по сравнению с мышами дикого типа. Таким образом, наши результаты показывают, что у $Cd157^{-/-}$ мышей более высокий уровень тревожности в новой среде, о чем свидетельствует предпочтение быть вблизи защитной стенки, а не подвергаться опасности в открытом поле и пониженный уровень интереса (социализации) к несоциальному (социальному) объекту.

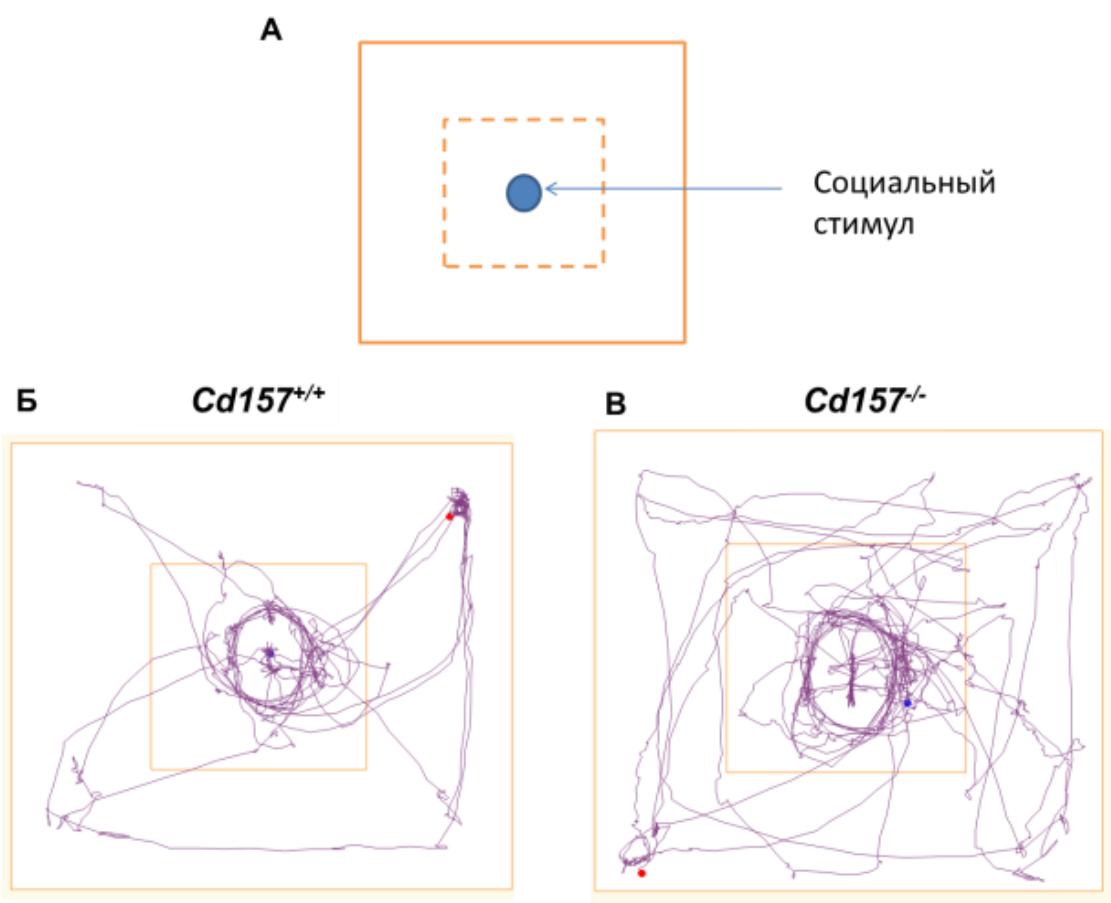


Рисунок 20 Схема эксперимента и треки движения в teste «открытое поле» с присутствием социального стимула в центре лабиринта. (А) Схема лабиринта в teste «открытое поле», в центре – социальный объект. (Б, В) Репрезентативные треки движения мышей $Cd157^{+/+}$ и $Cd157^{-/-}$ в открытом поле в присутствии социального стимула ($Cd157^{+/+}$ мыши-самца).

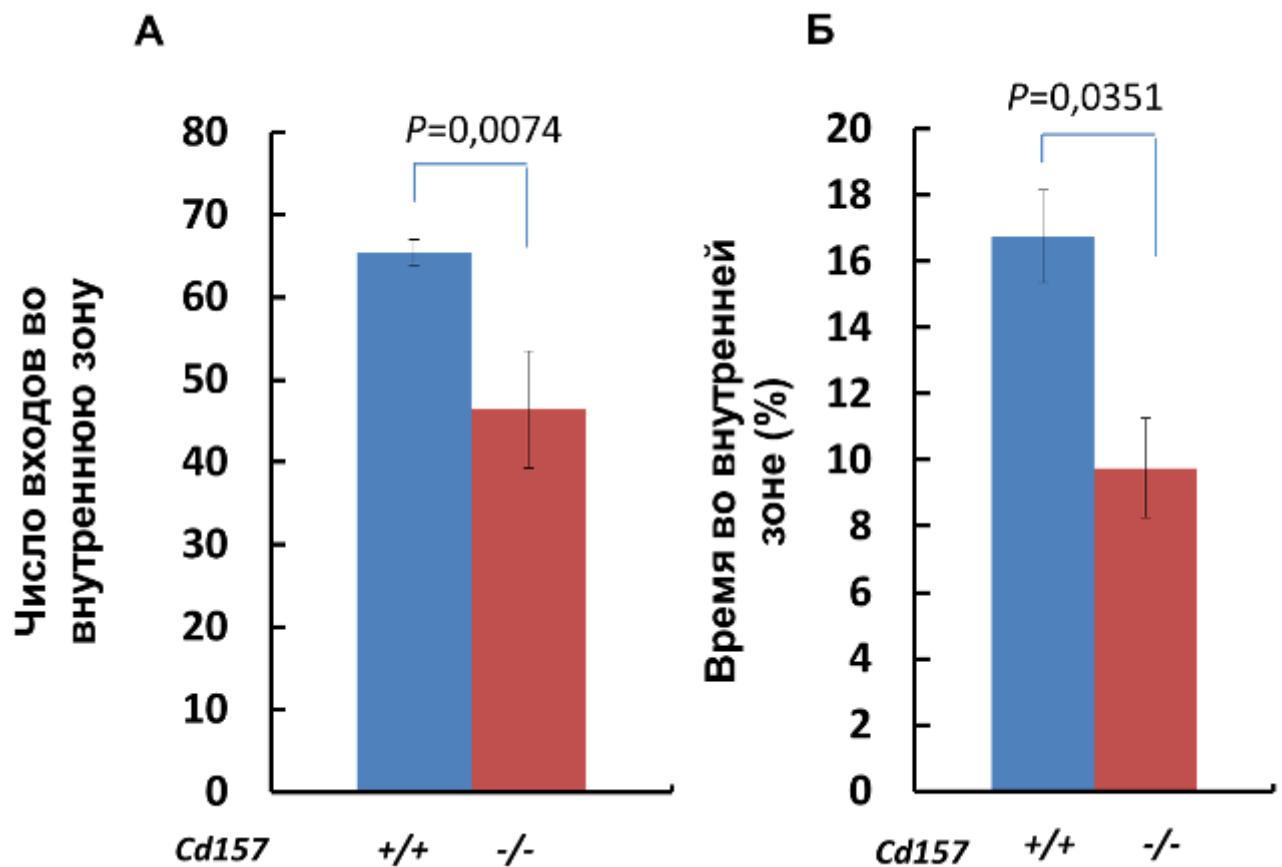


Рисунок 21 Анализ интереса к социальному объекту в тесте «открытое поле» с участием взрослых самцов мышей. Показано количество входов во внутреннюю зону (А) и процент времени, проведенного во внутренней зоне (Б) на арене с социальным стимулом в центре арены. Синий маркер - *Cd157*^{+/+} мыши, красный маркер - *Cd157*^{-/-} мыши. n=8, t-критерий Стьюдента.

Поведение, связанное с тревожностью, было подтверждено с помощью теста «Черно-белая камера» (рисунок 22). Переход от светлой к темной арене значительно отличался у двух групп (рисунок 23А-Б). *Cd157*^{-/-} мыши входили в темную камеру со средней частотой $2,2 \pm 0,4$ раза в течение 10-минутного теста, тогда как *Cd157*^{+/+} мыши - с частотой $8,6 \pm 2,4$ раза в течение того же промежутка времени (n=8, *P*=0,0019, рисунок 23Б). В светлой зоне *Cd157*^{-/-} мыши перемещались значительно медленнее, чем мыши *Cd157*^{+/+} (n=8, *P*=0,021, рисунок 23В). И наоборот, когда мышей сначала помещали на темную арену до начала экспериментов, *Cd157*^{-/-} мыши оставались в темноте в течение более

длительного периода времени ($n=10$, данные не показаны). Эти результаты обнаруживают, что мыши линии $Cd157^{-/-}$ испытывают тревогу при переходе в новое для себя состояние в условиях меняющейся внешней среды.



Рисунок 22 Примеры треков движения мышей в teste «Черно-белая камера».

Для сравнения, был также проведен тест «Черно-белая камера» и на мышах дефицитных по $Cd38$. Хотя частота входов в темную камеру была различной, вероятно, из-за разного генетического фона, на котором сделаны нокаутные животные (генетический фон для $Cd38^{-/-}$ – линия ICR и для $Cd157^{-/-}$ – C57BL/6), не было найдено поведенческих различий между $Cd38^{-/-}$ мышами и мышами дикого типа (рисунок 24, левая панель). Эти наблюдения доказывают, что беспокойство, связанное с новым окружением, является характеристикой мышей линии $Cd157^{-/-}$, но не мышей $Cd38^{-/-}$.

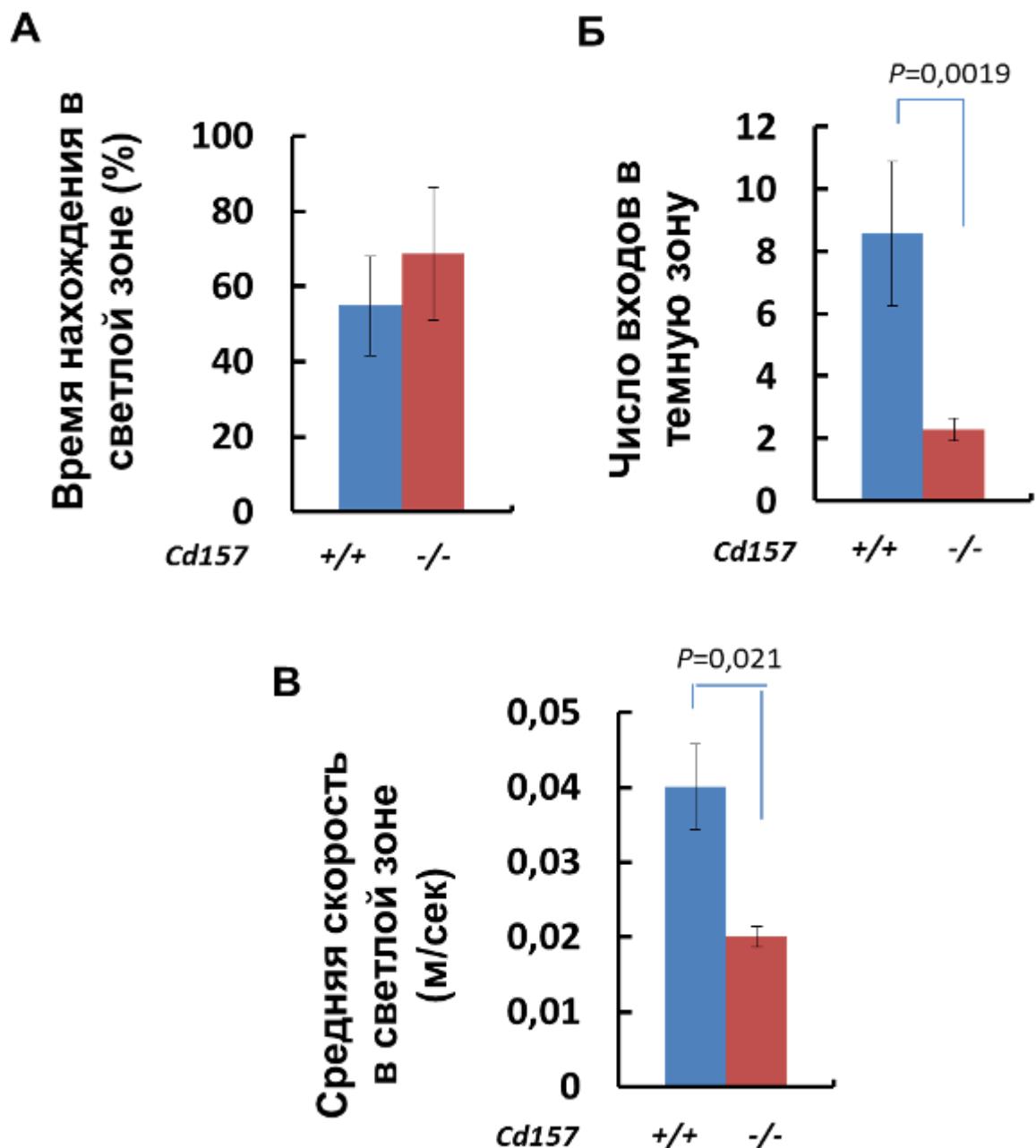


Рисунок 23 Поведение у мышей дикого типа (синий маркер, *+/+*) или дефицитных по *Cd157* (красный маркер, *-/-*) в teste «Черно-белая камера». **(А)** Процент времени, проведенного в светлой зоне; **(Б)** число переходов между двумя зонами; **(В)** средняя скорость в светлой зоне Результаты представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка среднего значения. $n=8$, *t*-критерий Стьюдента.

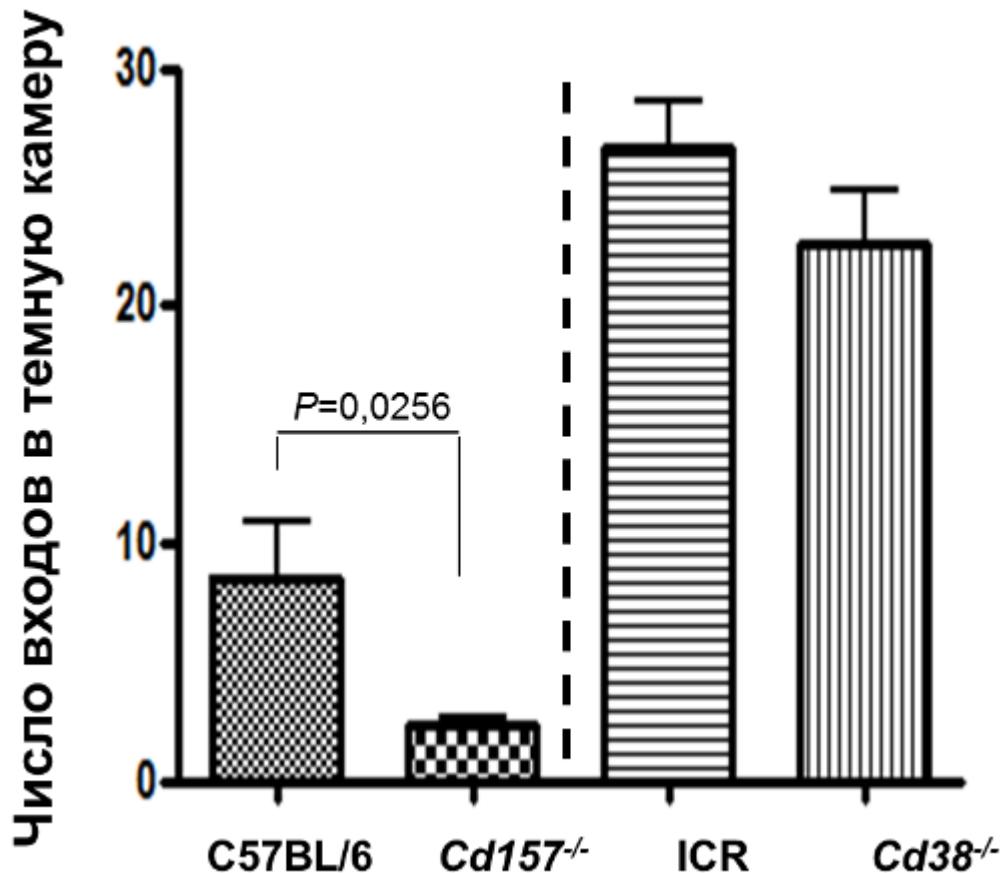


Рисунок 24 Тест «Черно-белая камера» для двух типов нокаутных животных ($Cd38^{-/-}$ и $Cd157^{-/-}$) и двух контрольных групп (ICR и C57BL/6). Число входов в темную камеру у нокаутных животных ($Cd38^{-/-}$ и $Cd157^{-/-}$) и контрольных групп (релевантный генетический фон для $Cd38^{-/-}$ – линия ICR и для $Cd157^{-/-}$ – C57BL/6). Результаты представлены в виде среднего значения \pm S.E.M. n=5-10, t-критерий Стьюдента.

3.1.3 Тревожное поведение и его коррекция

Для подтверждения тревожности у $Cd157^{-/-}$ мышей мы применили тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» как наиболее классический и дополняющий «Открытое поле» и «Черно-белую камеру». Как показано на **рисунке 25А**, $Cd157^{-/-}$ мыши оставались ненадолго в открытых рукавах ($P=0,016$) и дольше находились в закрытых ($P=0,0034$) по сравнению с контрольной

группой. Не было обнаружено различий в общем пройденном расстоянии (**рисунок 25**), что указывает на поведение, связанное с беспокойством и тревожностью у нокаутных мышей.

Чтобы определить, можно ли скорректировать тревожное поведение у *Cd157*^{-/-} мышей фармакологически, мы исследовали диазепам [45], антитревожный препарат, который активирует рецепторы GABA_A, и миртазапин [383], антидепрессант второго поколения с комбинированным серотонинергическим и норадренергическим механизмами [7, 11, 36]. Основываясь на подготовительных экспериментах для определения доз препарата, мы использовали диазепам с концентрацией 1 мг/кг с введением (i.p.) за 30 мин до теста или миртазапин в дозе 1 мг/кг (i.p.) один раз в день в течение 7 последовательных дней.

Однофакторный ANOVA с последующим *post-hoc* Bonferroni's тестом показал, что введение препаратов оказывает значительное влияние на время, проведенное в открытых ($F_{(2,18)}=5,251$, $P=0,0265$; **рисунок 26**) и закрытых ($F_{(2,18)}=8,495$; $P=0,0361$) рукавах у *Cd157*^{-/-} мышей по сравнению с *Cd157*^{+/+} мышами. Оба препарата восстанавливали поведение нокаутных мышей до уровня контрольной группы. Общие дистанции, пройденные в лабиринте, не различались в обработанных и необработанных группах (**рисунок 26**). Эти эксперименты показывают, что тревожное поведение *Cd157*^{-/-} мышей измеримо и устойчиво, фармакологически обратимо к уровню контрольной группы .

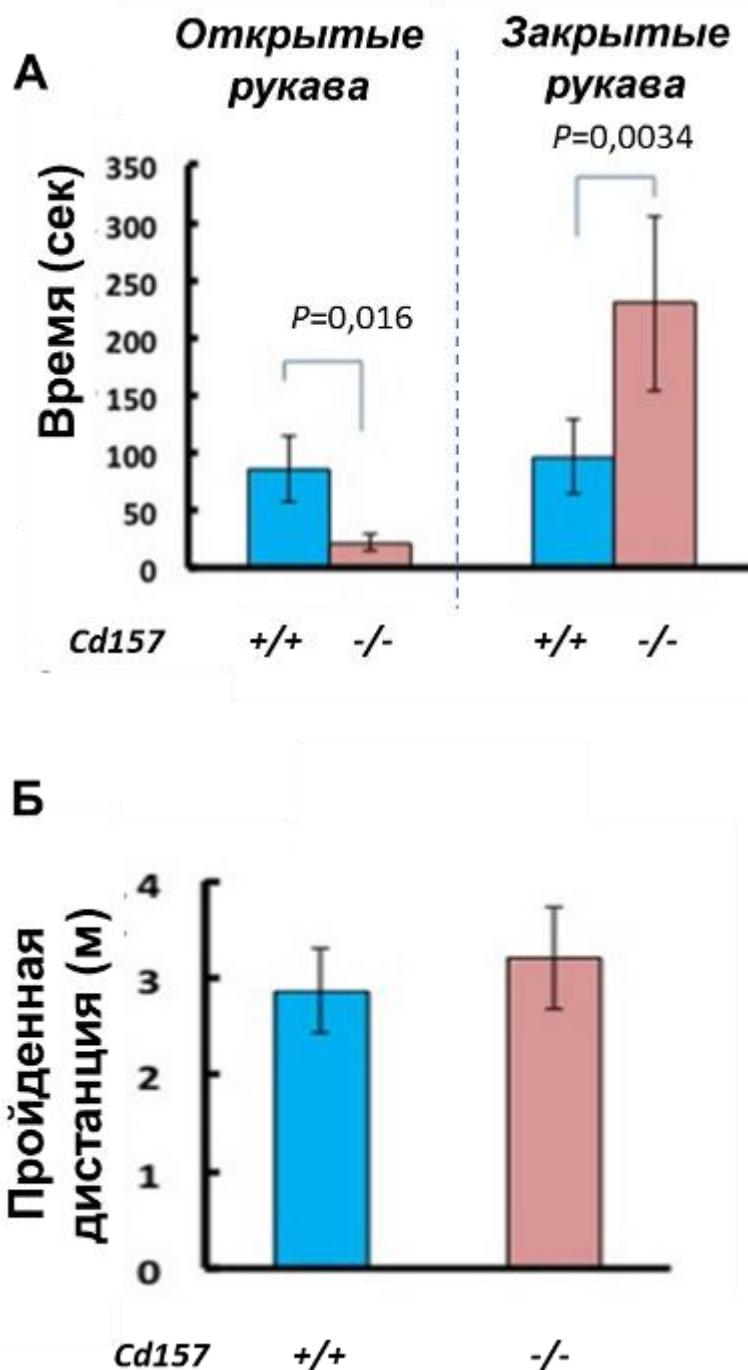


Рисунок 25 Тревожное поведение половозрелых *Cd157*^{-/-} мышей в приподнятом крестообразном лабиринте. (А) время нахождения в открытых и закрытых рукавах; (Б) общая дистанция, пройденная мышью в лабиринте. n=9-10, t-критерий Стьюдента.

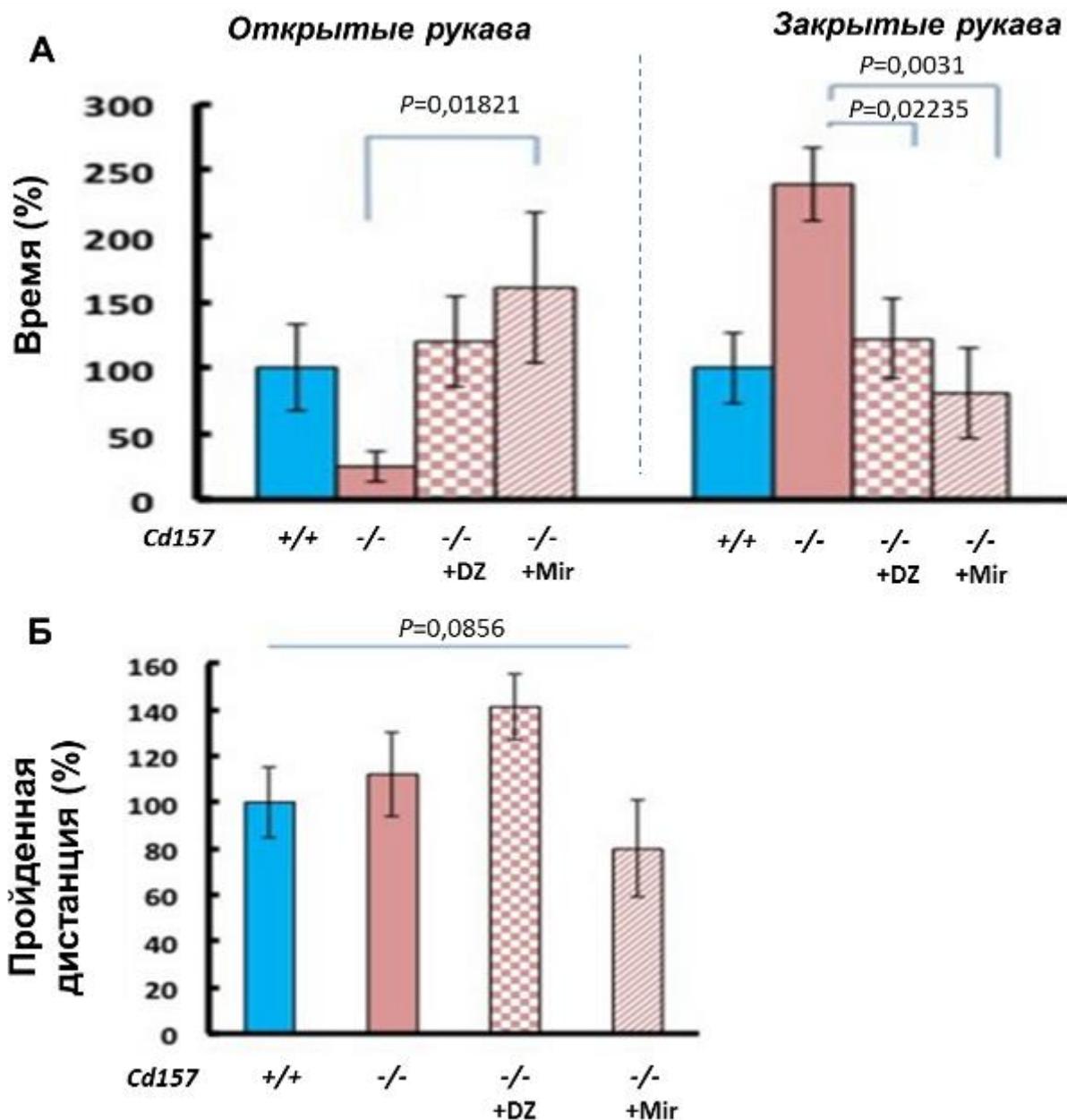


Рисунок 26 Фармакологическая коррекция тревожного поведения половозрелых $Cd157^{-/-}$ мышей в приподнятом крестообразном лабиринте - эффекты диазепама (DZ, 1 мг/кг, i.p.) и миртазапина (Mir, 1 мг/кг, i.p.). (А) время нахождения в открытых и закрытых рукавах; (Б) общая дистанция, пройденная мышью в лабиринте. Лечение миртазапином в течение 7 дней значительно увеличило время нахождения в открытых рукавах $Cd157^{-/-}$ мышей (n=5-10, однофакторный ANOVA с последующим *post-hoc* Bonferroni's тестом). Диазепам и миртазапин значительно уменьшили время, проведенное в закрытых руках для мышей линии $Cd157^{-/-}$ (однофакторный ANOVA с последующим Bonferroni's *post-hoc* тестом). Данные выражены в виде средних значений \pm стандартная

ошибка среднего. Показатели у мышей дикого типа без инъекций обозначены как 100%.

3.1.4 Депрессивно-подобное поведение и его коррекция

Для подтверждения пониженной активности у нокаутных мышей, мы исследовали депрессивно-подобное поведение с использованием тестов «Подвешивание за хвост» и «Принудительное плавание». Было выявлено значительное увеличение неподвижности во время испытаний подвешивания за хвост ($n=20$, $P=0,0195$, **рисунок 27А**) и принудительного плавания ($n=10$, $P<0,0224$, **рисунок 28А**) у $Cd157^{-/-}$ самцов мышей по сравнению с мышами контрольной группы.

Интересно, что $Cd157^{-/-}$ мыши показали своеобразное поведение. Они забирались на стену плавательного бассейна и тратили на это больше времени по сравнению с контрольной группой ($P=0,0013$, **рисунок 28**). Поведение «скалолазания» наблюдалось в течение первых 2 мин у мышей контрольной группы. Они быстро адаптировались к новой среде и прекращали попытки выбраться, но при этом активно держались на воде, работая лапами. Однако, нокаутные животные продолжали попытки вскарабкаться на стену бассейна от начала и до конца периода наблюдения (6 мин) что, потенциально отражает измененное эмоциональное состояние и слабую адаптацию к новому контексту.

В тесте «Подвешивание за хвост» однофакторный ANOVA с последующим Bonferroni's *post-hoc* тестом выявил значительное восстановление эмоционального состояния у $Cd157^{-/-}$ мышей до уровня контрольной группы с использованием двух препаратов, диазепама и миртазапина ($F_{(2,27)}=27,904$, $P=0,0015$, **рисунок 27Б**). Напротив, неподвижность в тесте «Принудительное плавание» была значительно нивелирована до контрольного уровня после введения миртазапина, но не диазепама у $Cd157^{-/-}$ мышей (однофакторный ANOVA с последующим Bonferroni's *post-hoc* тестом; $F_{(2,22)}=4,627$, $P=0,0378$, **рисунок 28В**). Время «скалолазания» в испытании на принудительное плавание

восстанавливалось (с 800 до 350% уровня мышей дикого типа без коррекции) с использованием обоих лекарственных средств (однофакторный ANOVA с последующим Bonferroni's *post-hoc* тестом, $F_{(2,22)}=10,167$, $P=0,001$, **рисунок 28Г**). Этот результат показывает, что депрессивно-подобное поведение достаточно выражено у $Cd157^{-/-}$ мышей, которое обратимо антитревожных или антидепрессивных препаратов.

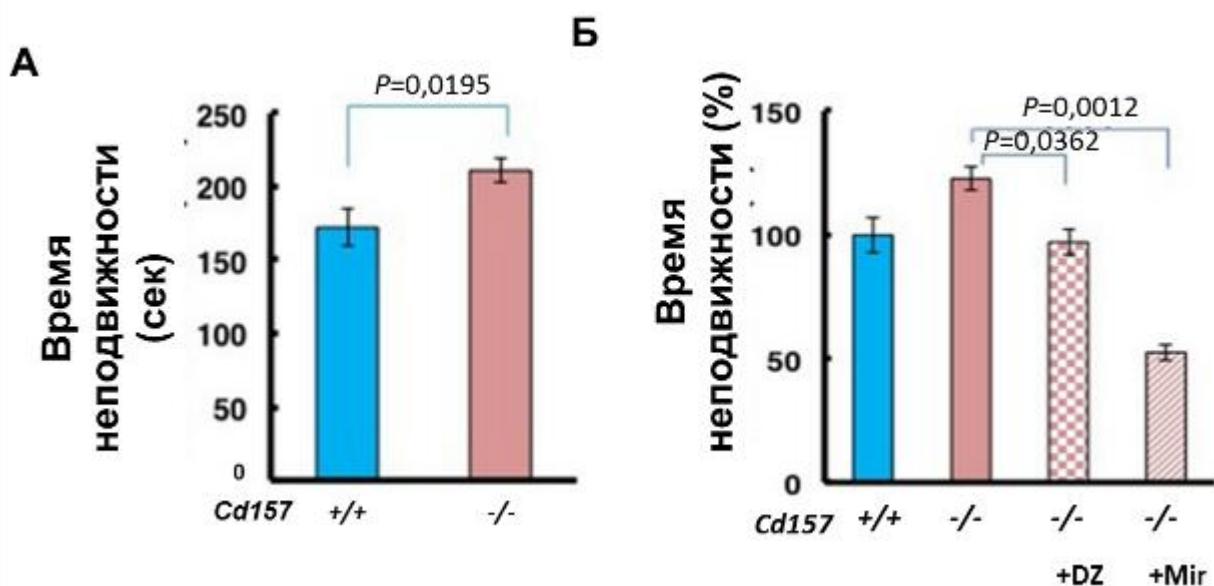


Рисунок 27 Депрессивно-подобное поведение в teste «Подвешивание за хвост» и его фармакологическая коррекция. (А) Время неподвижности больше у $Cd157^{-/-}$ и $Cd157^{+/+}$ мышей ($n=20$ на группу, *t*-критерий Стьюдента); (Б) время неподвижности через 30 мин после одного внутрибрюшинного введения диазепама (DZ, 1 мг/кг) или после хронического введения миртазапина в течение 7 дней (Mir, 1 мг/кг, i.p.) у $Cd157^{-/-}$ мышей. $n=10$ в каждой группе. Данные выражены в виде Mean \pm S.E.M. Значения обозначены как 100% у $Cd157^{+/+}$ мышей без коррекции (однофакторный ANOVA с последующим Bonferroni's *post-hoc* тестом, $n=5-10$ мышей в группе).

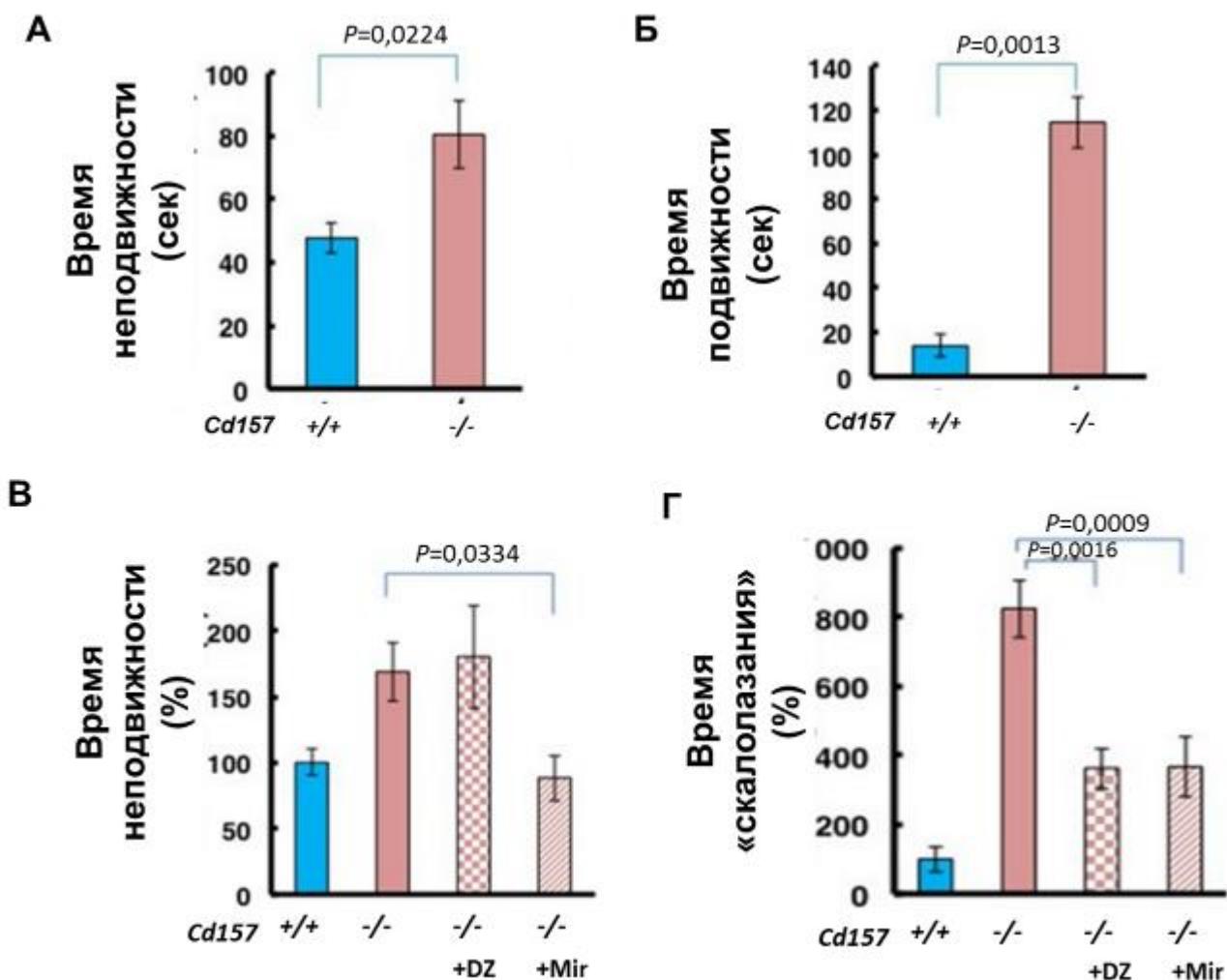


Рисунок 28 Депрессивно-подобное поведение в тесте ««Принудительно плавание» и его фармакологическая коррекция. (А) Время неподвижности, сек; (Б) время подвижности, сек; (В, Г) время неподвижности (В) и время «скалолазания» (Г) через 30 мин после одного внутрибрюшинного введения диазепама (DZ, 1 мг/кг) или после хронического введения миртазапина в течение 7 дней (Mir, 1 мг/кг, i.p.) у *Cd157*^{-/-} мышей. Данные выражены в виде Mean±S.E.M. Значения обозначены как 100% у *Cd157*^{+/+} мышей без коррекции (однофакторный ANOVA с последующим Bonferroni's *post-hoc* тестом, n=5-10 мышей в группе).

3.1.5 Социализация в трехкамерном тесте

Несмотря на проведенные тесты на социализацию в открытом поле, мы выполнили дополнительные испытания на социализацию и социальные предпочтения с использованием трехкамерного лабиринта (рисунок 29). Для этих

экспериментов мышь-мишень ($Cd157^{+/+}$ самец) помещали в левую камеру (Stranger 1, **рисунок 29**), а вторую мышь-мишень ($Cd157^{+/+}$ самка из другой клетки) помещали в правую камеру (Stranger 2, **рисунок 29**). Мыши обоих генотипов не проявляли значимого предпочтения между левой и правой камерой в фазе привыкания (**рисунок 29**). Репрезентативные треки показаны для обоих типов мышей во время сеанса социализации и социального предпочтения (**рисунок 29**). Не было различий в количестве входов в камеру со Stranger 1 у $Cd157^{-/-}$ мышей и контрольной группой ($n=8$, **рисунок 30**). Количество входов в камеру, содержащую социальную цель (Stranger 1), было одинаково у мышей обеих групп и значительно выше, чем количество входов в пустую камеру (двуихфакторный ANOVA, $F_{(2,28)}=73,673$, $P=0,0085$; **рисунок 30**). Процент социализации, который оценивался по проценту времени пребывания мыши в камере с социальным объектом, также был одинаково высок для обоих генотипов ($n=8$, **рисунок 30**).

Когда второй социальный объект (Stranger 2) был помещен в правую камеру, количество входов в правую камеру было меньше у $Cd157$ мышей по сравнению с контрольной группой ($n=8$; двухфакторный ANOVA, эффекты генотипа: $F_{(1,32)}=1,057$, $P=0,0678$; **рисунок 31**). Кроме того, для обеих групп животных количество входов в правую камеру было намного выше, чем количество входов в левую камеру (Stranger 1) (**рисунок 31**). Процент времени, проведенного со вторым социальным объектом (Stranger 2), составил $51,6\pm1,7\%$ для мышей линии $Cd157^{-/-}$ по сравнению с $67,1\pm3,9\%$ для мышей контрольной группы (**рисунок 31**). Таким образом, было выявлено, что $Cd157^{-/-}$ мыши демонстрируют одинаковый уровень социализации, но с присутствием социального избегания и/или искаженного социального предпочтения.

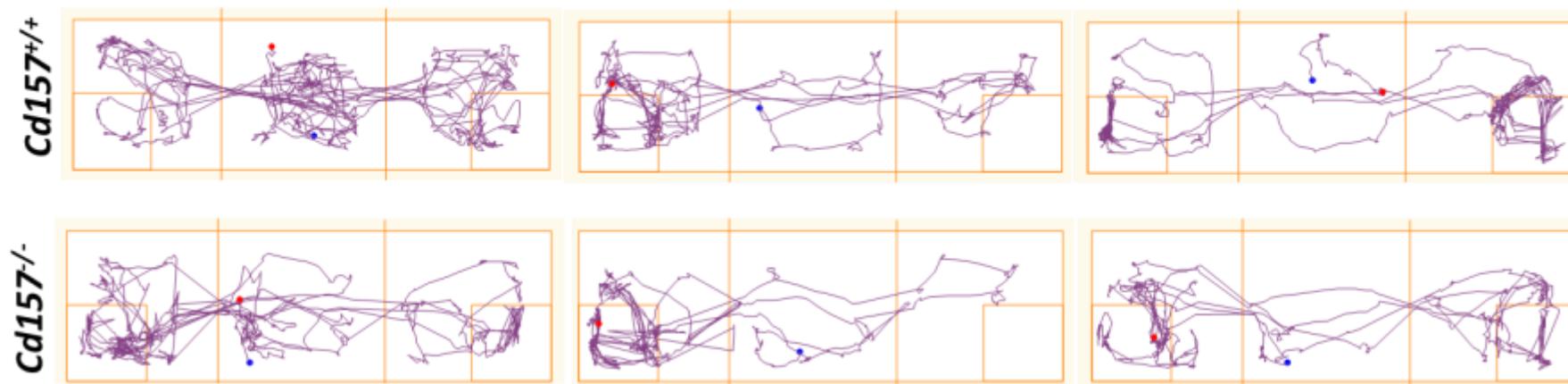
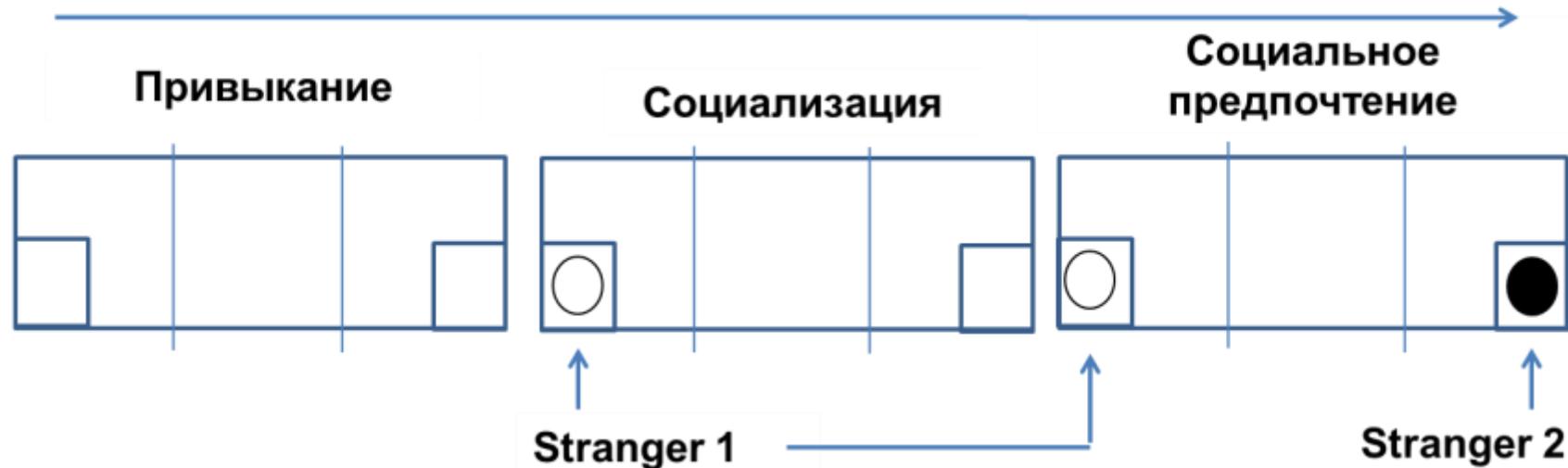


Рисунок 29 Схема эксперимента и репрезентативные треки движения $Cd157^{-/-}$ и $Cd157^{+/+}$ мышей в teste на социализацию. Мыши-стимул (самец, Stranger 1) помещался в левую камеру и в teste на социальное предпочтение, когда новый социальный объект (мыши-самец из другой клетки, Stranger 2) помещали в правую камеру.

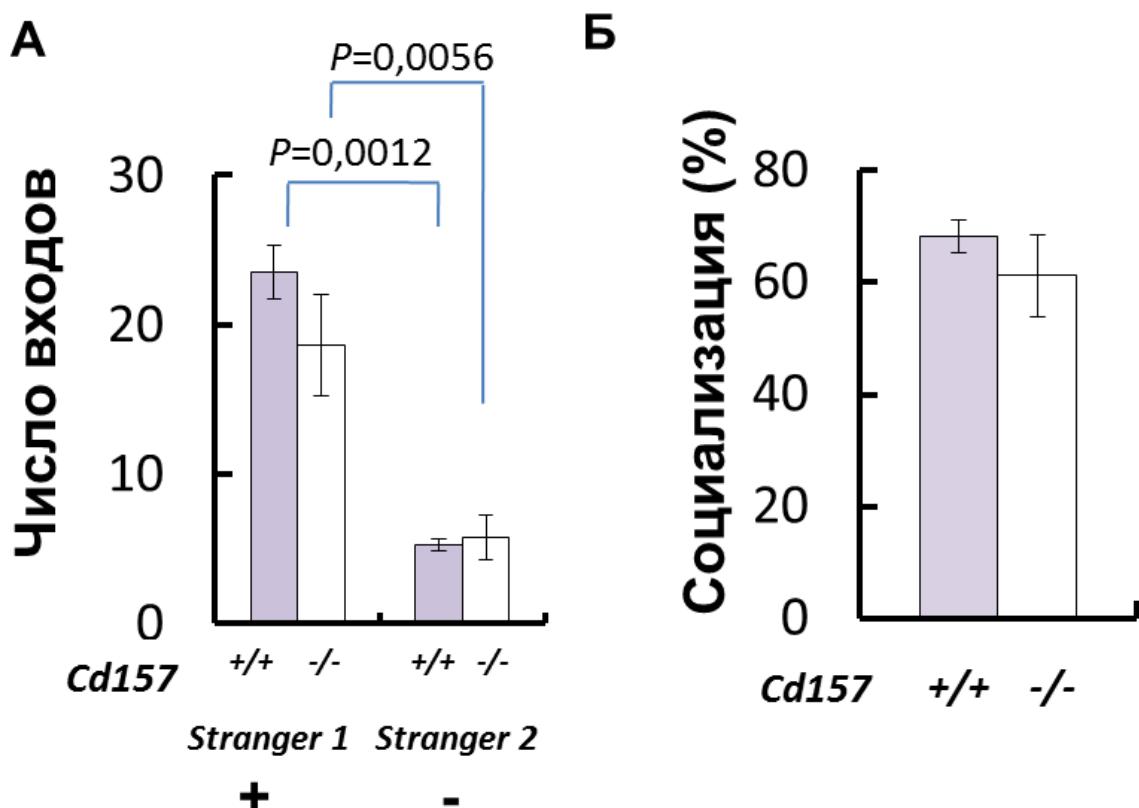


Рисунок 30 Социализация взрослых самцов мышей в трехкамерном лабиринте. (А) Количество входов в камеру со стимулом 1 (мышь-самец дикого типа, Stranger 1) и правую (пустую) камеру (см. схему на **рисунке 29**), n=8, двухфакторный ANOVA с последующим Bonferroni's *post-hoc* тестом. (Б) процент социализации (предпочтение социального объекта), n=8, U-критерий Манна—Уитни. $Cd157^{+/+}$ мыши - серый маркер, $Cd157^{-/-}$ мыши - белый маркер.

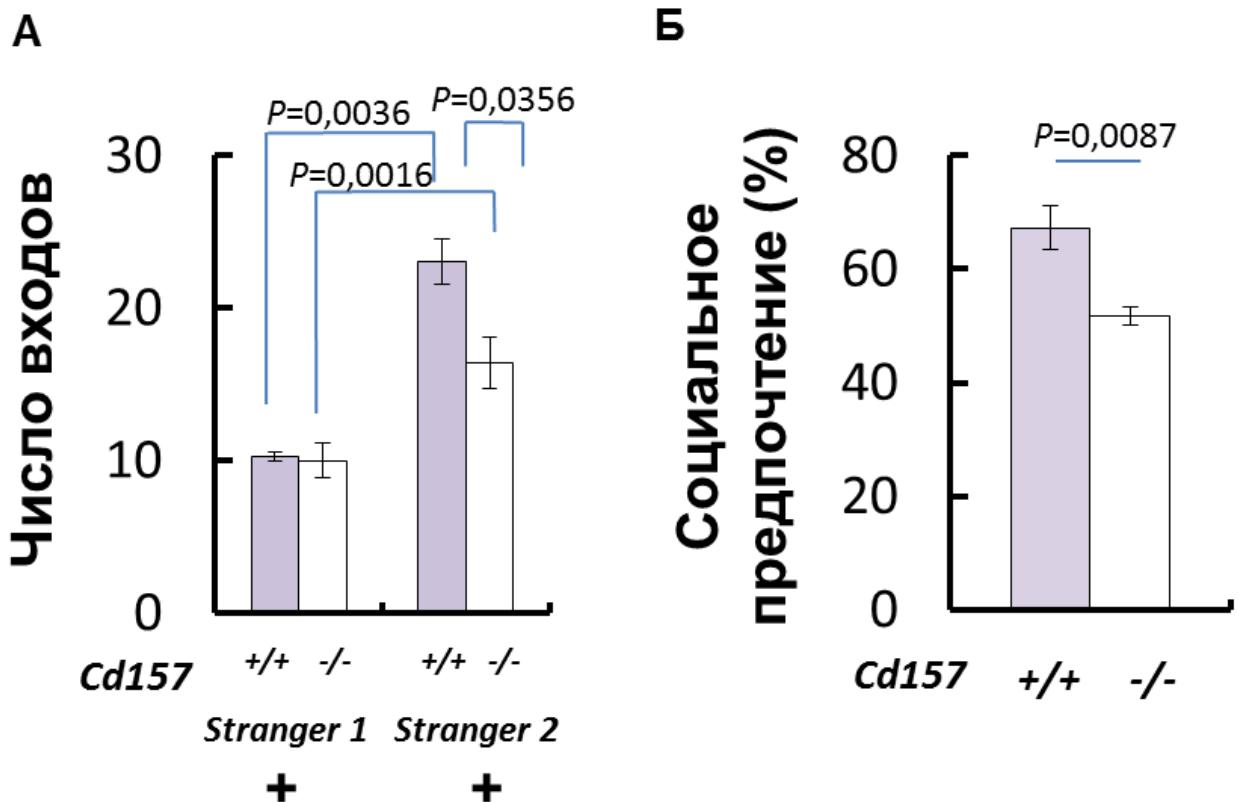


Рисунок 31 Социальное предпочтение самцов мышей в трехкамерном лабиринте. (А) число входов в третьей сессии теста (см. схему на **рисунке 29**), когда в противоположной камере появляется и второй стимул (мышь-самец дикого типа, Stranger 2), n=8, двухфакторный ANOVA с последующим Bonferroni's *post-hoc* тестом. **(Г)** социальное предпочтение (предпочтение стимула 2 стимулу 1), n=8, t-критерий Стьюдента. *Cd157^{+/+}* мыши - серый маркер, *Cd157^{-/-}* мыши - белый маркер.

3.1.6 Эмоциональные ответы *Cd157^{-/-}* мышей в тестах «Fear-conditioning» и «Startle response»

Чтобы подтвердить сенсорные особенности *Cd157^{-/-}* мышей, был измерен их ответ на акустический пугающий стимул. Реакция испуга была значительно повышена у нокаутных мышей по сравнению с мышами дикого типа (предварительный импульс 0 дБ на **рисунке 32**). *Cd157^{-/-}* мыши демонстрировали более высокие реакции испуга почти во всех предстимульных состояниях, за

исключением стимуляции при 90 дБ (рисунок 32Б). Кроме того, сенсорные нарушения наблюдались также во время парадигмы контекстуального страха (рисунок 32В). У *Cd157^{-/-}* мышей наблюдалось более продолжительное время замирания, чем у мышей контрольной группы, что указывает на то, что делеция гена *Cd157* ассоциирована с нарушениями внимания и сенсорным восприятием.

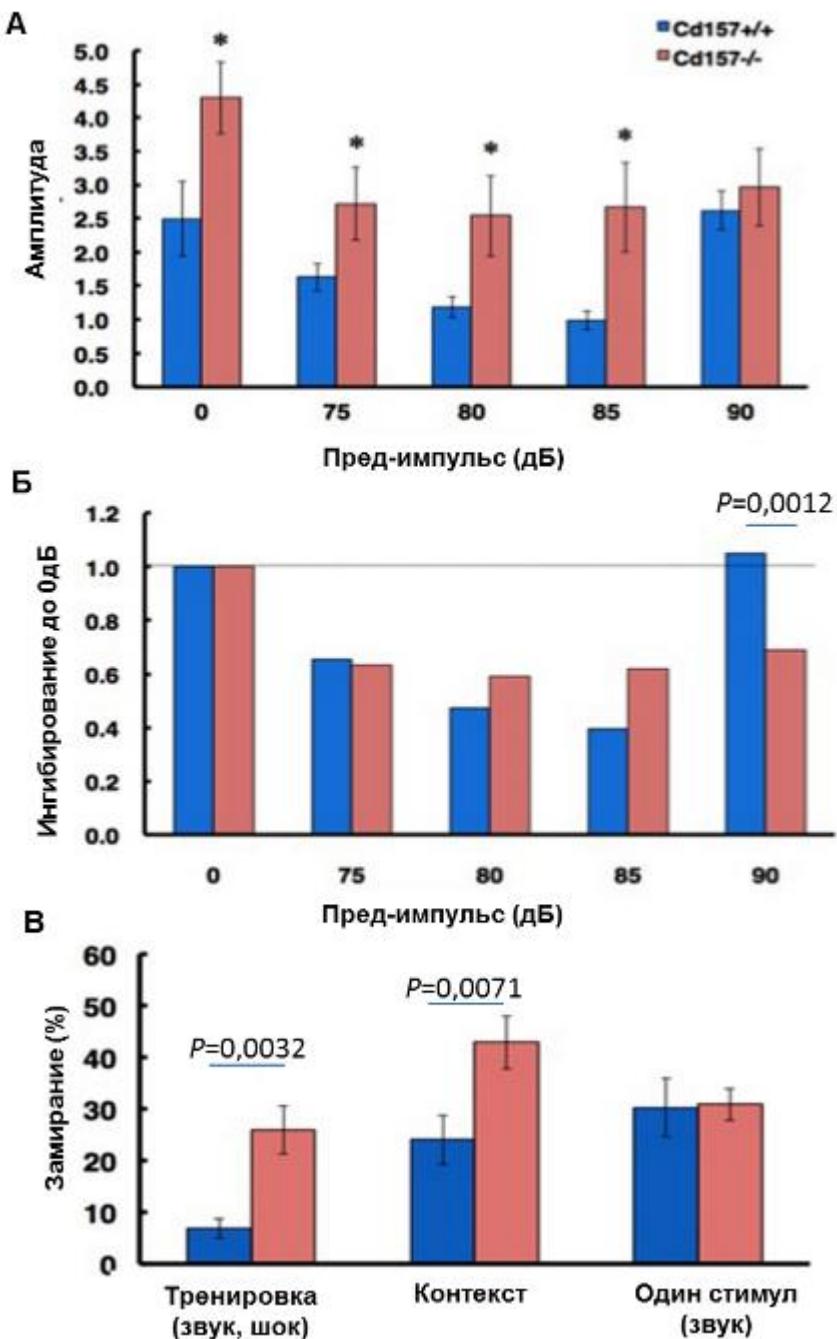


Рисунок 32 Характеристики, связанные с вниманием и чувством страха.

(А) В парадигме подавления пред-импульса, основанной на акустическом испуге, *Cd157^{-/-}* мыши демонстрировали увеличенную амплитуду реагирования от

условий предварительного импульса от 0 дБ до 85 дБ ($*P<0,05$ -сравнение с контрольной группой, t-критерий Стьюдента). **(Б)** Отношение ингибиования у $Cd157^{-/-}$ мышей не отличалось от контрольной группы, но эффект торможения поддерживался с предварительным импульсом 90 дБ. Предварительный импульс 90 дБ был обычно неэффективен у мышей дикого типа. **(В)** Отношение замирания у $Cd157^{-/-}$ мышей было значительно выше на этапах тренировки и в условиях контекста. Данные представлены как Mean \pm S.E.M., n=10, t-критерий Стьюдента.

3.1.7 Коррекция пониженного уровня социализации с помощью экзогенного окситоцина

Основываясь на данных по уровням ОХТ в плазме крови, было изучено влияние экзогенного ОХТ на нарушение эмоционального поведения у $Cd157^{-/-}$ мышей. Был использован двухэтапный тест для оценки социального взаимодействия в открытом поле [83]. Как показано на **рисунке 33А**, у $Cd157^{-/-}$ мышей было обнаружено явное социальное избегание по сравнению с мышами контрольной группы (n=6-7, двухфакторный ANOVA, влияние генотипа, $F_{(1,11)}=94,91$, $P=0,0001$). Мыши контрольной группы показали значительно более высокое социальное взаимодействие по сравнению $Cd157^{-/-}$ мышами с внутрибрюшинной инъекцией PBS (n=6-7, двухфакторный ANOVA, влияние PBS, $F_{(1,11)}=28,59$, $P=0,0001$). Через 20 мин после внутрибрюшинных инъекций ОХТ (100 нг/кг массы тела) $Cd157^{-/-}$ мышам их уровень социализации восстанавливался до уровня контрольной группы (n=6-7, двухфакторный ANOVA – влияние генотипа в группе с инъекцией ОХТ, $F_{(1,11)}=13,01$, $P=0,0001$). Двухфакторный ANOVA выявил значительные эффекты взаимодействия *Фармакологическая Коррекция x Генотип* ($F_{(2,42)}=5,674$, $P=0,0066$, **рисунок 33**).

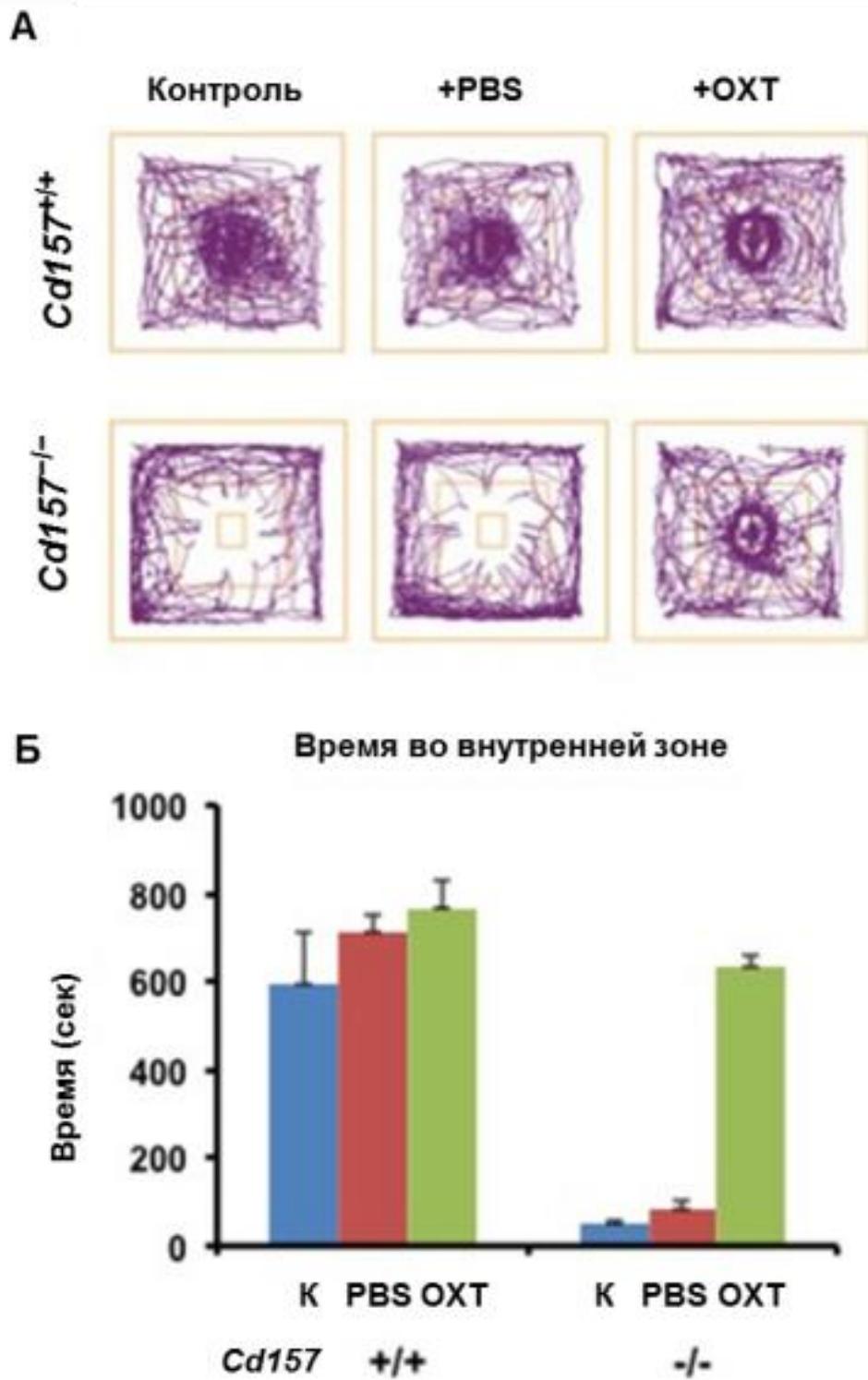


Рисунок 33 Социальное избегание в двухэтапном тесте «Открытое поле». (А) Схематический тест социального взаимодействия. Социальную цель (*Cd157^{+/+}* мышь-самца) помещали в центр сразу после 10-минутного привыкания. Репрезентативные треки *Cd157^{-/-}* и *Cd157^{+/+}* мышей после введения внутрибрюшинного PBS или OXT (100 нг/кг массы тела). (Б) Время, проведенное во внутренней зоне в течение 10-минутного теста у *Cd157^{-/-}* и *Cd157^{+/+}* мышей

после введения PBS или OXT. n=6-7; К - интактный контроль в каждой экспериментальной группе, двухфакторный ANOVA, влияние генотипа при коррекции OXT - $F_{(1,11)}=13,01$; $P<0,0001$.

3.2 Экспрессия CD157 в различные периоды онтогенеза

3.2.1 Экспрессия CD157 в различных областях головного мозга у половозрелых *Cd157^{+/+}* мышей и мышей с делецией гена *Cd157*

Методы имmunогистохимии были применены для анализа иммунореактивности CD157 в различных регионах головного мозга как потенциального маркера неврологических сигналов, лежащих в основе тревожно-депрессивного поведения. Экспрессия CD157 в головном мозге взрослых самцов мышей дикого типа с использованием специфических антител, разработанных против CD157 (**рисунок 34**), была слабой, но отчетливой, в миндалине (базолатеральное миндалевидное ядро, передняя часть, BLA, **рисунок 34**). Однако, идентичная иммунореактивность не была обнаружена у *Cd157^{-/-}* мышей (**рисунок 34**).

Также иммунореактивность CD157 была обнаружена в других регионах головного мозга у мышей дикого типа: центральном амигдалоидном ядре (CeL, **рисунок 35А**), медиальном амигдалоидном ядре, задневисочной части (MePV, **рисунок 35Г**), соматосенсорной коре (первичная соматосенсорная кора, бочковом поле, S1BF, **рисунок 35Б**), медиальной преоптической области (MPOA, **рисунок 35Д**), вторичной соматосенсорной коре (S2, **рисунок 35В**) и дугообразном гипоталамическом ядре (Arc, **рисунок 35Е**) мозга *Cd157^{+/+}* мыши (**приложение Ж, 3**). В других исследованных областях головного мозга была обнаружена незначительная иммунная реактивность или ее вообще не наблюдали: гиппокамп, кора головного мозга, периригинальная кора, ретросплениальная гранулярная область коры или область, прилежащая к ядру. Дальнейшие исследования могут

быть необходимы, поскольку объем миндалевидного тела у нокаутных мышей меньше, чем у контрольной группы.

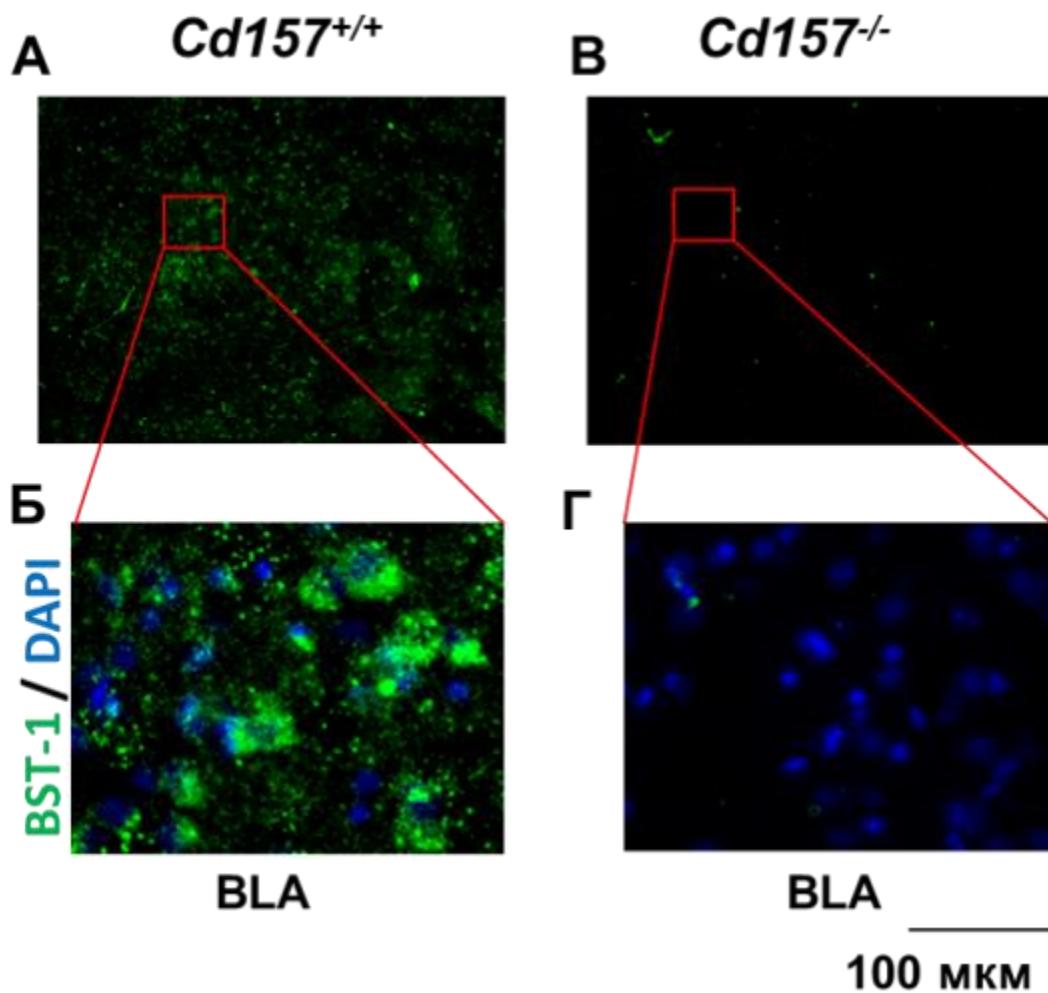


Рисунок 34 Иммуногистохимический анализ экспрессии CD157 в миндалине у взрослых самцов мышей. Срезы головного мозга мышей дикого типа (*Cd157^{+/+}*) и нокаутных (*Cd157^{-/-}*) инкубировали с кроличьей антисывороткой против CD157 мыши. После промывки секции обрабатывали Alexa Fluor 488. Репрезентативные фотографии показывают иммунологическую активность CD157 (зеленый) и Hoechst (DAPI, синий) в тканях головного мозга *Cd157^{+/+}*(А, Б) и *Cd157^{-/-}*(В, Г) мышей. BLA - базолатеральное миндалевидное ядро, передняя часть. Масштабная шкала - 100 мкм.

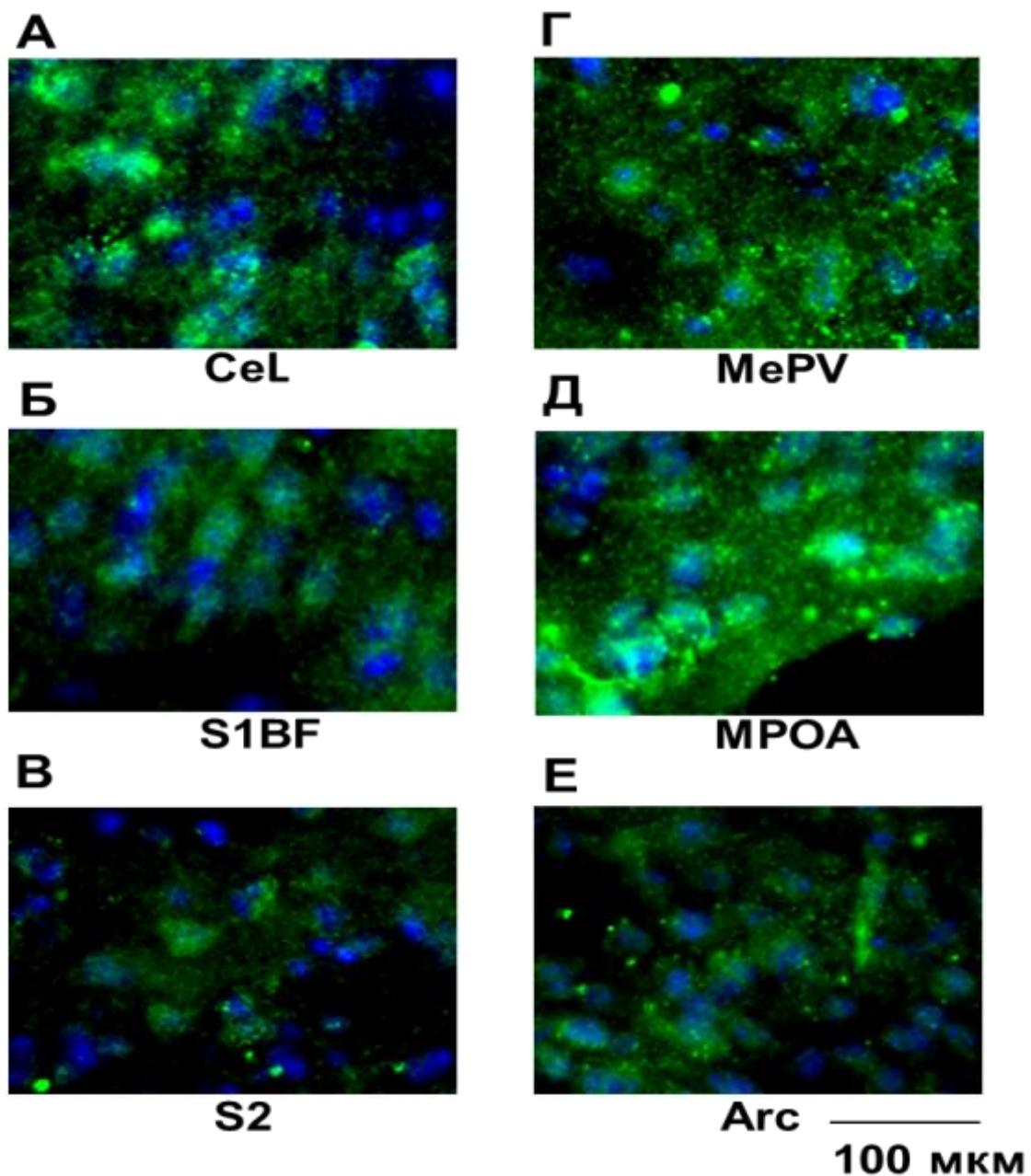


Рисунок 35 Иммуногистохимический анализ экспрессии CD157 в мозге взрослых самцов мышей. Срезы головного мозга мышей дикого типа ($Cd157^{+/+}$) и нокаутных ($Cd157^{-/-}$) инкубировали с кроличьей антисывороткой CD157 мыши. После промывки секции обрабатывали Alexa Fluor 488. Репрезентативные фотографии показывают иммунологическую активность CD157 (зеленый) и Hoechst (DAPI, синий) в тканях головного мозга $Cd157^{+/+}$. Изученные области мозга: (А) центральное амигдалоидное ядро (CeL); (Б) первичная соматосенсорная кора (S1BF); (В) вторичная соматосенсорная кора (S2); (Г) медиальное миндалевидное ядро, задненижняя часть (MePV); (Д) медиальная

преоптическая область (МРОА); (Е) дугообразное гипоталамическое ядро (Arc).
Масштабная шкала - 100 мкм.

Мы наблюдали низкий уровень экспрессии мРНК CD157 в областях головного мозга по сравнению с уровнем экспрессии в селезенке у половозрелых мышей дикого типа (**приложение И**). Еще раз хотелось бы отметить, что была обнаружена слабая, но отчетливая иммунореактивность в миндалине у *Cd157^{+/+}*, но не у *Cd157^{-/-}* (**рисунок 34, 35**), поэтому мы макроскопически изучили мозг мышей двух экспериментальных групп (*Cd157^{+/+}* и *Cd157^{-/-}*). Макроскопические аномалии не были очевидными, и не было различий во влажном весе головного мозга в двух генотипах ($n=20$; $0,43\pm0,4$ г – у *Cd157^{-/-}* мышей, $0,43\pm0,2$ г – у мышей контрольной группы).

Впоследствии мы оценили состояние ткани головного мозга микроскопически. Nissle-окрашивание выполняли на срезах мозга мышей самцов, включая кору и гиппокамп. Наблюдали структурные отклонения или их отсутствие у *Cd157^{-/-}* мышей (**рисунок 36**). Тем не менее, области миндалевидного отростка изменены у *Cd157^{-/-}* мышей, включая заднечелюстную часть миндалевидного отростка (AhiPM), заднюю часть базолатерального ядра амигдалоида (BLP), миндалепириформную область перехода (APir) и заднемедиальное кортикальное миндалевидное ядро (PMCo, **приложение Ж, 3**). Затем мы сравнили миндалину между двумя генотипами по нейрон-специфическому окрашиванию (NeuN, **рисунок 37**). Регион миндалины у *Cd157^{-/-}* мышей меньше по сравнению с контрольной группой. Однако, подсчет количества окрашенных ядер (DAPI) в PMCo показал, что плотность клеток была приблизительно одинаковой у обеих групп мышей: $193,3\pm5,2$ клеток/мкм² – у *Cd157^{+/+}* мышей; $204,5\pm6,0$ клеток/мкм² - у *Cd157^{-/-}* мышей ($n=5$).

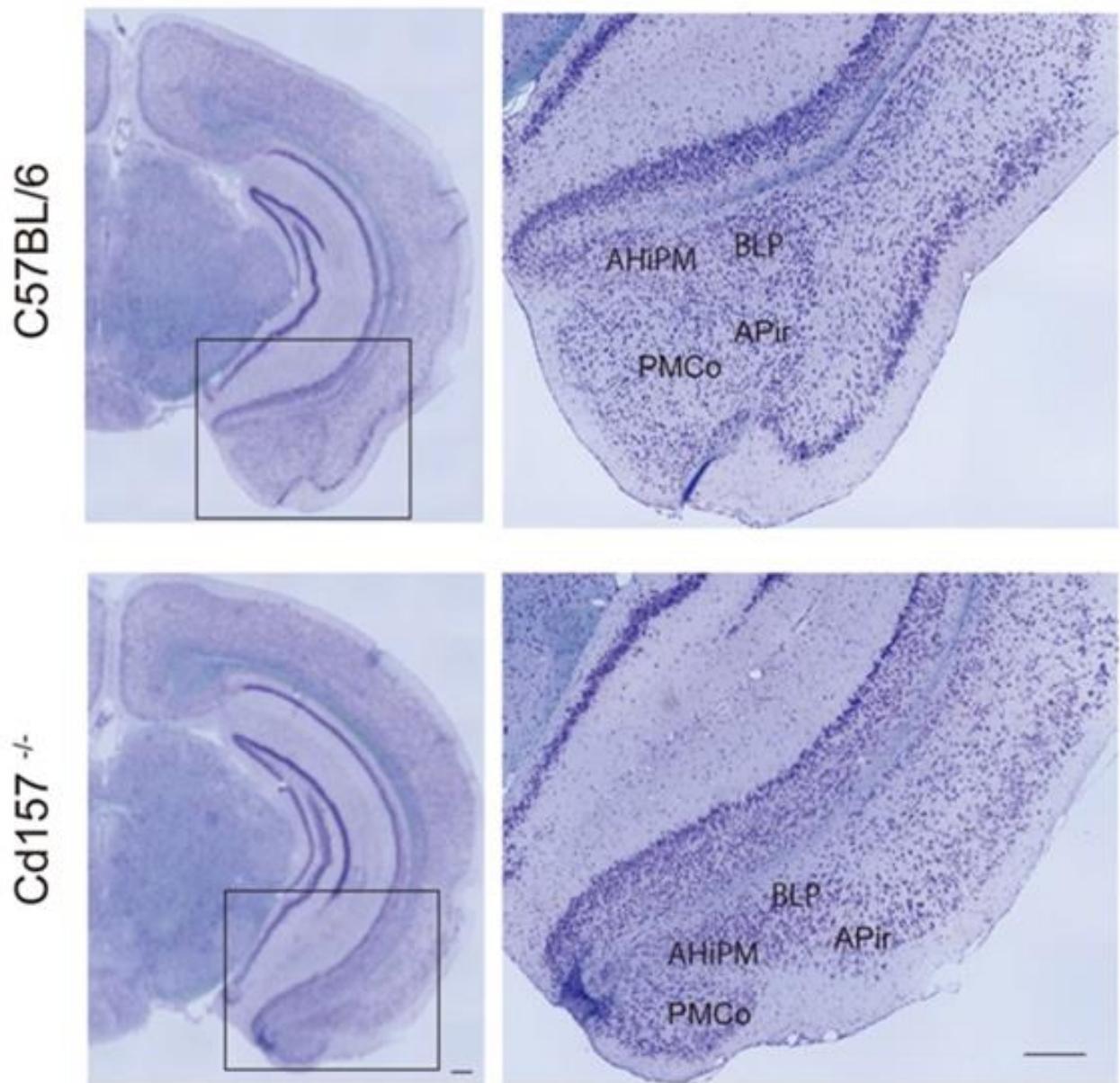


Рисунок 36 Nissle-окрашенные коронарные срезы головного мозга *Cd157^{+/+}* и *Cd157^{-/-}* мышей. Ядра - синий цвет. Вставки - увеличенные области, указанные на фотографиях с меньшим увеличением. Брегма - 3,08 мм. Масштабная линейка - 100 мкм.

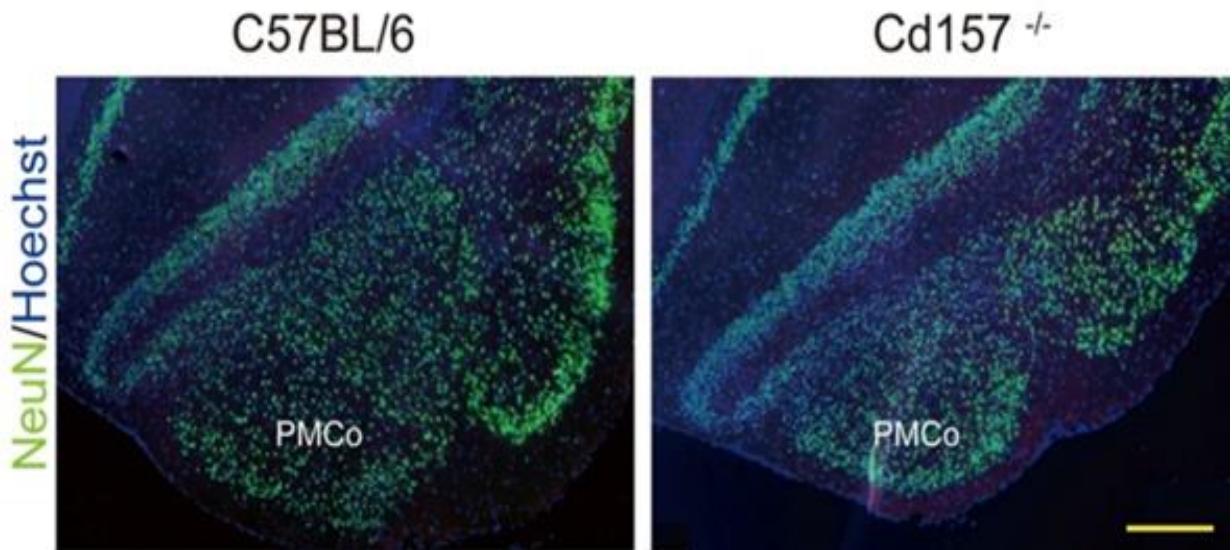


Рисунок 37 Нейрон-специфическое окрашивание срезов головного мозга у *Cd157*^{-/-} и *Cd157*^{+/+} мышей. NeuN-позитивные клетки (нейроны) показаны зеленым цветом, а окрашенные по Hoechst ядра показаны синим цветом. PMCo – заднемедиальное кортикальное миндалевидное ядро. Масштабная линейка: 200 мкм.

Чтобы оценить функциональный ответ миндалины на внешние раздражители, мы проанализировали количество с-Fos-клеток в миндалине мышей обоих генотипов (рисунок 38). Когда мышей подвергали воздействию новой среды в тесте «Открытое поле» в течение 10 минут, количество с-Fos иммунореактивных клеток было менее выраженным у *Cd157*^{-/-} мышей по сравнению с контрольной группой ($n=4$, $P=0,0009$; рисунок 38Б). Эти результаты свидетельствуют о том, что у нокаутных мышей миндалина менее развита, а нейроны в миндалевидном теле ослаблены.

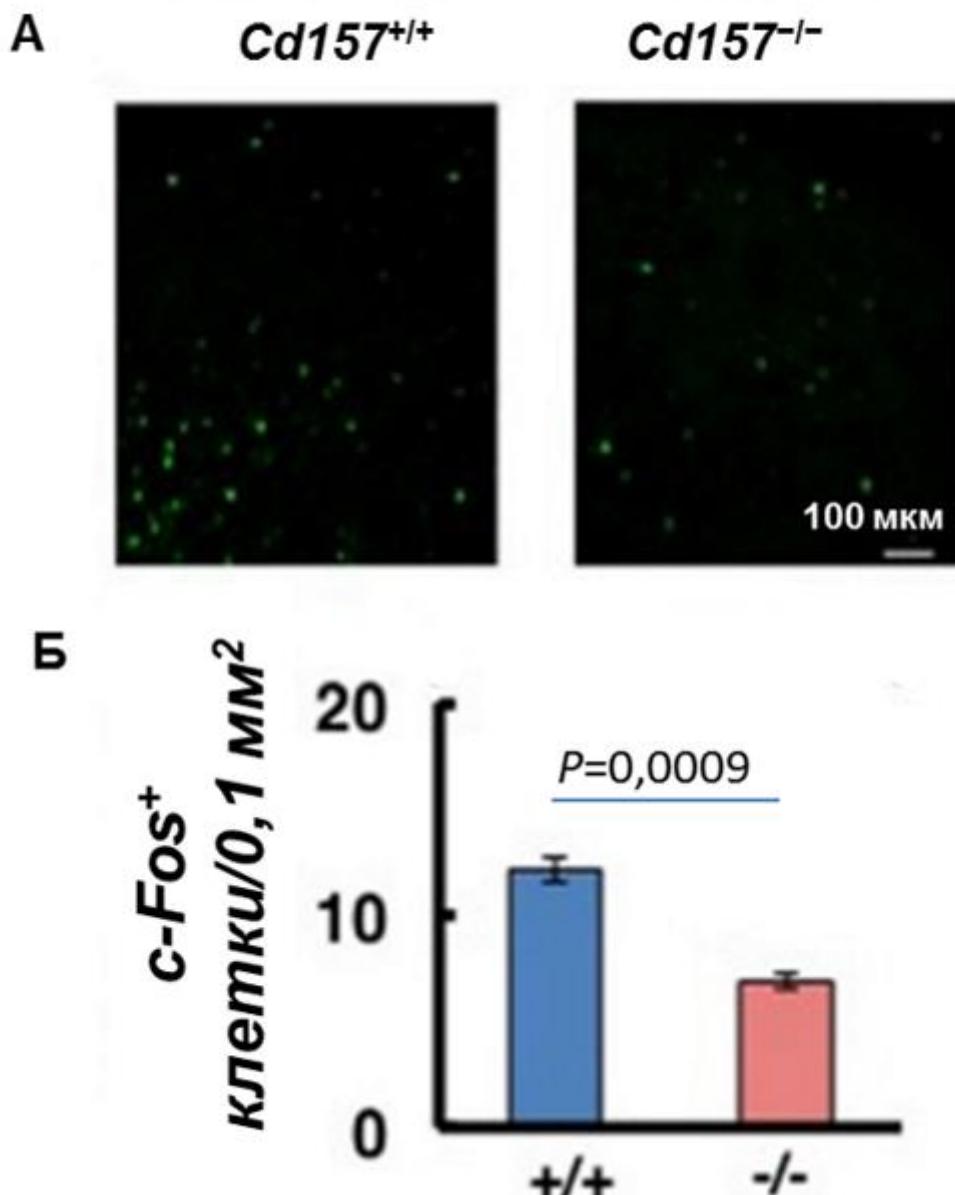


Рисунок 38 c-Fos иммунореактивность в миндалине головного мозга у *Cd157^{-/-}* и *Cd157^{+/+}* мышей. (А) c-Fos-позитивные клетки в миндалевидном ядре у мышей, подвергшихся воздействию новой среды в открытом поле в течение 10 мин. Микрофотографии коронарных срезов, показывающие иммунореактивность c-Fos в виде флуоресценции Alexa 488. (Б) Число c-Fos-иммунореактивных клеток в миндалине у *Cd157^{-/-}* и *Cd157^{+/+}* мышей, как в (А). n=4, U-критерий Манна—Уитни.

3.2.2 Наличие CD157 в стволовых клетках мозга.

Наличие стабильной флуоресценции наблюдали при окраски на CD157 в изображениях, полученных с использованием конфокального микроскопа, в гипоталамусе эмбрионов E17 (рисунок 39). Иммунореактивность CD157 была обнаружена в цитоплазме или на клеточной поверхности многих, но не всех Nestin-позитивных, клеток в желудочковой и субвентрикулярной зонах у третьего желудочка (рисунок 39). Полученные данные были оценены с помощью количественного анализа колокализации [422]. Как показано на рисунке 40, степень перекрытия сигналов флуоресценции превышает 50%. В рамках настоящей работы эта колокализация ограничена эмбриональными стволовыми клетками. Не было исследовано присутствие CD157 в стволовых клетках мозга у взрослых мышей, что требует дополнительных исследований в данном направлении.

3.3. Ферментативная активность CD157

Дополнительный вопрос, который необходимо решить, заключается в том, что функции CD157 в нервных стволовых клетках, а также в клетках головного мозга опосредованы ферментативными продуктами CD157, цАДФ-рибозой и адениндинуклеотидфосфатом никотиновой кислоты (NAADP), которые опосредуют мобилизацию Ca^{2+} из кальциевых пулов [161, 202]. Это было впервые обнаружено в мезенхимных стволовых клетках костного мозга Тао и соавторами [367], который показал, что цАДФ-рибоза является новым регулятором осцилляций $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в человеческих мезенхимальных стволовых клетках. Было показано, что цАДФ-рибоза проникает через клеточную мембрану через переносчики нуклеозидов и усиливает осцилляции $[\text{Ca}^{2+}]_i$ за счет активирования другой молекулы, катионного канала TRPM2, что приводит к усиленному

fosфорилированию ERK1/2, и, тем самым, стимулирует пролиферацию мезенхимальных стволовых клеток человека.

CD157 и CD38 обладают активностью ADP-рибозилцилазы. Активность АДФ-рибозилцилазы CD157 слабее, чем активность CD38 [226]. Однако неясно, обладает ли CD157 другими ферментными активностями, такими как НАД-гликогидролаза или НАД-обменные активности. Продуктом обмена оснований является NAADP [202, 226]. NAADP также имеет способностью высвобождать Ca^{2+} из разных кальциевых пулов [202, 268].

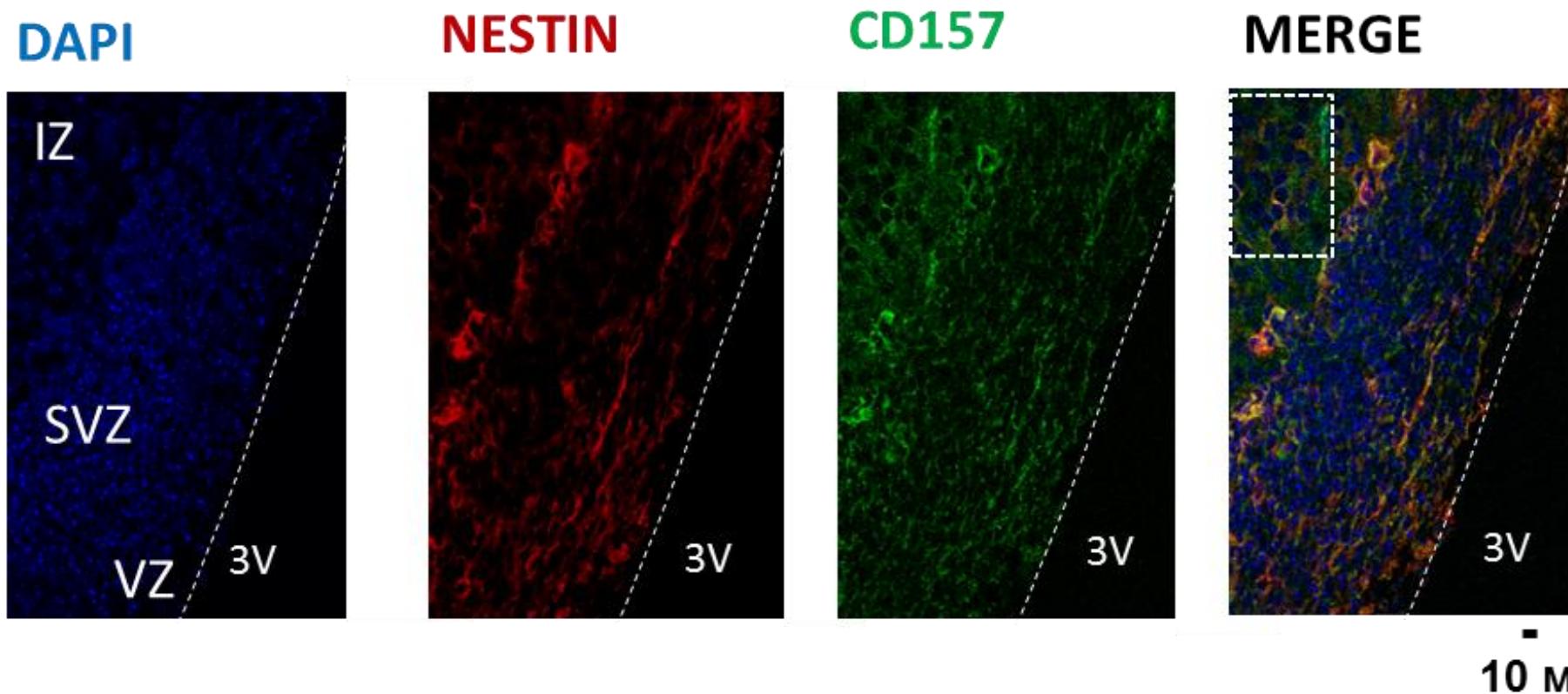


Рисунок 39 Иммуногистохимический анализ экспрессии CD157 в эмбриональном мозге. Иммуногистохимия эмбрионального гипоталамуса E17: CD157 - зеленый цвет, Nestin - красный, и ядра (DAPI) – синий. Зоны гипоталамуса: промежуточная зона (IZ), субвентрикулярная зона (SVZ), желудочковая зона (VZ) и третий желудочек (3V).

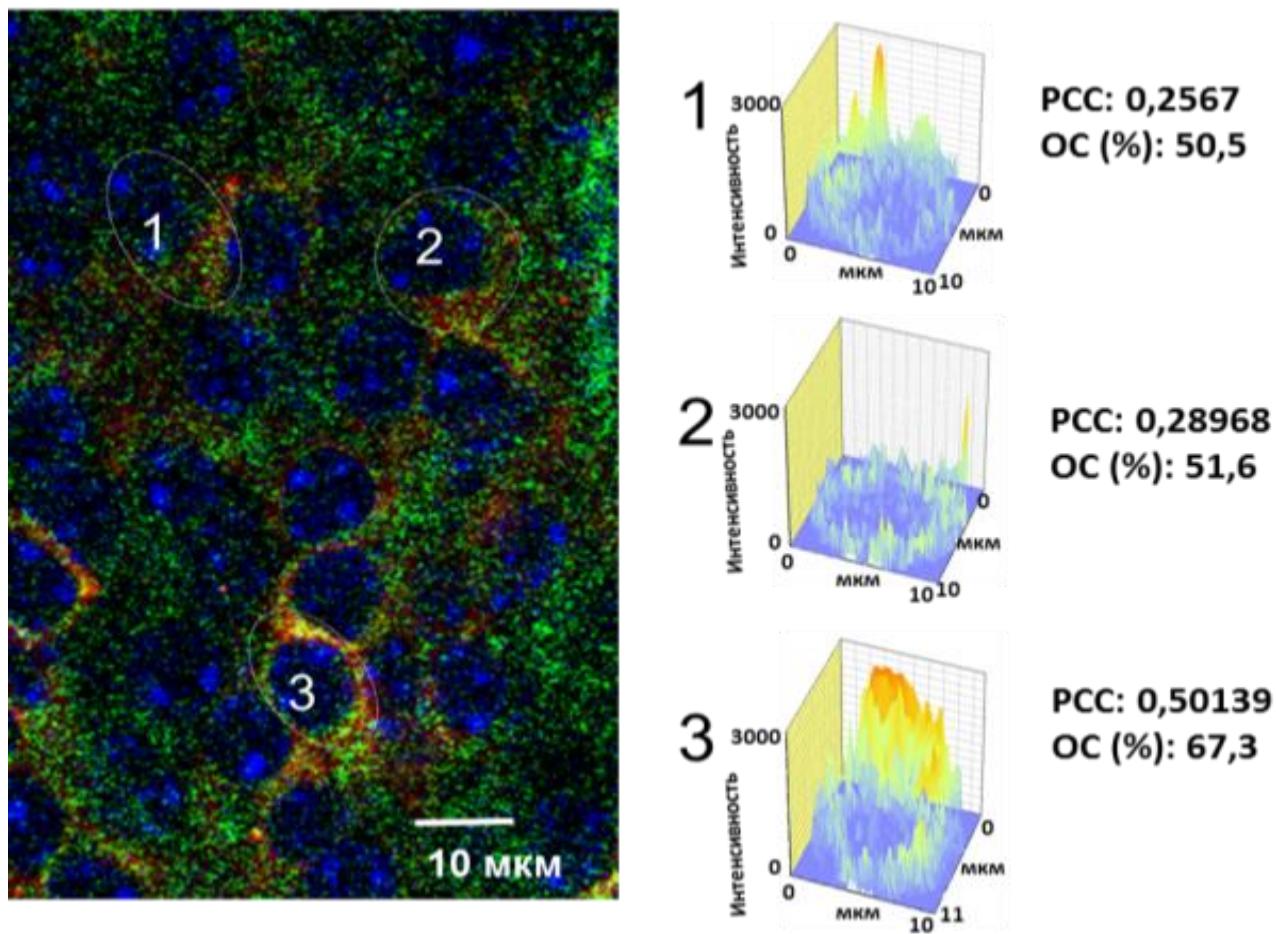


Рисунок 40 Иммуногистохимический анализ экспрессии CD157 в эмбриональном мозге. Увеличенное изображение, указанное в рисунке 39 (квадрат, изображенный пунктирной линией), отображает колокализацию CD157 (зеленый) и Nestin (красный) в отдельных клетках. Диаграммы перекрытия (коллокализации) зеленого (CD157) и красного (Nestin) каналов регистрируемой флуоресценции в трех клетках, указаны на изображении цифрами 1-3. Оси X и Y указывают размер клетки в мкм; Интенсивность сигнала флуоресценции указана по оси Z. Коллокализацию оценивали путем вычисления коэффициента корреляции Пирсона (РСС) и коэффициента перекрытия (ОС).

Были исследовано, обладает ли CD157 двумя ферментными активностями и особенно активностью обмена по основанию, проведя трансфекцию НЕК-клеток генами *Cd157* или *Cd38* мыши. Анализ вестерн-блоттинга показывает полосы

экспрессии белка CD157 и CD38 (рисунок 41А). Активность ADP-рибозилциклизы клеток, с трансфекцией *Cd157*, была выше, чем у трансфектированных вектором контрольных клеток ($P<0,001$) и ниже, чем у *Cd38*-трансфектированных клеток ($n=3$, $F_{(8,34)}=9,01$, $P=0,0001$; однофакторный ANOVA, рисунок 41Б, приложение K). На рисунке 41В показано, что CD157 имеет очень низкую активностью обмена оснований ($F_{(2,37)}=36,26$, $P=0,0001$, $n=3$, однофакторный ANOVA): клетки, трансфектированные CD157, показали отсутствие или небольшую синтезирующую активность NAADP без заметных отличий от векторно-трансфектированного контроля клеток. Напротив, клетки, трансфектированные CD38, обладали значительно более высокой синтетической активностью NAADP по сравнению с контрольными клетками. Таким образом, функциональная роль CD157, вероятно, связана с производством цАДФ-рибозы, а не с NAADP. Было также подтверждено, что производство циклической АДФ-рибозы за счет CD157 не является высоким, в отличие от CD38.

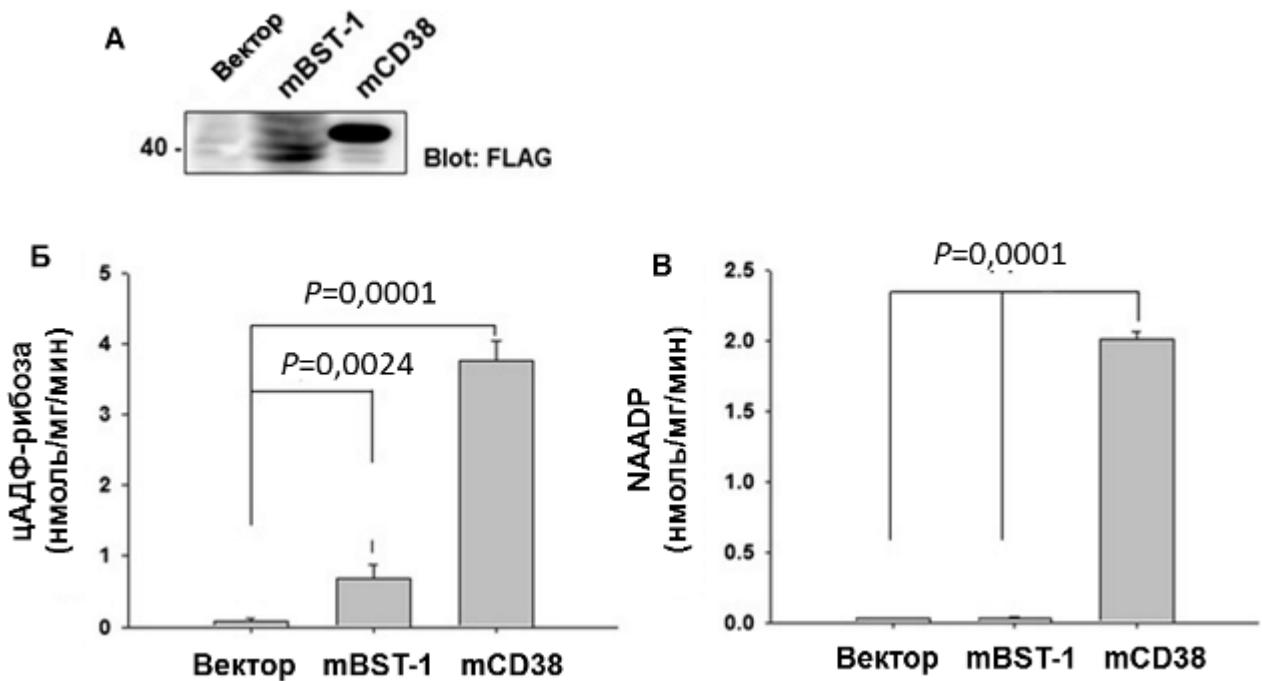


Рисунок 41 Ферментативный синтез цАДФ-рибозы и NAADP с помощью FLAG-слипых белков (mBST-1 и mCD38). (А) Анализ вестерн-блоттинга сливых белков FLAG из клеточных лизатов вектора (50 мкг), мышевого BST-1 (mBST-1, 50 мкг) и мышевого CD38 (mCD38, 10 мкг) с

использованием антитела против FLAG. (Б, В). Активность ферментов для синтеза цАДФ-рибозы и NAADP измеряли путем инкубации очищенных FLAG-слипых белков (вектор, mBST-1 или mCD38) с соответствующими субстратами. Данные представлены в виде среднего значение \pm S.E.M. из трех независимых экспериментов, применен однофакторный ANOVA с последующим Bonferroni's *post-hoc* тестом.

3.4 Активность АДФ-рибозилциклизы

3.4.1 Активность АДФ-рибозилциклизы и уровень окситоцина в плазме крови у половозрелых мышей с делецией гена *Cd157*

Дефицит CD157 влияет на метаболизм гормона окситоцина, который, как предполагается, играет роль в формировании нейропсихологических особенностей индивидуумов [167, 168, 225]. Ранее было показано, что дефицит CD38 (другого крупного члена семейства NADаз/АДФ-рибозилциклиз, который имеет 30% гомологию с CD157 [225, 252]), был связан с резким снижением уровня ОХТ в плазме крови и изменениями в материнском поведении [167, 168, 193].

Поэтому следующим шагом явилось исследование активности АДФ-рибозилциклизы. Существенных различий в активности АДФ-рибозилциклизы в гипоталамусе ($1584,1 \pm 53,1$ пмоль/мин/мг белка у *Cd157^{+/+}* мышей; $1509,2 \pm 71,5$ пмоль/мин/мг белка - у *Cd157^{-/-}* мышей) и гипофизе ($126,7 \pm 17,2$ пмоль/мин/мг белка у *Cd157^{+/+}* и $106,3 \pm 8,7$ пмоль/мин/мг белка у *Cd157^{-/-}* мышей соответственно) между двумя генотипами не наблюдали.

Измерение уровня ОХТ в плазме крови показали, что концентрация ОХТ у *Cd157^{-/-}* мышей ($457,1 \pm 54,1$ пг/мл, $n=6$) была значительно ниже, чем у мышей контрольной группы ($623,5 \pm 46,1$ пг/мл, $n=6$, $P=0,01$).

3.4.2 Экспрессия мРНК у новорожденных и взрослых самцов мышей

В подтверждение вышеизложенного, мы провели исследование уровня экспрессии мРНК CD157 и CD38 в головном мозге *Cd157^{+/+/-}* мышей-самцов. Экспрессия CD157 мРНК заметно снижалась в течение 7-14 дней постнатального периода относительно высоких уровней в эмбриональном периоде (**рисунок 42А**). Тогда как экспрессия CD38 мРНК нарастала к 14 дню постнатального развития, и была выше в 25 раз по сравнению с первым постнатальным днём.

Уровни экспрессии мРНК CD157 в различных областях головного мозга (большого мозга, мозжечка, гипоталамуса и стриатума) были крайне низкими по сравнению с уровнями в селезенке у взрослых самцов мышей C57BL/6 (n=5; однофакторный ANOVA, $F_{(2,40)}=195,94$, $P=0,0001$, **рисунок 42Б**). В отличие от этого мРНК CD38 экспрессировалась обильно в четырех исследованных областях мозга без существенного различия в плотности по регионам, хотя эти плотности были значительно ниже, чем в селезенке (n=4, однофакторный ANOVA, $F_{(4,20)}=9,78$, $P=0,0001$). В совокупности эти исследования экспрессии мРНК и белка показывают довольно отчетливые профили экспрессии CD38 и CD157.

3.5 CD38 и CD157 в процессах нейрогенеза

Делеция гена *Cd38* и *Cd157* ассоциирована с нарушениями поведения, характерными для ряда нейропсихических заболеваний. Нарушение социализации, социального распознавания, состояния тревожности связано с процессами обучения и памяти, тогда как развитие аутизма ассоциировано с нарушением синаптогенеза [26, 37], а рассогласованность в нейрон-глиальных сетях при перинатальном поражении головного мозга – с активностью CD38 [30].

Субгранулярная зона зубчатой извилины гиппокампа и стриатум – области головного мозга, в которой постоянно идут процессы нейрогенеза во взрослом возрасте у человека [2, 6]. У грызунов, взрослые нейроны также появляются в обонятельной луковице. Поэтому было интересно оценить процессы нейрогенеза

и синаптогенеза в субгранулярной зоне зубчатой извилины у взрослых особей мышей линий *Cd157*^{-/-} и *Cd38*^{-/-} с помощью методов иммуногистохимии, а так же оценить экспрессию CD157 и CD38 в клетках астログлиальной природы в ольфакторных луковицах у животных с экспериментальной нейродегенерацией.

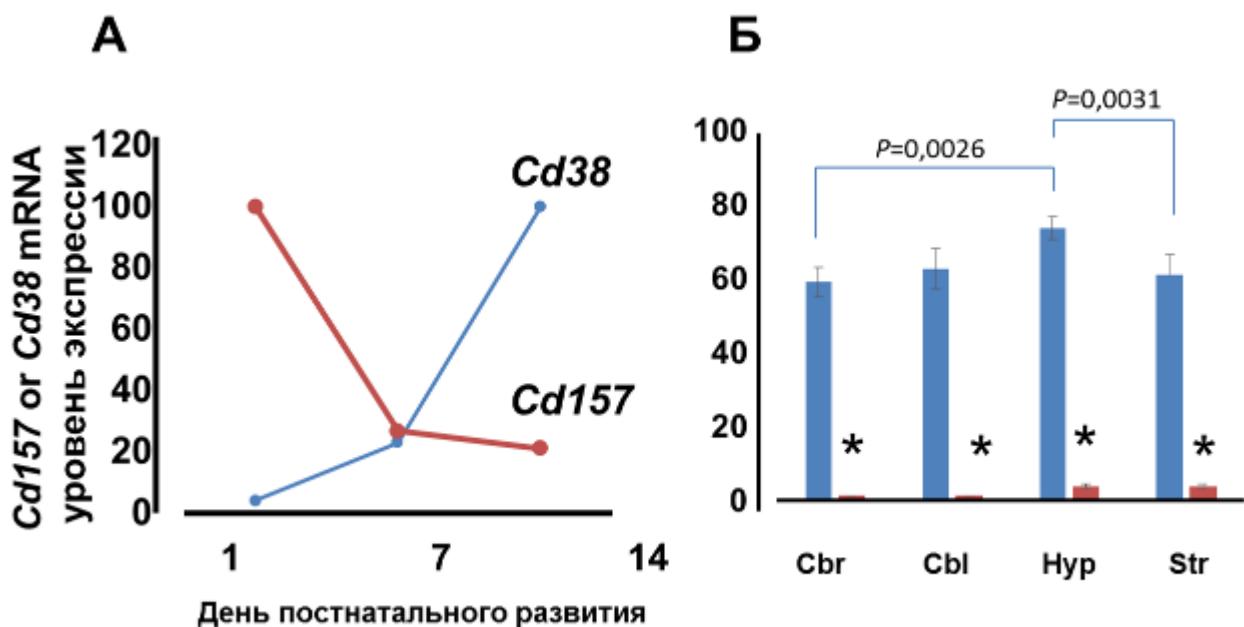


Рисунок 42 Экспрессия мРНК CD157 и CD38 в головном мозге. (А)

Схематическое изображение временного хода экспрессии мРНК в головном мозге *Cd157*^{-/-} мышей-самцов в постнатальные дни 1, 7 и 14. Сто процентов относятся к значениям в постнатальные дни 1 и 14 для CD157 и CD38 соответственно. (Б) Количественные данные экспрессии мРНК CD157 (красный маркер) и CD38 (синий маркер) в четырех областях головного мозга взрослых самцов мышей, полученных с помощью ОТ-ПЦР анализа и использованием β -актиновой мРНК в качестве внутреннего контроля. Данные представлены в виде процентов \pm S.E.M. (n=5 – число независимых экспериментов) от CD157/актина в селезенке, принятими за 100%. Двухфакторный ANOVA с последующим Bonferroni's *post-hoc* тестом. *P=0,0001 – сравнение CD157 с CD38. Cbr – большой мозг, Cbl – мозжечек, Hyp – гипоталамус, Str – стриатум.

3.5.1 CD38 и CD157 в процессах нейрогенеза

Было обнаружено, что делеция гена *Cd157* вызывает снижение пролиферации нейрональных клеток-предшественников в субгранулярной зоне зубчатой извилины, что видно по значительному снижению экспрессии маркера Nestin у *Cd157*^{-/-} мышей в субгранулярной зоне зубчатой извилины по сравнению с мышами дикого типа C57BL/6 (1,43±2,36% и 8,0±2,41%, соответственно, $P=0,0039$).

Также была выявлена тенденция к снижению экспрессии маркера нейробластов (MAP2) в субгранулярной зоне зубчатой извилины у мышей, дефицитных по *Cd157* (12,64±4,44%) по сравнению с контрольной группой (25,12±5,77%, $P=0,0410$). Однако, не было найдено различий в экспрессии маркера незрелых нейронов (DCX) в экспериментальной и контрольной группах, что свидетельствует о том, что CD157 не контролирует количество незрелых нейронов.

Было обнаружено, что нокаут по гену *Cd38*, так же как и дефицит *Cd157*, вызывает снижение пролиферации нейрональных клеток-предшественников в субгранулярной зоне зубчатой извилины. Наблюдалось значительное снижение количества Nestin⁺ клеток у *Cd38*^{-/-} мышей (10,30±3,83%) в субгранулярной зоне зубчатой извилины по сравнению с мышами дикого типа ICR (57,92±6,19%, $P=0,0024$) и ассоциировано с тенденцией к снижению экспрессии маркера нейробластов (MAP2) в субгранулярной зоне зубчатой извилины у мышей, дефицитных по *Cd157* (22,62±6,48%) по сравнению с контрольной группой (40,75±5,13%, $P=0,0334$).

Интересно, что оба гена *Cd157*, *Cd38* участвуют в образовании незрелых нейронов, что видно по значительному снижению экспрессии маркера незрелых нейронов (DCX) в экспериментальной (7,00±1,51%) и контрольной (47,31±3,79%, $P=0,0154$) группах.

Таким образом, CD157 и CD38 участвуют в пролиферации нейрональных клеток. При этом CD157 не влияет на количество незрелых нейронов, тогда как CD38 оказывает противоположное влияние.

3.5.2 CD38 и CD157 в процессах синаптогенеза

Было показано, что в субгранулярной зоне зубчатой извилины у *Cd157^{-/-}* мышей выявлено статистически значимое снижение экспрессии маркера постсинаптической плотности PSD95 ($18,79\pm1,88\%$) по сравнению с контролем ($40,51\pm0,13\%$, $P=0,0089$, **рисунок 43**). Такое же наблюдение было сделано и при делеции гена *Cd38* ($8,95\pm1,41\%$) в сравнении с контролем ($46,43\pm1,43\%$, $P=0,0008$, **рисунок 44**).

Результаты исследования экспрессии Staufen (РНК-связывающий белок, участвующий в локализации и транспорте дендритной мРНК; маркер нейрональных РНК гранул) в зубчатой извилине гиппокампа у *Cd157^{-/-}* мышей и мышей дикого типа C57BL/6 показали отсутствие статистически значимых различий ($67,07\pm4,28\%$ и $69,19\pm5,67\%$, соответственно, $P=0,7834$) (**рисунок 43**). Тогда как, наличие CD38 оказывает значительное влияние на экспрессию данного белка ($60,07\pm9,94\%$ - *Cd38^{-/-}*, $92,90\pm5,25\%$ - *Cd38^{+/+}*, $P=0,0034$, **рисунок 44**).

При изучении экспрессии MAP2, ассоциированного с микротрубочками белка, в зубчатой извилине гиппокампа у *Cd157^{-/-}* и *Cd38^{-/-}* мышей была выявлена тенденция к снижению экспрессии данного маркера по сравнению с мышами контрольных групп (**рисунок 43, 44**).

Делеция гена *Cd157* статистически значимо ассоциирована со снижением экспрессии синаптофизина (Synaptophysin), а нокаут по гену *Cd38* приводит к полному отсутствию Synaptophysin+ клеток (**рисунок 43, 44**).

Благодаря проведенным исследованиям, становится очевидным, что отсутствие CD157 и CD38 ингибирует процессы синаптогенеза, что сопровождается снижением экспрессии маркеров синаптической пластичности.

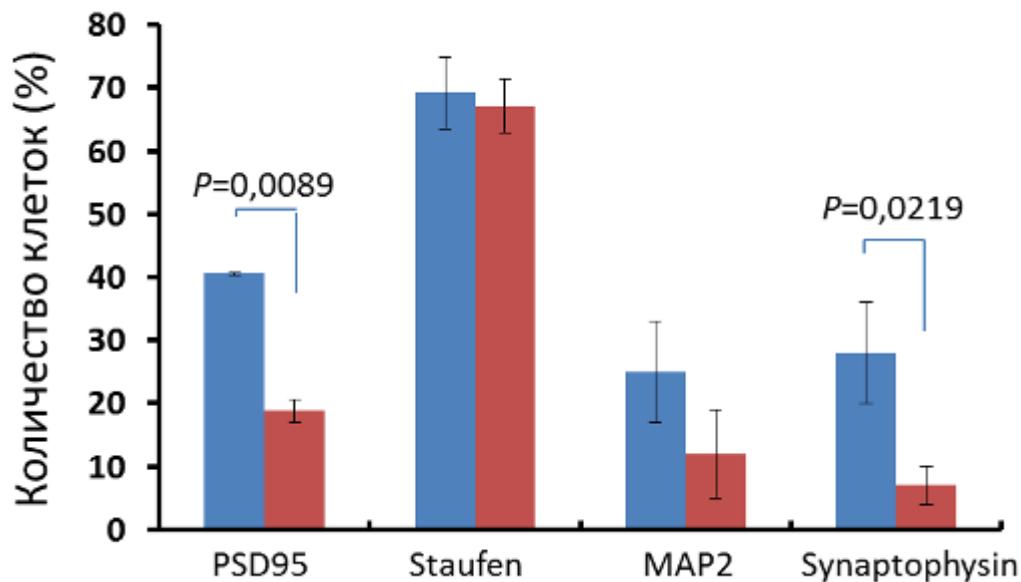


Рисунок 43 Дефицит процессов синаптогенеза при делеции гена *Cd157*.

Экспрессия маркеров синаптогенеза (PSD95, Staufen, MAP2, Synaptophysin) в субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа у *Cd157^{-/-}* (красный маркер) и контрольной группы мышей (*Cd157^{+/+}*, синий маркер). Количество положительных клеток представлено в процентах от общего количества клеток в поле зрения (оценивали 5 полей зрения). Двухфакторный ANOVA (влияние генотипа - $F_{(1,32)}=36,26, P=0,0007$) с последующим Bonferroni's *post-hoc* тестом.

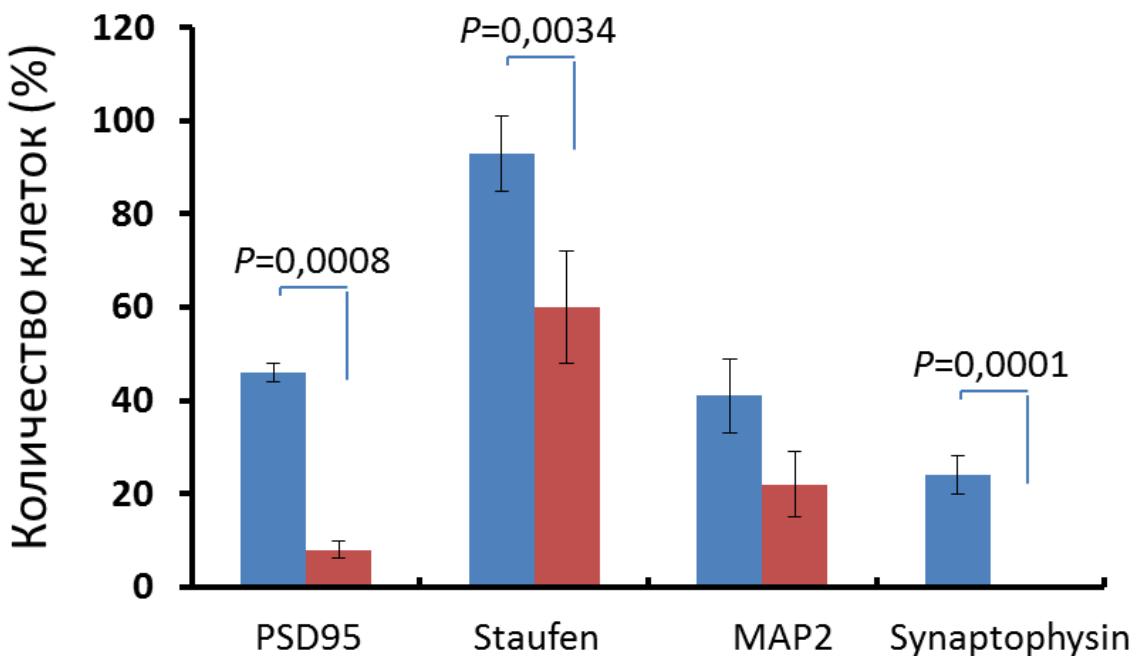


Рисунок 44 Дефицит процессов синаптогенеза при делеции гена *Cd38*.

Экспрессия маркеров синаптогенеза (PSD95, Staufen, MAP2, Synaptophysin) в субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа у *Cd38^{-/-}* (красный маркер) и контрольной группы мышей (*Cd38^{+/+}*, синий маркер). Количество положительных клеток представлено в процентах от общего количества клеток в поле зрения (оценивали 5 полей зрения). Двухфакторный ANOVA (влияние генотипа - $F_{(1,37)}=42,21, P=0,0003$) с последующим Bonferroni's *post-hoc* тестом.

3.5.3. Особенности экспрессии CD38 и CD157 в клетках астроглиальной природы при экспериментальной нейродегенерации

Ольфакторные луковицы чувствительны к нейродегенеративным изменениям. Поэтому именно этот регион головного мозга был выбран для оценки экспрессии CD38 и CD157 при нейродегенерации.

При исследовании экспрессии CD38 в клетках микроглии (MAC-1, CD18/CD11b-иммунопозитивные клетки) ольфакторных луковиц мы не выявили статистически значимых различий ($P=0,25$), хотя наблюдали тенденцию к

увеличению экспрессии CD38 клетками микроглии данного региона при нейродегенерации ($10,00 \pm 2,77$ против $5,96 \pm 1,31\%$ группы с ложной операцией). При этом экспрессия CD38 на GFAP+ астроцитах обонятельных луковиц не отличается между анализируемыми группами. Вместе с тем нами выявлено статистически значимое увеличение экспрессии CD38 в S100 β + клетках ($11,83 \pm 2,04\%$) в сравнении с ложно-оперированными животными ($5,27 \pm 0,69\%$, $P=0,014$; **таблица 1**).

Мы обнаружили значимое увеличение экспрессии CD157 клетками микроглии при нейродегенерации в ольфакторных луковицах ($4,12 \pm 1,52\%$) по сравнению с контрольной группой ложно-оперированных животных ($0,72 \pm 0,38\%$, $P=0,027$). Также статистически значимое увеличение экспрессии CD157 было зафиксировано на астроцитах, экспрессирующих GFAP, при нейродегенерации ($5,74 \pm 1,45\%$) по сравнению с ложно-оперированным контролем ($1,03 \pm 0,39\%$, $P=0,05$). В S100 β + астроцитах экспрессия CD157 имела тенденцию к увеличению ($P=0,086$, **таблица 2**).

Таким образом, мы установили, что развитие нейродегенерации сопровождается увеличением экспрессии CD38 и CD157 в клетках микроглии, возможно ассоциированное с их активацией. Увеличение экспрессии CD38 в S100beta+ астроцитах может быть связано с мобилизацией внутриклеточного кальция, астроцитозом, миграцией клеток.

Таблица 1 Количество CD38+ клеток микроглии и астроцитов (%) в ольфакторных луковицах в норме и при нейродегенерации

Группы животных	Тип клеток		
	Микроглия (MAC-1, CD18/CD11b)	Астроциты (GFAP+)	Астроциты (S100 β +)
Нейродегенерация	10,0\pm2,77	8,34\pm3,0	11,83\pm2,04
Ложная операция	5,96\pm1,31	7,16\pm1,17	5,27\pm0,69
P (t-критерий Стьюдента)	0,25	1,0	0,014

Таблица 2 Количество CD157+ клеток микроглии и астроцитов (%) в ольфакторных луковицах в норме и при нейродегенерации

Группы животных	Тип клеток		
	Микроглия (MAC-1, CD18/CD11b)	Астроциты (GFAP+)	Астроциты (S100 β +)
Нейродегенерация	4,12\pm1,52	5,74\pm1,45	2,45\pm1,48
Ложная операция	0,72\pm0,38	1,03\pm0,39	0,46\pm0,08
P (t-критерий Стьюдента)	0,027	0,05	0,086

3.6 Особенности развития и ультразвуковой коммуникации в период грудного вскармливания у *Cd157* нокаутных мышей

Выявленные нами нарушения в поведении и обнаруженный дефицит процессов нейрогенеза и нейропластичности у взрослых особей *Cd157* нокаутных мышей побудили нас исследовать особенности развития нокаутных животных в период грудного вскармливания до момента отлучения от матери.

3.6.1 Результаты теста «Открытое поле» в экспериментальной модели аутизма

В тесте на индивидуальную локомоторную активность *Cd157^{-/-}* мыши (PND3) отличались статистически значимой повышенной активностью ($1,7 \pm 0,3$ пересеченных квадратов/3 мин) по сравнению с контрольной группой ($0,7 \pm 0,4$ пересеченных квадратов/3 мин) на 3 день постнатального развития. Не было обнаружено разницы между генотипами мышей по количеству пересеченных квадратов в тесте «Открытое поле» на 7 и 10 дни постнатального развития (рисунок 45).

3.6.2 Групповая активность мышей самцов в «открытом поле»

В тесте на групповую локомоторную активность *Cd157^{-/-}* мыши отличались статистически значимой повышенной активностью, быстрее сближались и занимали меньшую площадь по сравнению с контрольной группой на 3 день постнатального развития (рисунок 46). Не было обнаружено разницы между группами *Cd157^{+/+}* и *Cd157^{-/-}* мышей-самцов по площади занимаемой территории в тесте «Открытое поле» на 7 и 10 дни постнатального развития (рисунок 47).

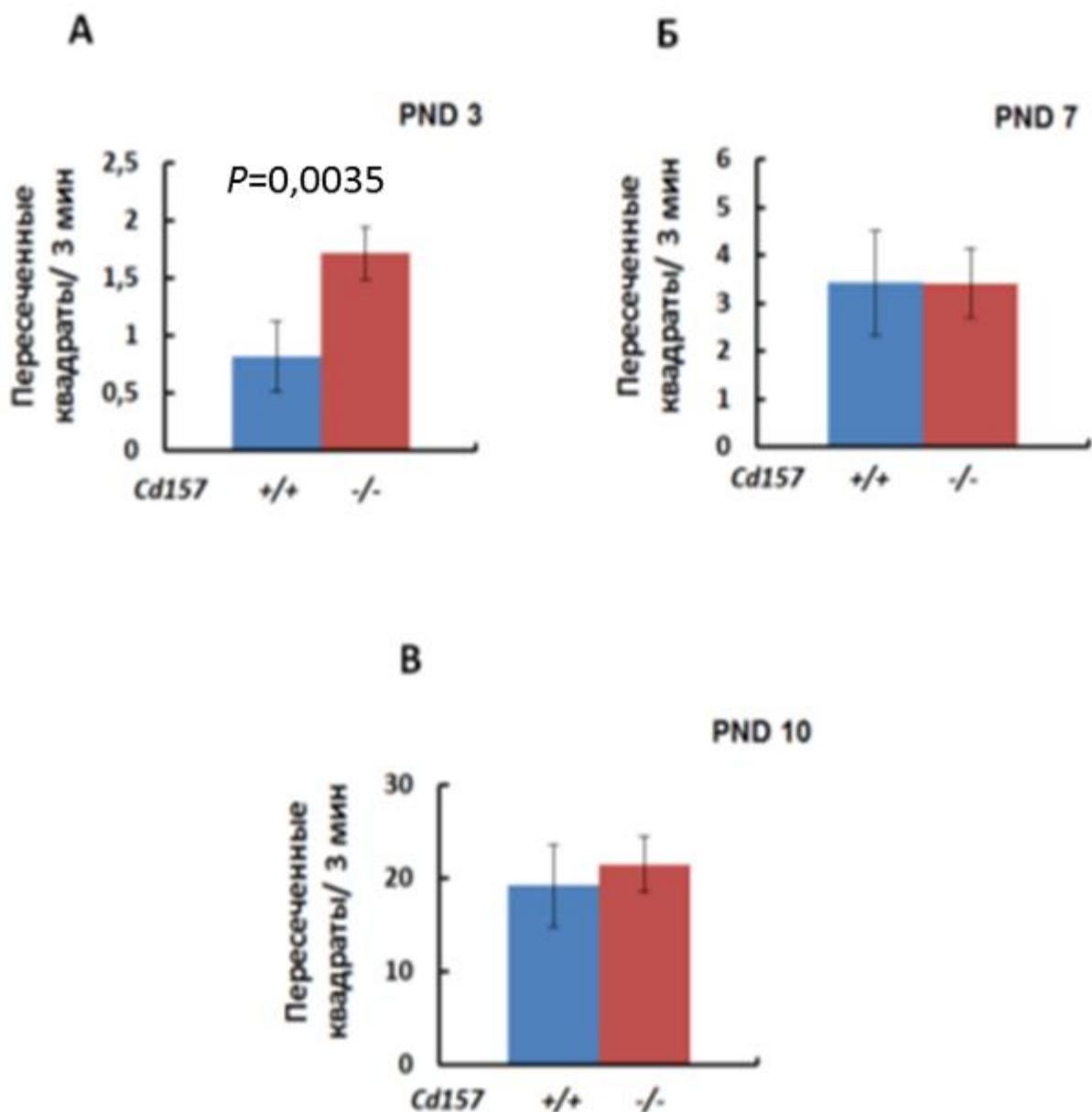


Рисунок 45 Индивидуальная локомоторная активность в тесте «Открытое поле» *Cd157*^{+/+} и *Cd157*^{-/-} мышей на 3 (А), 7 (Б) и 10 (В) день постнатального развития. $n=18-20$, *t*-критерий Стьюдента.

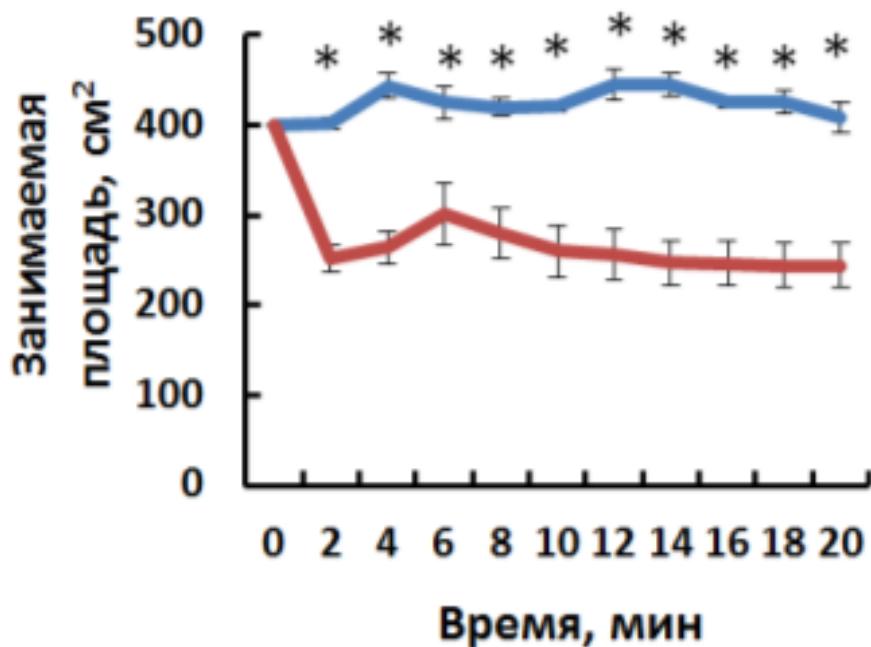


Рисунок 46 Групповая локомоторная активность в тесте «Открытое поле» групп *Cd157^{+/+}* и *Cd157^{-/-}* мышей-самцов на 3 день постнатального развития. $n_{\text{групп}}=6-10$. * $P<0.05$, сравнение с *Cd157^{+/+}* (t-критерий Стьюдента). Красный маркер - *Cd157^{-/-}*, синий маркер - *Cd157^{+/+}*.

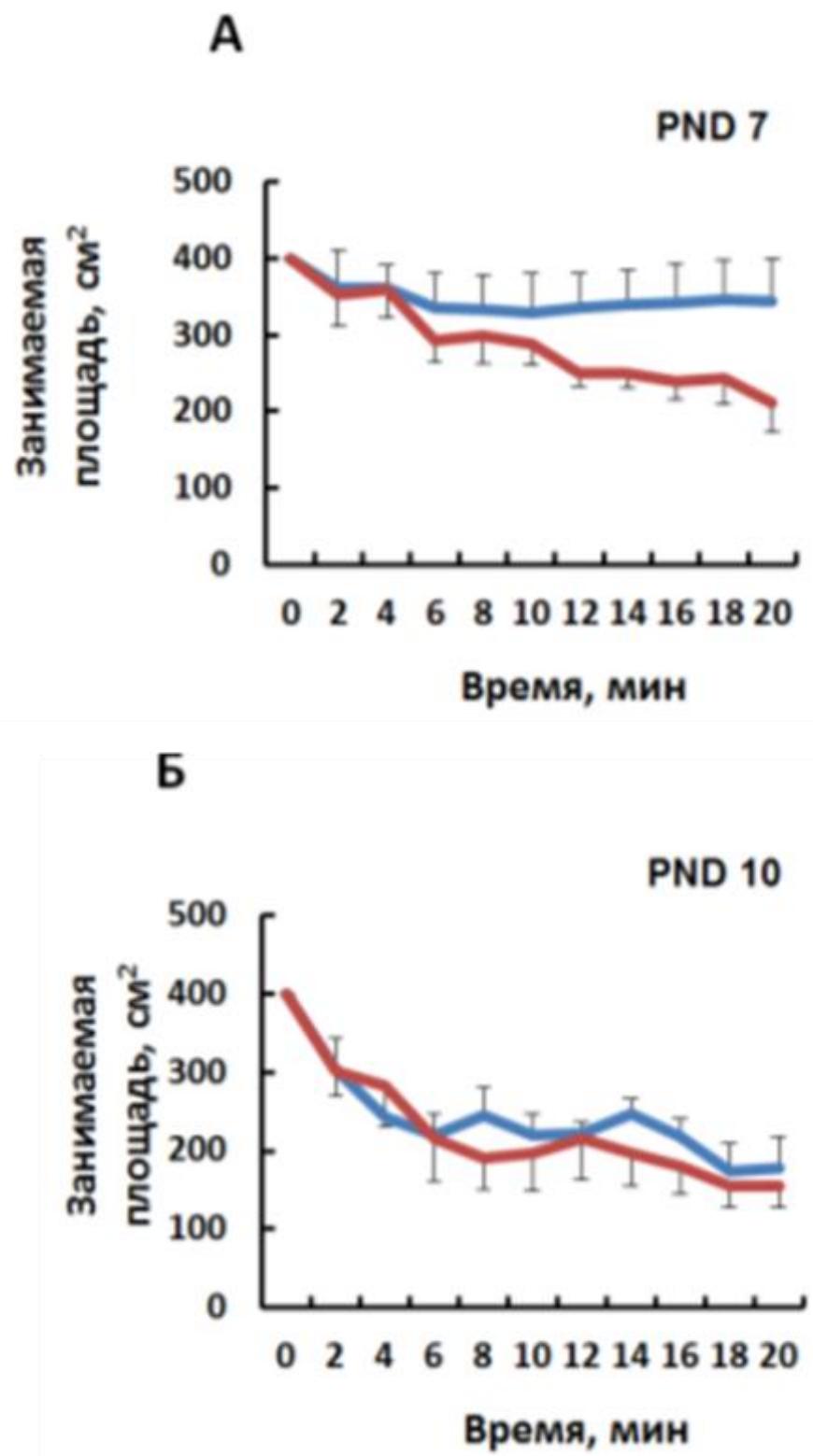


Рисунок 47 Групповая локомоторная активность в тесте «Открытое поле» групп $Cd157^{+/+}$ и $Cd157^{-/-}$ мышей-самцов на 7 (А) и 10 (Б) день постнатального развития. $n_{\text{групп}}=6-10$. Красный маркер - $Cd157^{-/-}$, синий маркер - $Cd157^{+/+}$.

3.6.3 Ультразвуковая вокализация мышей самцов при социальной изоляции в раннем постнатальном периоде

Хорошо известно, что детеныши мышей продуцируют ультразвуки в период до PND 12 во время изоляции от матери [335]. Мы наблюдали, что *Cd157^{+/+}* и *Cd157^{-/-}* мыши самцы вокализируют на 3, 7 и 10 день постнатального периода. Двухфакторный ANOVA показал статистически значимое взаимодействие *Генотип* x *Возраст* ($F_{(2,14)}=17,54$, $P=0,0001$). *Post-hoc* Tukey's тест выявил, что количество USV было статистически значимо в PND 3 у *Cd157^{-/-}* мышей (17 ± 2 ультразвуков/3 мин) по сравнению с контрольной группой (5 ± 1 ультразвуков/3 мин, $P=0,001$, **рисунок 48**). В период первой постнатальной недели число USV, продуцируемых *Cd157^{-/-}* мышами, значительно упало до 4 ± 2 ультразвуков/3 мин в PND 10 ($\chi^2=0,974$, $P=0,02$), в то время как число USV у *Cd157^{+/+}* мышей возросло в PND 7 и 10 до 12 ± 3 и 10 ± 2 ультразвуков/3 мин соответственно (**рисунок 48**). Между экспериментальной и контрольной группами наблюдали статистически значимые отличия ($P=0,0001$).

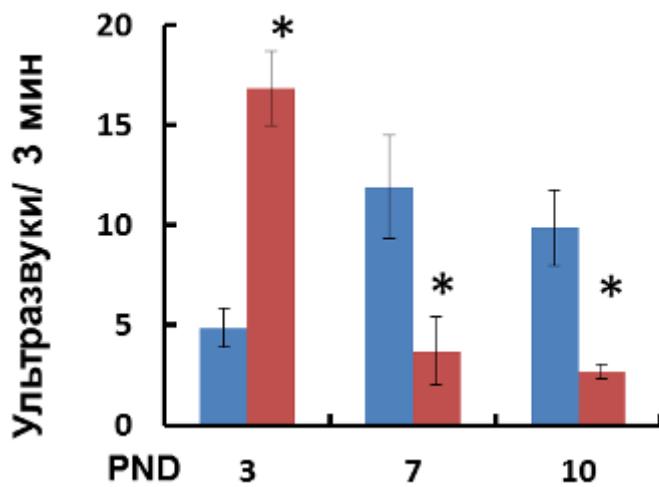


Рисунок 48 Количество ультразвуков, продуцируемых детенышами мышей в период 3-минутной сессии при изоляции от матери (n=8-14). Двухфакторный ANOVA с последующим *post-hoc* Tukey's тестом множественных сравнений. * $P<0,001$, сравнение с *Cd157^{+/+}*.

Частота продуцируемых USV падала у мышей обеих групп с 3 по 10 день постнатального развития. Взаимосвязь *Генотип* x *Возраст* не являлась статистически значимой (двуфакторный ANOVA, $F_{(2,74)}=1,681$, $P=0,1893$). Не наблюдалось различий между *Cd157^{+/+}* и *Cd157^{-/-}* мышами, за исключением частоты USV, которая была ниже в PND 7 у *Cd157^{+/+}* мышей ($61,1 \pm 1,1$ кГц) по сравнению с *Cd157^{-/-}* ($65,0 \pm 1,2$ кГц, *post-hoc* Tukey's тест множественных сравнений, $P=0,0211$, $\chi^2=0,7778$) (**рисунок 49А**).

Продолжительность вокализируемых ультразвуков была неизменной у контрольной группы *Cd157^{+/+}* в период постнатального периода (**рисунок 38Б**). Двуфакторный ANOVA показал статистически значимую взаимосвязь *Генотип* x *Возраст* ($F_{(2,84)}=45,10$, $P=0,0001$). Влияние генотипа – $F_{(1,84)}=25,4$, $P=0,0001$; влияние возраста - $F_{(2,84)}=34,76$, $P=0,0001$. Продолжительность USV была значительно выше у *Cd157^{-/-}* мышей в PND 3 ($86,2 \pm 4,3$ мсек) по сравнению с *Cd157^{+/+}* группой ($52,8 \pm 1,8$ мсек; *post-hoc* Tukey's тест множественных сравнений, $P=0,0001$). В первую неделю постнатального развития ультразвуковая вокализация упала у *Cd157^{-/-}* мышей до $49,8 \pm 1,5$ мсек (PND 7). В соответствии с предыдущими исследованиями [335] мыши обоих генотипов не вокализировали после PND 10.

Категории вокализируемых ультразвуков мышами линии *Cd157^{+/+}* и *Cd157^{-/-}* в постнатальном периоде многообразны (**рисунок 50, приложение Л**). *Cd157^{-/-}* мыши в возрасте 3х дней продуцируют USV трех категорий (72% downwards, 22% upwards, 6% chevron), тогда как *Cd157^{+/+}* детеныши идентичного возраста вокализируют только двумя категориями ультразвуков (15% upward, 85% downward). Двуфакторный ANOVA демонстрирует статистически значимую взаимосвязь *Генотип* x *Категория USV* в PND 7 ($F_{(2,114)}=22,39$, $P=0,0001$).

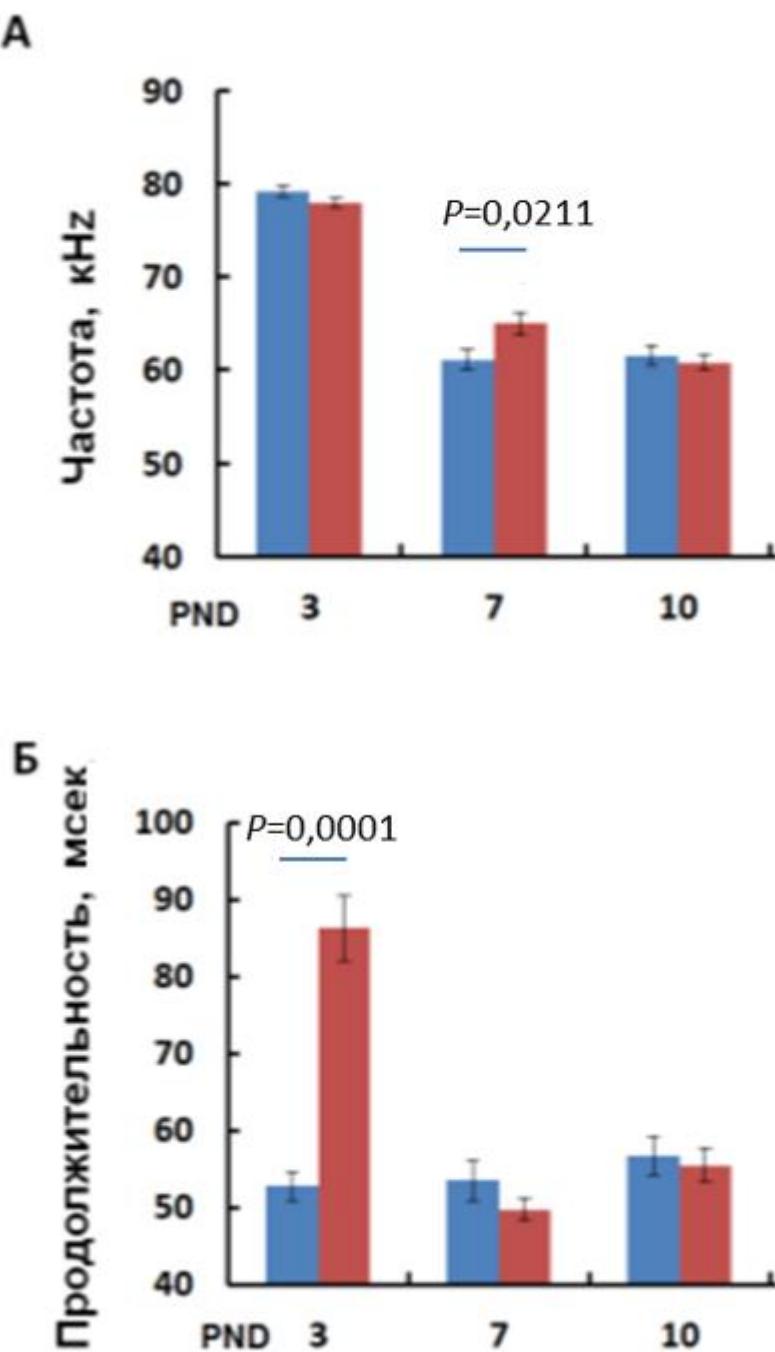


Рисунок 49 Характеристики ультразвуковой вокализации *Cd157^{-/-}* в первые десять дней постнатального развития. Частота (А; n=18) и продолжительность (Б; n=18) ультразвуков, produцируемых C57BL/6 и *Cd157^{-/-}* мышами-самцами. PNDs 3-10. Двухфакторный ANOVA с последующим *post-hoc* Tukey's тестом множественных сравнений.

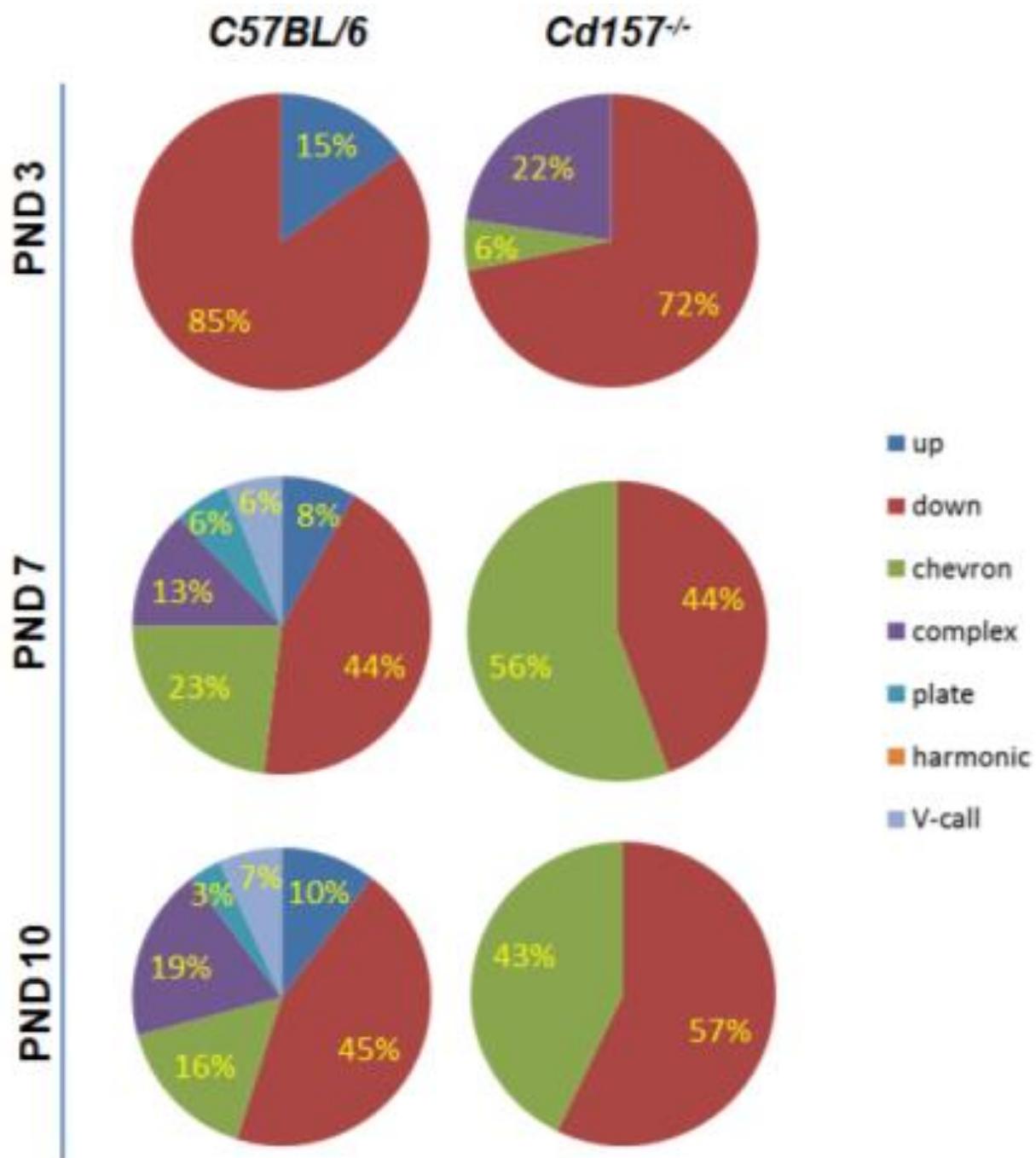


Рисунок 50 Категории вокализуемых ультразвуков мышами линии *Cd157^{+/+}* и *Cd157^{-/-}* в PND 3, 7, 10. Процент был посчитан в каждой группе: число ультразвуков в каждой категории / общее число ультразвуков – у каждого объекта. ($n_{\text{мышей}} = 15-20$, $n_{\text{ультразвуков}} = 100-120$).

Однако, интересно, что *Cd157^{+/+}* мыши на седьмой день постнатального периода вокализирует более широким спектром – 6 категорий USV (44% downward, 23% chevron, 13% complex, 8% upward, 6% plate, 6% “V” calls, **приложение Г**), тогда как *Cd157^{-/-}* мыши демонстрируют «бедность речи», вокализируя лишь двумя категориями USV (44% downward и 58% chevron). Двухфакторный ANOVA выявил статически значимую взаимосвязь *Генотип* x *Категория USV* в PND 7 ($F_{(6,266)}=45,18$, $P=0,0001$). На 10 день постнатального периода наблюдаемый спектр USV был значительно шире у *Cd157^{+/+}* мышей по сравнению с экспериментальной группой *Cd157^{-/-}*, повторяя тенденции седьмого дня постнатального развития. Двухфакторный ANOVA демонстрирует статически значимую взаимосвязь *Генотип* x *Категория USV* в PND 10 ($F_{(6,266)}=44,69$, $P=0.0001$). При более подробном анализе мы видим, что семидневные *Cd157^{-/-}* мышата больше продуцирует ультразвуки категории «chevron» (*Cd157^{+/+}* - 23% против *Cd157^{-/-}* - 56%, $P=0,001$) и одинаковое с экспериментальной группой количество ультразвуков категории «downward» (44% и 43%, соответственно). В то время как «репертуар» USV мышат дикого типа развивался, не было никакого прогресса в развитии вокализации у мышей экспериментальной группы, которые, действительно, демонстрировали своего рода "отсталость".

3.6.4 Фармакологическая коррекция дефицита ультразвуковой вокализации

Далее мы попытались определить, способствует ли введение экзогенного ОХТ изменению спектров USV у *Cd157^{-/-}* мышей и может ли ОХТ восстанавливать дефицит ультразвуковой вокализации. Внутрибрюшинные инъекции ОХТ (10 нг/мышь) остро способствуют обогащению USV «репертуара» *Cd157^{-/-}* мышей в течение 30 мин по сравнению с исходным. Кроме того, двухфакторный дисперсионный анализ подтверждает статистически значимую взаимосвязь *Вводимое вещество* x *Категория USV* ($F_{(2,266)}=73,53$, $P=0,001$; **рисунок 51, приложение М, Н**). На 60 минуте после инъекции ОХТ спектр USV

Cd157^{-/-} мышей содержал только 4-3 категории ультразвуков из 6 (регистрируемых на 30 минуте). Через 2 часа после введения ОХТ «репертуар» вокализации *Cd157^{-/-}* мышей возвращается к исходному уровню с двумя категориями USV. Становится ясно, что ОХТ может восстановить дефицит вокализации *Cd157^{-/-}* мышей до нормальной структуры дикого типа, и данный эффект является временным.

Для исследования ген-дозированного влияния на репертуар USV мышей, мы исследовали изоляция-индуцированную ультразвуковую вокализацию у гетерозиготных мышей-самцов (*Cd157^{+/-}*) на 3, 7 и 10 день постнатального периода. *Cd157^{+/-}* мыши-самцы демонстрировали промежуточную модель «репертуара» USV, в которых нет четкого развития сложных форм ультразвуковой вокализации, но тем не менее присутствуют 3-4 категории USV (**рисунок 52**).



Рисунок 51 Эффекты экзогенного OXT и PBS на дефицит ультразвуковой вокализации у *Cd157^{-/-}* мышей на 7 и 10 дни постнатального развития.

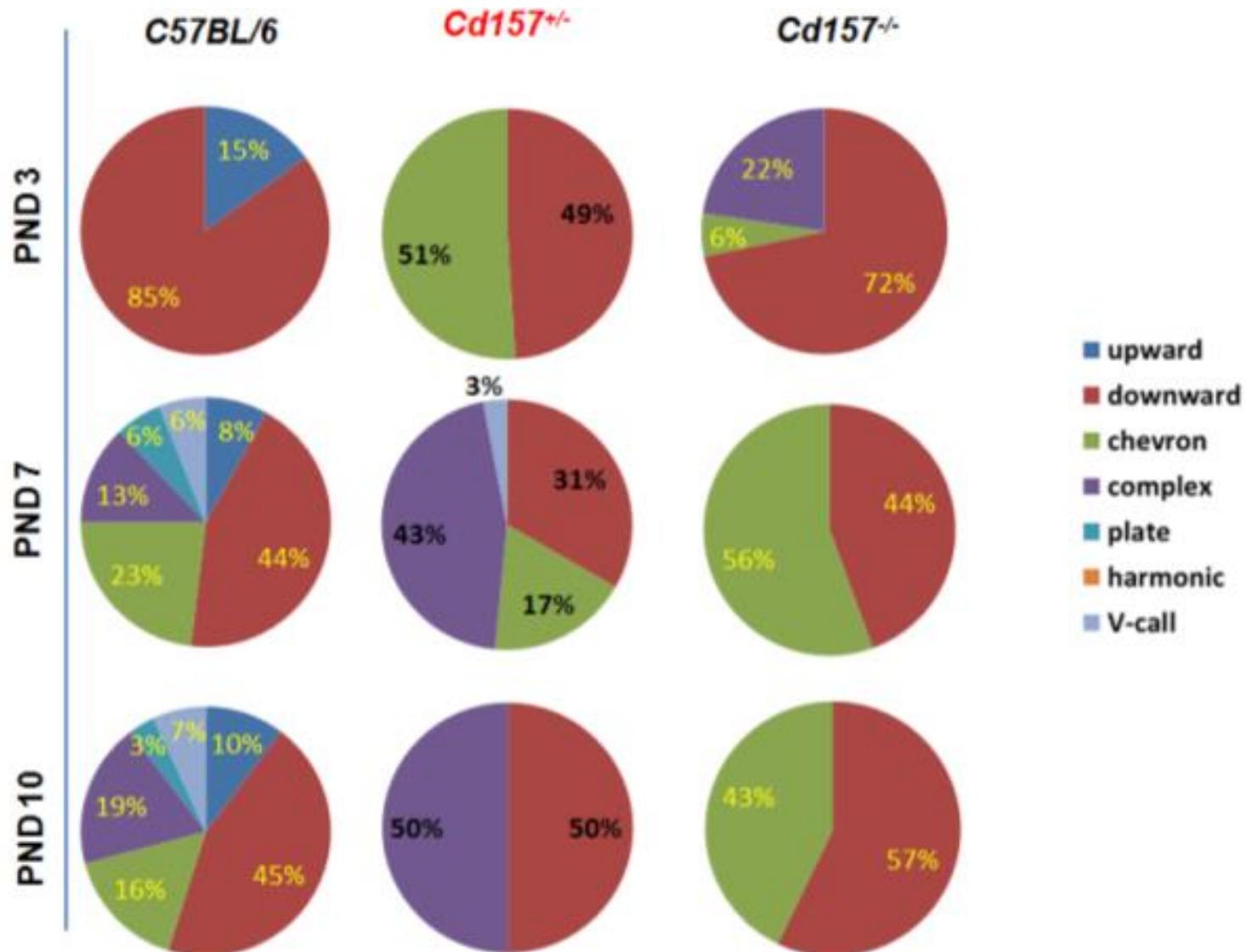


Рисунок 52 Спектр вокализации мышей самцов *Cd157^{+/−}* при социальной изоляции в раннем постнатальном периоде.

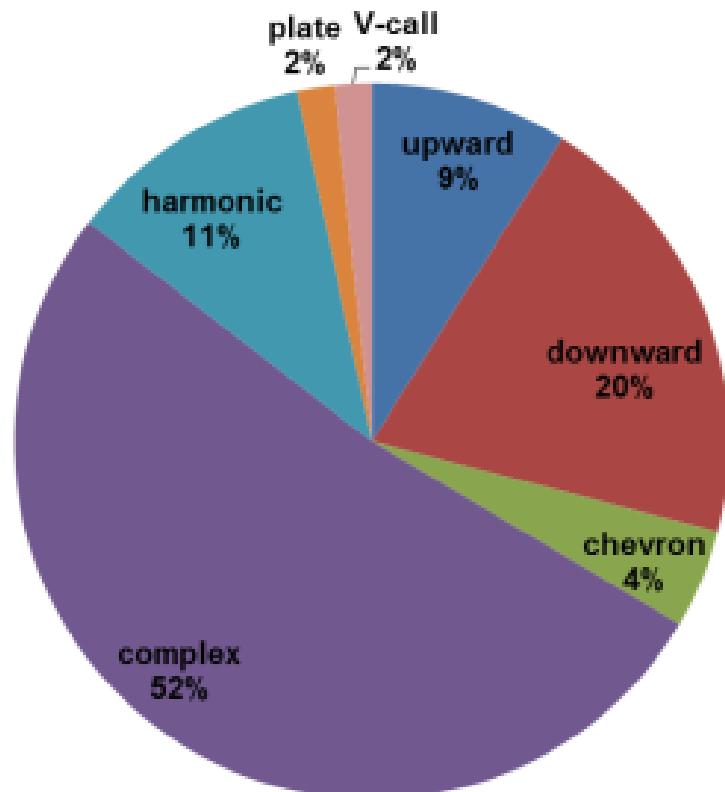
Внутрибрюшинное введение ОХТ (10 нг/мышь) *Cd157^{+/+}* мышам на 7 и 10 день постнатального развития восстанавливало качественный состав вокализации до уровня контрольной группы через 30 мин, а через 2 часа эффект ОХТ пропадал и спектр вокализации возвращался на прежний уровень, так же как и у *Cd157^{-/-}* мышей (данные не представлены).

3.6.5 Ультразвуковая вокализация мышей самцов *Cd157^{+/+}* при социальной изоляции в раннем постнатальном периоде

3.6.6 Контекст-специфичная (в процессе ухаживания самца за самкой) ультразвуковая вокализация у взрослых *Cd157^{+/+}* и *Cd157^{-/-}* мышей

Известно, что половозрелые самцы мышей не вокализируют при социальной изоляции. Поэтому, чтобы оценить способность вокализации у взрослых мышей, мы измерили параметры USV во время ухаживания, так как многие USV испускаются в контексте сексуального поведения как самцами, так и самками мышей. В таких записях USV, мы не обнаружили каких-либо различий между двумя генотипами *Cd157^{+/+}* и *Cd157^{-/-}* мышей (**рисунок 53, таблица 3**). *Cd157^{-/-}* мыши вокализируют с богатым «репертуаром» USV (7 категорий), также, как и у *Cd157^{+/+}* мыши (7 категорий USV). Эти результаты ясно показывают, что *Cd157* нокаутные мыши могут продуцировать USV такие же, как и мыши дикого типа, и при этом не демонстрировать дефицит вокализации. Наши результаты показывают, что *Cd157^{-/-}* детеныши с более простым спектром USV демонстрируют задержку развития и эта задержка восстанавливается во взрослом возрасте при поиске партнеров.

A

C57BL/6

Б

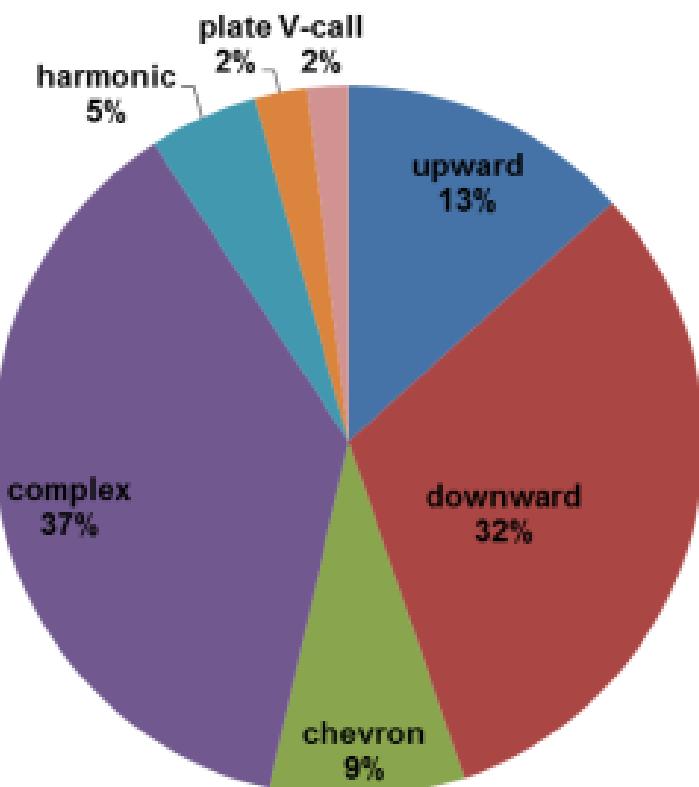
Cd157^{-/-}

Рисунок 53 Контекст-специфичная (в процессеosexualного ухаживания самца за самкой) ультразвуковая вокализация половозрелых мышей. Продуцируемые ультразвуки, записанные во время ухаживания *Cd157^{-/-}* (A) или

Cd157^{+/+} (C57BL/6, Б) самца за C57BL/6 самкой представлены как процентное отношение их количества в каждой категории к общему количеству ультразвуков. Зарегистрированные ультразвуки представлены в таблице.

Таблица 3 Зарегистрированные ультразвуки во время контекст-специфичной (в процессе сексуального ухаживания самца за самкой) ультразвуковой вокализации половозрелых мышей

	Типы и количество продуцируемых ультразвуков							Суммарное число продуцируемых ультразвуков
	upward	downward	chevron	complex	harmonic	plate	V-call	
C57BL/6 (n=13)								
Mean	1	3	1	7	2	1	1	17
S.E.M.	1	1	1	3	1	1	1	6
Cd157^{-/-} (n=13)								
Mean	6	14	4	17	2	1	1	45
S.E.M.	3	4	2	5	1	1	1	12

Примечание: Количество пар мышей в эксперименте = 8-10, количество проанализированных ультразвуков = 100-120.

Mean – среднее значение, S.E.M. – стандартная ошибка среднего значения.

3.6.7 Активность АДФ-рибозилциклизы в тканях головного мозга и уровень ОХТ в плазме крови $Cd157^{+/+}$ и $Cd157^{-/-}$ мышей-самцов в первые десять дней постнатального развития

Для того, чтобы определить, являются ли наблюдаемые изменения в вокализации связанными с нарушением секреции ОХТ за счет отсутствия CD157, мы оценивали активность АДФ-рибозилциклизы, которая необходима для центральной секреции ОХТ в гипоталамусе, а также уровни ОХТ в плазме крови у контрольной ($Cd157^{+/+}$) и экспериментальной ($Cd157^{-/-}$) групп мышей в течение первых двух недель жизни (рисунок 54).

Двухфакторный ANOVA показывает незначительное взаимодействие *Генотип* x *Возраст* на определение активности АДФ-рибозилциклизы (рисунок 54А; $F_{(2,24)}=3,17$, $P=0,0600$). Тем не менее, существуют значительное влияние *Генотипа* ($F_{(1,24)}=11,37$, $P=0,0025$) или *Возраста* ($F_{(2,24)}=123,4$, $P=0,0001$) по отдельности. *Post-hoc* Sidak's тест множественных сравнений подтвердил, что активность АДФ-рибозилциклизы в гипоталамусе на 7ой ($P=0,018$) и 10й ($P=0,003$) день постнатального развития была значительно ниже у $Cd157^{-/-}$ мышей, чем у контрольной группы (рисунок 54А). Двухфакторный ANOVA продемонстрировал значительное взаимодействие *Генотип* x *Возраст* при измерении уровня окситоцина в плазме крови (рисунок 54Б; $F_{(2,35)}=3,386$, $P=0,045$). Мы наблюдали статистически значимое снижение содержание ОХТ в плазме крови у нокаутных животных по сравнению с контрольной группой на 7ой ($P=0,033$) и 10ый ($P=0,04$) день постнатального развития (рисунок 54Б, *Post-hoc* Sidak's тест множественных сравнений). Начиная с PND7, мы наблюдали более низкие уровни активности АДФ-рибозилциклизы (рисунок 54А) и ОХТ в плазме крови (рисунок 54Б) у $Cd157^{-/-}$ мышей по сравнению с мышами дикого типа. У мышей $Cd157^{+/+}$ количество продуцируемых ультразвуков ассоциировано с более высокой активностью ADP-рибозилциклизы (рисунок

55А) и уровнями ОХТ в плазме крови (**рисунок 55А**) в зависимости от возраста. Напротив, мыши *Cd157^{-/-}* демонстрировали отрицательную взаимосвязь между числом испускаемых ультразвуков и активностью ADP-рибозилцилазы (**рисунок 55А, таблица 4**) и ОХТ в плазме крови (**рисунок 55Б, таблица 4**) в первые 10 дней постнатального развития.

Характеристики USV и уровни ОХТ в плазме крови после введения экзогенного ОХТ у *Cd157^{-/-}* мышей на седьмой день постнатального периода приведены в **таблице 5**. На 30 и 60 минуте после введения ОХТ мы наблюдали моделирующие и статистически значимые изменения по количеству и качеству продуцируемых ультразвуков у мышей по сравнению с группой, которой вводился физиологический раствор. Таким образом, вполне вероятно, что изменения в продуцировании USV есть отражение сдвига уровней ОХТ в плазме крови.

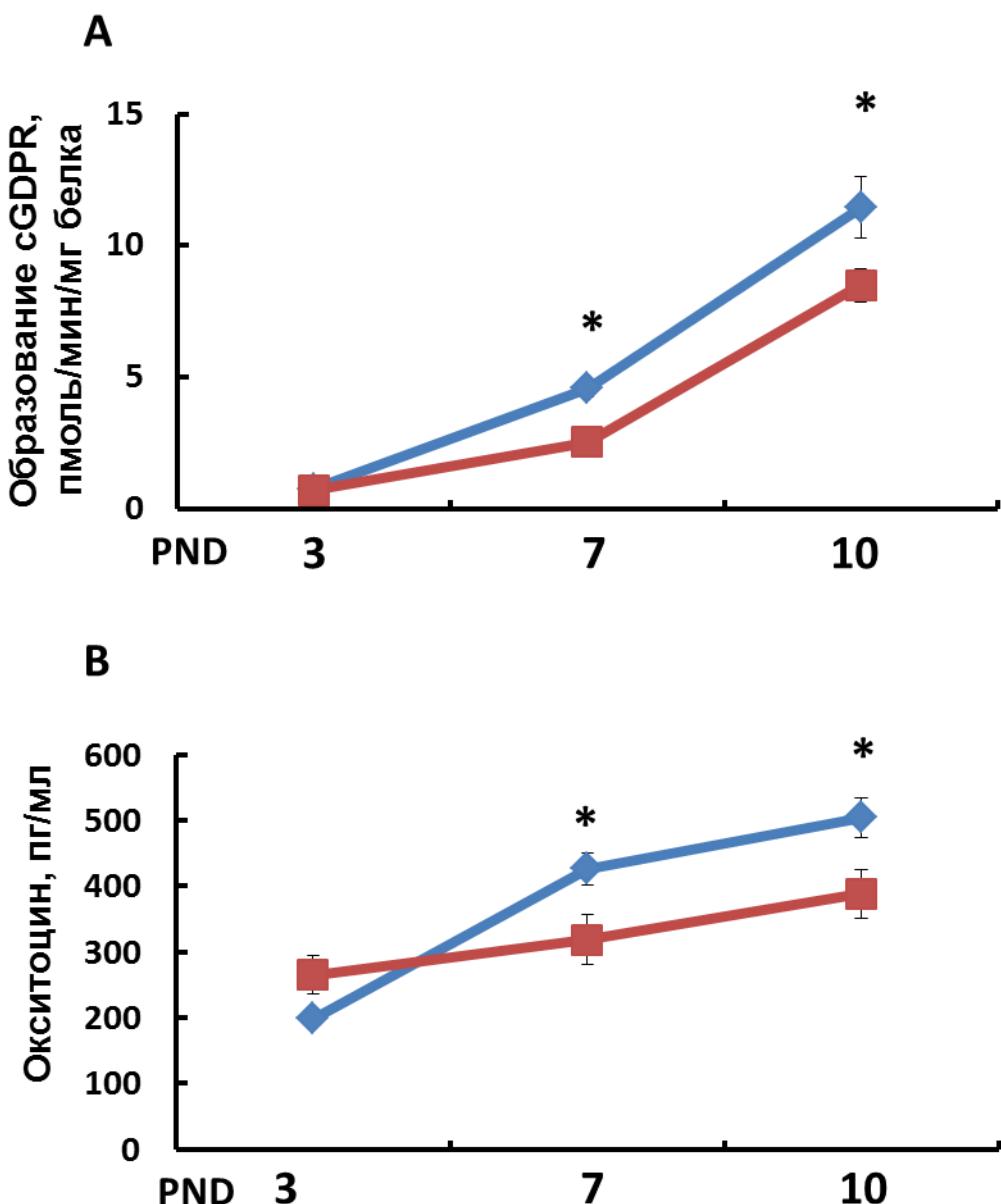


Рисунок 54 Активность АДФ-рибозилциклизы (по образованию cGDP) в гипоталамусе (А) и уровень окситоцина в плазме крови (Б) у *Cd157^{+/+}* и *Cd157^{-/-}* мышей-самцов в первые две недели постнатального развития. Красный маркер - *Cd157^{-/-}*, синий маркер - *Cd157^{+/+}*. n=8-12, *P<0,05, сравнение *Cd157^{-/-}* мышей с контрольной группой. Двухфакторный ANOVA с последующим *post-hoc* Sidak's тестом множественных сравнений.

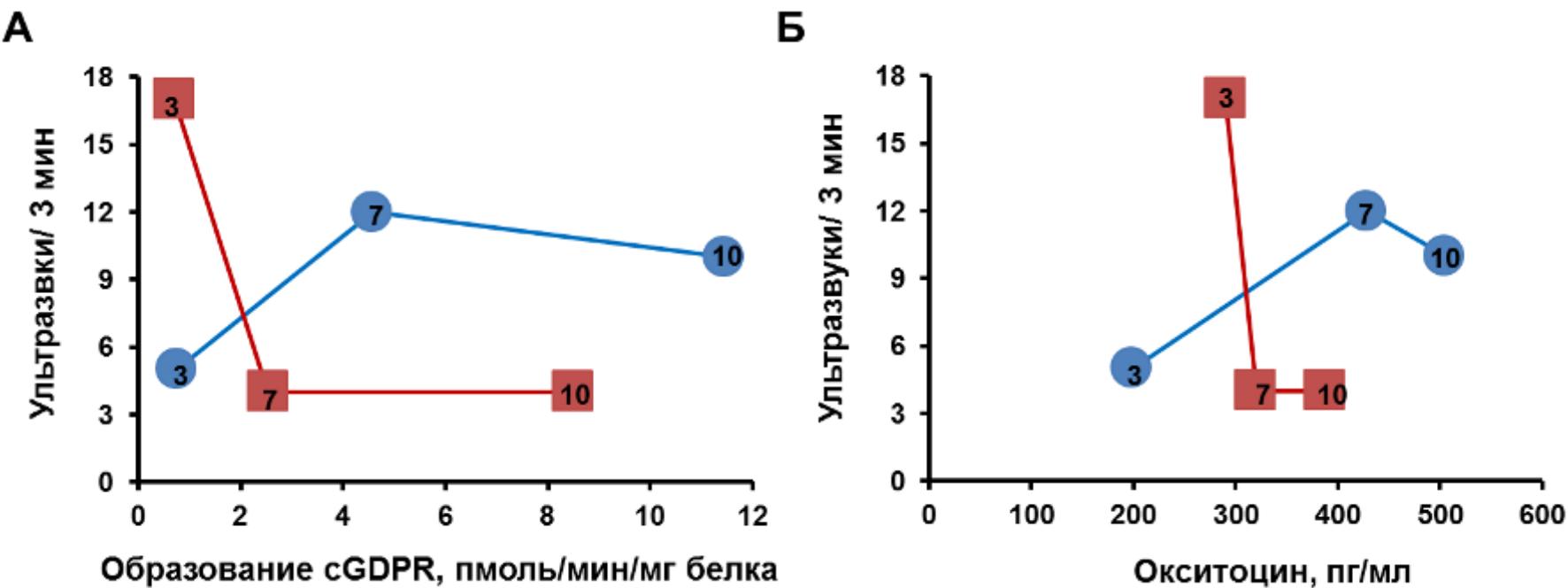


Рисунок 55 Активность АДФ-рибозилцилазы и концентрация окситоцина в плазме в корреляции с продуцируемыми ультразвуками у мышей *Cd157^{+/+}* и *Cd157^{-/-}* в течение первых 10 дней жизни. (А) Активность АДФ-рибозилцилазы в отношении количества USV у мышей *Cd157^{+/+}* (синий круглый маркер) и *Cd157^{-/-}* (красный квадратный маркер) на 3, 7 и 10 постнатальные дни развития (PND). АДФ-рибозилцилазную активность измеряли как скорость образования cGDP_R в гомогенатах тканей гипоталамуса. **(Б)** Концентрация окситоцина в плазме (OXT) коррелирует с количеством ультразвуков у мышей-самцов линии *Cd157^{+/+}* (синий круглый маркер) и *Cd157^{-/-}* (красный квадратный маркер) на 3, 7 и 10 день постнатально развития. Данные были получены от детенышей в указанные дни постнатального развития (арабские цифры).

Таблица 4 Зарегистрированная активность АДФ-рибозилциклизы (по образованию cGDPR), концентрация ОХТ в плазме и количество продуцируемых ультразвуков у мышей *Cd157^{+/+}* и *Cd157^{-/-}* в PND 3, 7 и 10.

	ОХТ, пг/мл		Образование cGDPR, пмоль/мин/мг белка		Ультразвуки/3 мин	
	Mean	S.E.M.	Mean	S.E.M.	Mean	S.E.M.
<i>C57BL/6</i>						
PND3	199,07	10,13	0,75	0,11	5	1
PND7	428,32	1,12	4,58	0,34	12	3
PND10	504,74	30,32	11,44	1,16	10	2
<i>Cd157^{-/-}</i>						
PND3	290,00*	36,54	0,71	0,06	17*	2
PND7	320,14*	38,05	2,54*	0,55	4*	1
PND10	388,05*	36,78	8,50*	0,64	4*	1

Примечание: * $P<0,05$ по сравнению с *Cd157^{+/+}* мышами в соответствующий день измерения.

Таблица 5 Количество и качественные характеристики ультразвуковой вокализации, и уровень ОХТ в плазме крови, у мышей после введения (i.p.) ОХТ и физиологического раствора.

<i>Cd157-/-, PND7</i>	Введенное вещество	Время после введения вещества (i.p.), мин			
		0'	30'	60'	120'
	Контроль	3±2			
Вокализируемые ультразвуки/ 3 мин (n=8-14)	<i>PBS</i>		5±2	4±2	4±2
	<i>OXT</i>		4±1	9±1	5±1
	Контроль	65.0±1.3			
Частота, кГц (n=18)	<i>PBS</i>		67.1±1.5	66.4±2.3	64.3±3.1
	<i>OXT</i>		56.4±2.7	54.7±2.3	63.3±2.2
	Контроль	49.7±2.1			
Продолжительность, мсек (n=18)	<i>PBS</i>		51.3±2.1	50.9±2.5	50.3±1.8
	<i>OXT</i>		57.7±0.9	59.5±0.8	53.3±3.2
	Контроль	318.4±37.9			
Уровень ОХТ в плазме крови, пг/мл (n=8-14)	<i>PBS</i>		312.5±33.3	320.7±27,8	323.7±19.5
	<i>OXT</i>		646.9±84.6	549.4±24.9	346.3±32.8

Примечание: *P<0,05.

3.7 Особенности развития и ультразвуковой коммуникации в период грудного вскармливания у *Cd38* нокаутных мышей

Ранее мы продемонстрировали, что взрослые мыши с делецией гена CD38 имеют дефицит социального поведения из-за аномалии центральной и периферической секреции ОХТ [193]. Мы также показали, что снижение образования циклической ADP-рибозы (cADPR) приводит к дисфункции Ca^{2+} -индуцированного высвобождению Ca^{2+} при секреции ОХТ в нейронах гипоталамуса [193]. Однако, не было сообщений о поведении *Cd38* нокаутных (*Cd38*^{-/-}) мышей в детском возрасте. В ЦНС активность ADP-рибозилцилазы, соответствующая CD38, была обнаружена уже на 15-й день эмбрионального развития мыши [78], а содержание эндогенной цАДФ-рибозы было выше в развивающемся головном мозге и снижалось у взрослых [79]. Поэтому нам было интересно исследовать поведение *Cd38*^{-/-} мышей-самцов в детском возрасте с разных точек зрения: в контексте сравнения развития мозга и поведения с *Cd157*^{-/-} мышами, а также с мышами, дефицитными по ОХТ и ОХТ-рецепторам [365, 393]. Мы исследовали двигательную активность, индуцированную стрессом изоляции от матери, и ультразвуковую вокализацию у *Cd38*^{-/-} мышей-самцов и мышей контрольной группы (ICR или *Cd38*^{+/+}). Так же как и в случае с *Cd157*^{-/-} мышами, нами были измерены уровни ОХТ в плазме крови и в тканях головного мозга в динамике постнатального развития. Мы определили активность ADP-рибозилцилазы в развивающемся головном мозге (в гипоталамусе и задней доле гипофиза) и обсудили его связь с уровнем ОХТ плазмы крови.

3.7.1 Локомоторная активность и ультразвуковая вокализация у $Cd38^{-/-}$ мышей (модель экспериментального аутизма)

Обе группы мышей, $Cd38^{-/-}$ и $Cd38^{+/+}$ хорошо развивались и набирали вес.

С третьей недели жизни масса $Cd38^{-/-}$ была незначительно меньше по сравнению с мышами контрольной группы, как сообщалось ранее [193].

На седьмой день постнатального развития $Cd38^{-/-}$ мыши-самцы демонстрировали значительно более высокие уровни индивидуальной локомоторной активности в течение первых 3 мин после изоляции от матери (рисунок 56А). При анализе групповой активности $Cd38^{-/-}$ мыши-самцы также статистически значимо показали более высокую подвижность (рисунок 56Б).

Детеныши мышей хорошо вокализировали при изоляции от матери. Свойства продуцируемых USV звуков были схожими по частоте ($\sim 62 \pm 0,57$ кГц ($n=23$) и продолжительности ($\sim 64 \pm 2$ мсек) у мышей обеих групп. Однако количество испускаемых ультразвуков в течение 3-минутной сессии было меньше у $Cd38^{-/-}$ мышей ($n=20$), чем у контрольных животных дикого типа ($n=30$), со средним снижением на $38 \pm 3\%$. Эти результаты хорошо согласуются с предыдущими наблюдениями у нокаутных мышей по ОХТ и ОХТ-рецепторам [122, 365, 393]. Тем не менее, степень нарушения поведения была более мягкой в случае $Cd38^{-/-}$ мышей по сравнению с двумя генотипами, дефицитными по ОХТ и ОХТ-рецепторам. Это свидетельствует о том, что у $Cd38^{-/-}$ мышей частично сохраняется способность к социальному взаимодействию с другими особями, что видно в контроле дикого типа. Это предположение побудило нас измерить уровни ОХТ в плазме крови и оценить влияние эндогенного ОХТ на реализуемое поведение.

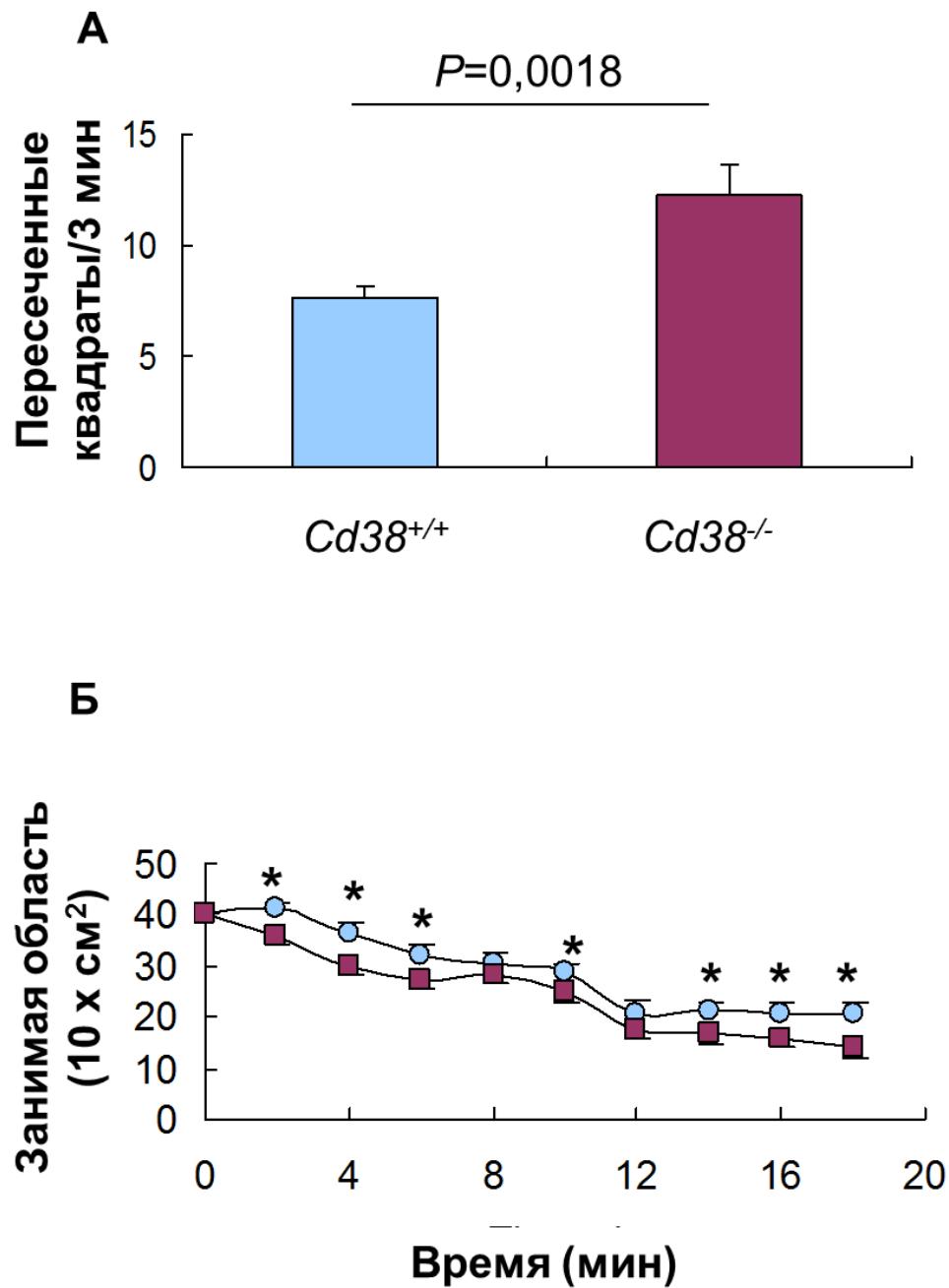


Рисунок 56 Локомоторная активность $Cd38^{-/-}$ мышей-самцов на 7 день постнатального развития. (А) Индивидуальная активность. (Б) Групповая активность. Синий маркер - $Cd38^{-/-}$ мыши, красный маркер – мыши контрольной группы - $Cd38^{+/+}$. $n=18-20$. $*P<0,05$, сравнение с $Cd38^{+/+}$ группой, t-критерий Стьюдента.

3.7.2 Уровень ОХТ в плазме крови и активность АДФ-рибозилциклизы в тканях головного мозга у *Cd38^{-/-}* мышей (модель экспериментального аутизма)

Затем мы измерили АДФ-рибозилциклизную активность в гипоталамусе и задней доле гипофиза у мышей дикого типа и нокаутных животных в течение первых двух месяцев жизни. В исследуемых областях мозга АДФ-рибозилциклизная активность была выше у мышей контрольной группы 1-недельного возраста, чем у нокаутных мышей того же возраста, но разница не была значительной. Со второй недели жизни мыши контрольной группы показали значительно более высокий уровень активности АДФ-рибозилциклизы в гипоталамусе и гипофизе по сравнению с *Cd38^{-/-}* мышами (**рисунок 57**).

В гипоталамусе активность ADP-рибозилциклизы увеличивалась с возрастом у мышей контрольной группы, но только небольшое снижение наблюдалось у *Cd38^{-/-}* мышей. Активность АДФ-рибозилциклизы была ниже в гипофизе, чем в гипоталамусе у мышей обоих линий. Ни у мышей *Cd38^{+/+}*, ни у *Cd38^{-/-}* не обнаружено значимых изменений активности ADP-рибозилциклизы в процессе развития.

Так же нами были проанализированы уровни ОХТ в плазме крови в пяти различных временных точках постнатального развития (от 1 недели до 2 месяцев) у обоих генотипов. Удивительно, что концентрация ОХТ в плазме крови у мышей *Cd38^{-/-}* в возрасте 1-3 недель была такой же, как у мышей *Cd38^{+/+}* того же возраста. Однако, как и ожидалось, в возрасте 1 и 2 месяцев, после отделения от матери (PND21), мы обнаружили, что концентрация ОХТ в плазме крови у *Cd38^{-/-}* (291±46 пг/мл – PND30, 215±20 пг/мл – PND60) ниже, чем у мышей контрольной группы (522±28 пг/мл - PND30, 440±60 пг/мл – PND60, **рисунок 58**).а

Несмотря на небольшие отклонения в ультразвуковой вокализации и локомоторной активности у мышей линии *Cd38^{-/-}*, возможность фармакологической коррекции с помощью экзогенного ОХТ в детском возрасте

не представляла интереса, поскольку уровень окситоцина у мышей самцов был таким же, как и у контрольной группы.

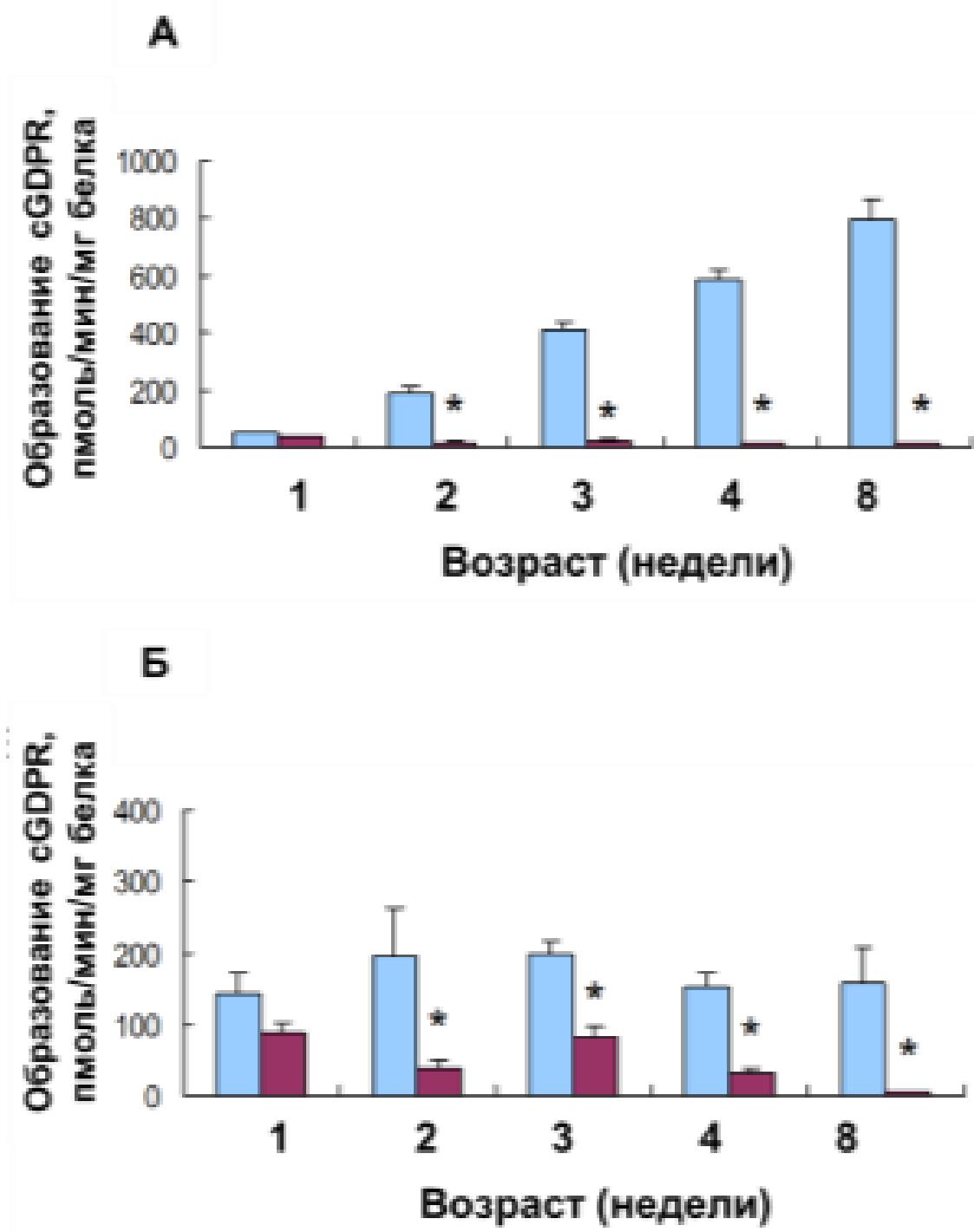


Рисунок 57 Динамика изменения активности АДФ-рибозилциклизы в тканях головного мозга у мышей линии Cd38^{-/-}. (А) Гипоталамус. Двухфакторный ANOVA ($F_{(2,84)}=53,17, P=0,0001$) с последующим *post-hoc* Sidak's тестом множественных сравнений. (Б) Гипофиз. Двухфакторный ANOVA

$(F_{(2,76)}=44,05, P=0,0001)$ с последующим *post-hoc* Sidak's тестом множественных сравнений. Красный маркер – мыши линии $Cd38^{-/-}$, синий маркер – мыши линии $Cd38^{+/+}$. $n=8-10$. $*P<0.05$, сравнение с $Cd38^{+/+}$ группой.

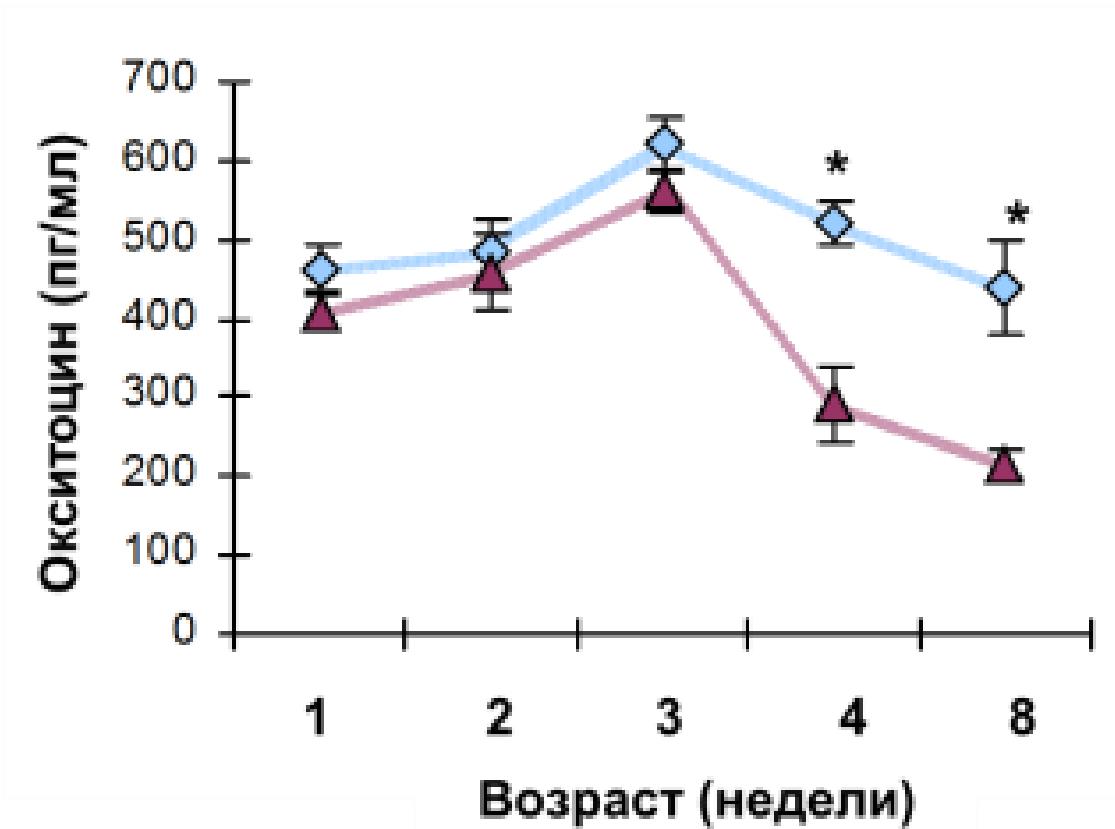


Рисунок 58 Динамика изменения концентрации ОХТ в плазме крови в процессе онтогенеза у мышей линии $Cd38^{-/-}$. Красный маркер – мыши линии $Cd38^{-/-}$, синий маркер – мыши линии $Cd38^{+/+}$. $n=8-10$. Двухфакторный ANOVA $(F_{(2,64)}=36,12, P=0,0098)$ с последующим *post-hoc* Sidak's тестом множественных сравнений. $*P<0,05$, сравнение с $Cd38^{+/+}$ группой.

Также нами были измерены уровни окситоцина в молочных железах и грудном молоке нокаутных самок, согласно описанным методам [142, 318]. Интересен тот факт, что уровень окситоцина ни в молочной железе, ни в грудном молоке нокаутных животных не отличался от контрольной группы.

3.8 Осцилляции внутриклеточного кальция, индуцированные внеклеточным применением цАДФ-рибозой или окситоцином в нейрональных клетках грызунов NG108-15

При исследовании влияния ОХТ на поведенческие реакции актуальным остается вопрос о механизмах, лежащих в основе синтеза и секреции ОХТ, включая сигнализацию АДФ-рибозилциклизы и цАДФ-рибозы, поскольку именно они определяют осцилляции внутриклеточного кальция и последующее высвобождение окситоцина.

Мы попытались ответить на следующие вопросы: может ли внеклеточная аппликация цАДФ-рибозы активировать сигнализацию $[Ca^{2+}]_i$ или TRPM2 каналы через CD38. Для этих целей были использованы нейрональные гибридные клетки NG108-15 (клетки нейробластомы мыши x клетки глиомы крысы), экспрессирующие CD38 [165], но не окситоциновые рецепторы [291]. Данная модель является широко используемой для изучения эффектов цАДФ-рибозы. Известно, внутриклеточная активация цАДФ-рибозы вызывает потенциал-зависимое мембранные возрастание свободного цитозольного Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) [156].

3.8.1 Температура-чувствительное возрастание внутриклеточного кальция индуцируемое аппликациями цАДФ-рибозы или окситоцина в нейрональных клетках грызунов NG108-15

Мы измерили $[Ca^{2+}]_i$ в клетках NG108-15 дикого типа до и после стимуляции внеклеточной аппликацией 50мМ цАДФ-рибозы [156] с использованием Ca^{2+} индикаторного красителя, Oregon Green ВАРТА АМ. Как показано на **рисунке 59А, 60А** NG108-15 клетки демонстрировали небольшое, но значимое увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в ответ на цАДФ-рибозу при 35°C. Средняя концентрация $[Ca^{2+}]_i$ после стимуляции цАДФ-рибозой составила 121±7% (n=4; $P=0,0098$) от предстимуляционного уровня. Интересно, что клетки NG108-15

показали статистически значимое увеличение при внеклеточной аппликации 50 мкМ цАДФ-рибозы наряду с увеличением температуры до 40°C (**рисунок 59Б, 60Б**). Средний пиковый уровень составил 169±12% (n=5; $P=0,0076$), что было значительно больше, чем при 35°C ($P=0,0007$). При температурном сдвиге до 40°C без агониста уровень $[Ca^{2+}]_i$ составил 111±2% от уровня при 35°C (n=6; **рисунок 60**). Это увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в ответ на комбинацию изменения температуры и введения цАДФ-рибозы очень похожи на наблюдаемые в клетках HEK-293, экспрессирующие каналы TRPM2 [370].

3.8.2 Ингибирование путем удаления внеклеточного кальция и TRPM2 антагонистом

Чтобы определить участие TRPM2 в вышеупомянутых ответах в клетках NG108-15, мы исследовали экспрессию мРНК TRPM2 с помощью ОТ-ПЦР. Как показано на **рисунке 61А**, мы смогли усилить фрагмент в соответствии с прогнозируемым размером - 162 bp (пар оснований).

Затем мы исследовали цАДФ-рибоза-опосредованные изменения $[Ca^{2+}]_i$ при 40°C в отсутствие внеклеточного кальция. Было обнаружено низкое или полное отсутствие $[Ca^{2+}]_i$ (103±2% от уровня предстимуляции, n=4) (**рисунок 61Б, В**). Это подтверждает приток Ca^{2+} через неселективные катионные каналы TRPM2, инициированные в ответ на комбинацию циклической АДФ-рибозы и тепла, и последующее повышение $[Ca^{2+}]_i$. Чтобы подтвердить это, мы использовали ингибитор канала TRPM2 - 2-АРВ (2-аминоэтоксидифенилборат).

Было показано, что 2-АРВ при более низкой концентрации ингибирует приток кальция через каналы TRPM2, активируемые лигандами и теплом [370]. Мы обнаружили, что наблюдаемое повышение $[Ca^{2+}]_i$ с помощью внеклеточного применения цАДФ-рибозы (50 мМ) (**рисунок 62**) и повышенной температуры полностью подавляется предварительной аппликацией 2-АРВ (**рисунок 61**), в концентрации, способной ингибировать каналы TRPM2 человека [370].

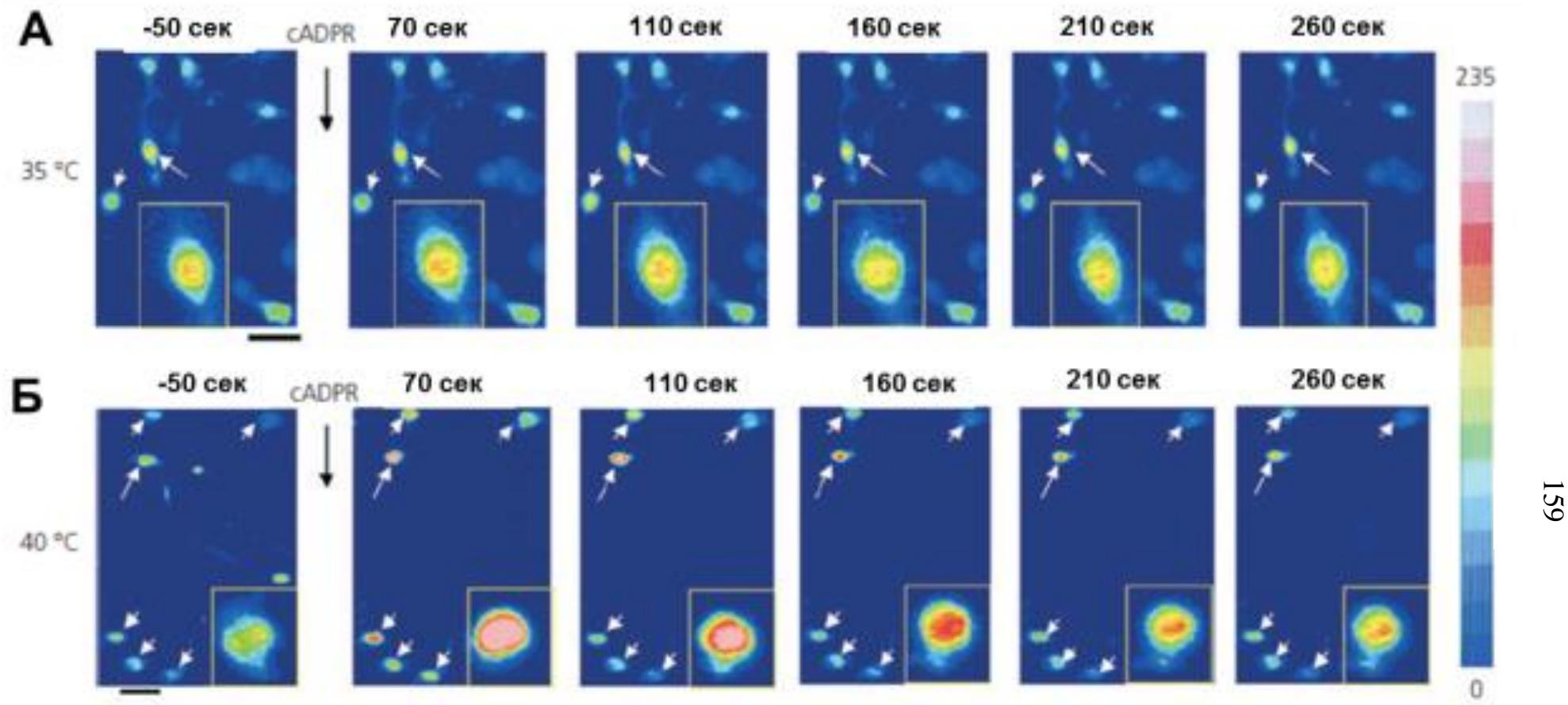


Рисунок 59 Визуализация осцилляций $[Ca^{2+}]_i$, индуцированные аппликацией АДФ-рибозой при нагревании в клетках NG108-15. (А) Изображения флуоресценции в клетках NG108-15. Введение цАДФ-рибозы (cADPR, 50 мМ) указано стрелками. $[Ca^{2+}]_i$ измеряли при 35°C (А) или 40°C (Б). Масштабная шкала - 10 мкм. Белые стрелки указывают на изменения после стимуляции по окраске с Oregon Green. Вставка: приближенное изображение указанных стрелками клеток.

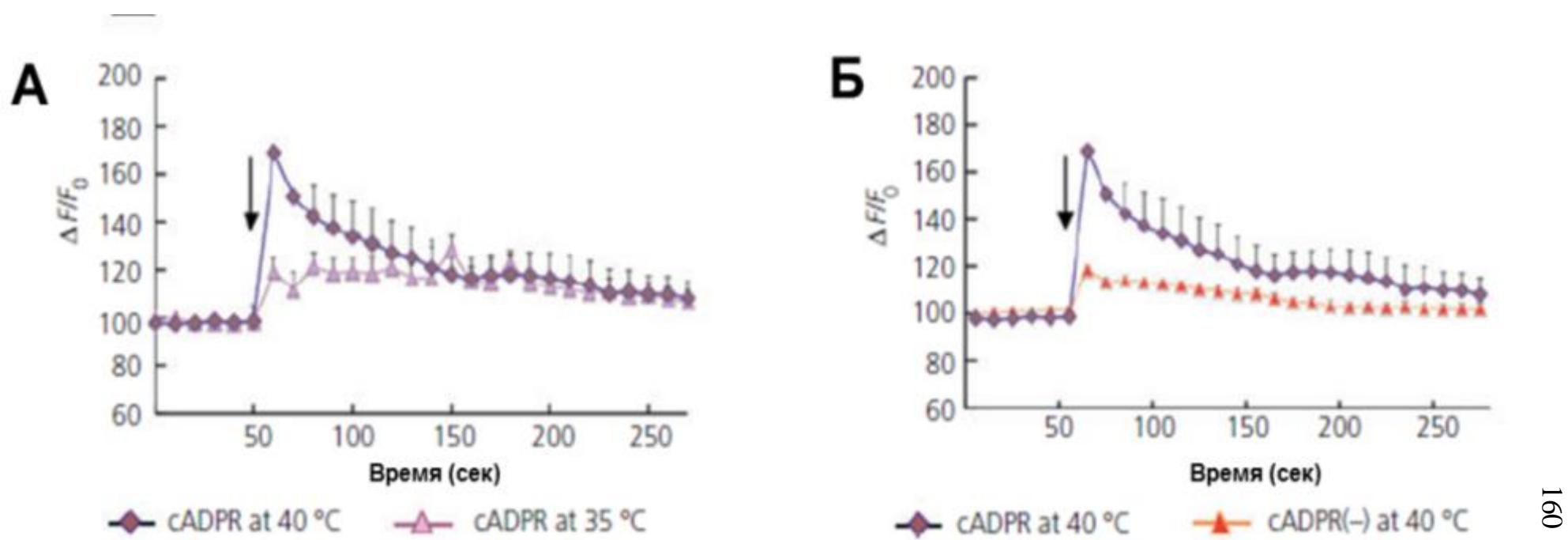


Рисунок 60 Осцилляции $[Ca^{2+}]_i$, индуцированные аппликацией АДФ-рибозой при нагревании в клетках NG108-15. Кинетика осцилляций $[Ca^{2+}]_i$ при 35 (А) и 40°C (Б) в присутствии цАДФ-рибозы. Кинетика изменения $[Ca^{2+}]_i$ с (◊) или без 50 мМ цАДФ-рибозы (Δ) при 40°C. Данные показаны в виде отношения изменения интенсивности флуоресценции к состоянию покоя ($\Delta F/F_0$). n=4-6.

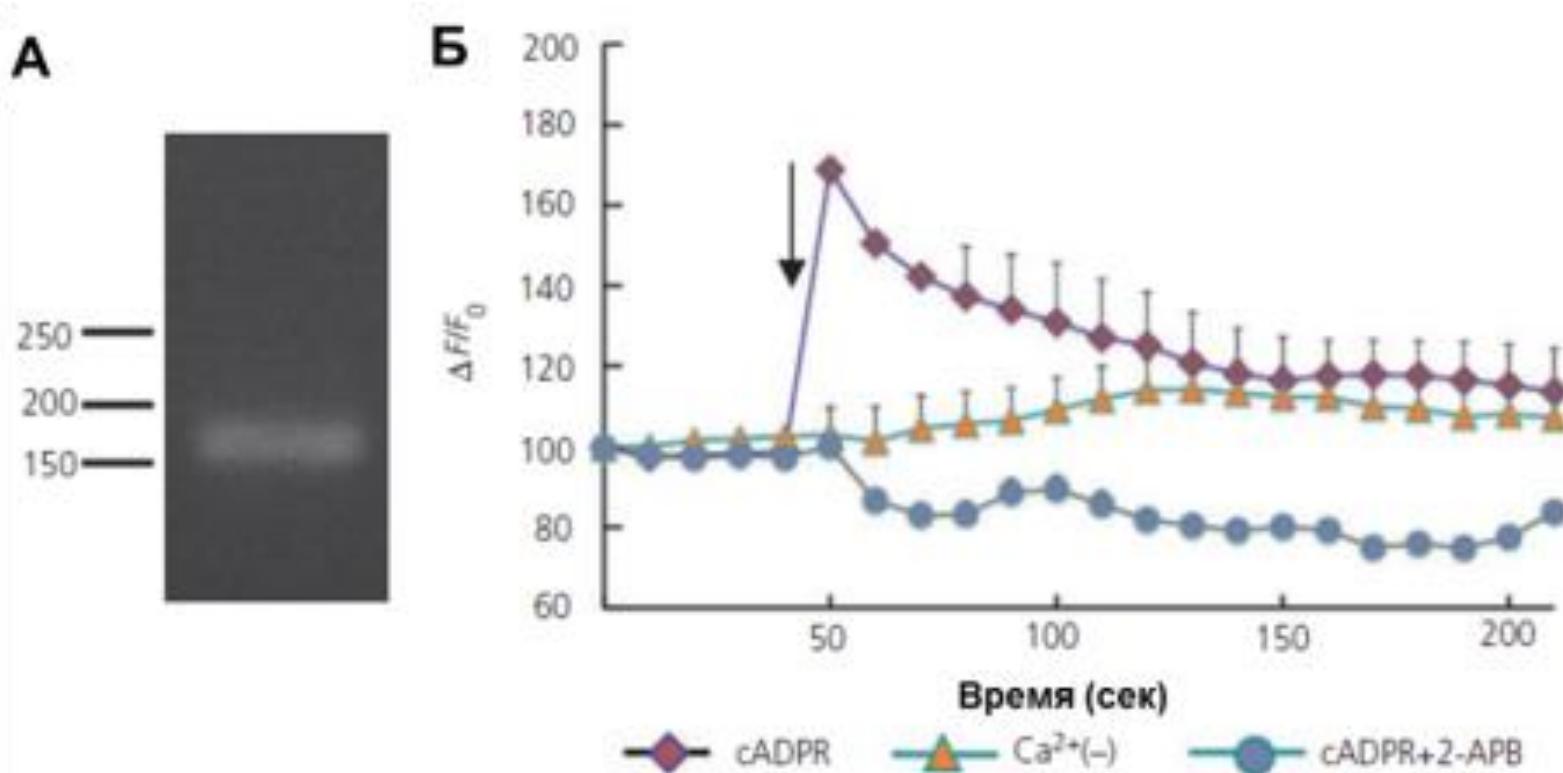


Рисунок 61 Анализ ОТ-ПЦР и ингибирующий эффект удаления внеклеточного кальция или аппликации TRPM2 антагониста на изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$. (А) Экспрессия мРНК TRPM2 в клетках NG108-15. 162 bp - продукт ОТ-ПЦР был обнаружен. (Б) Осцилляции $[\text{Ca}^{2+}]_i$, полученные в клетках NG108-15 при повышении температуры (от 35 до 40°C) и аппликации циклической АДФ-рибозы (cADPR, 50 мМ) в присутствии (◊) или отсутствии (Δ) внеклеточного кальция. Эффекты 2-аминоэтоксидифенилбората (2-APB) на концентрацию $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в присутствии температуры и цАДФ-рибозы (маркер - О). Данные представлены в виде отношения изменения интенсивности флуоресценции к состоянию покоя ($\Delta F/F_0$). n=3-5.

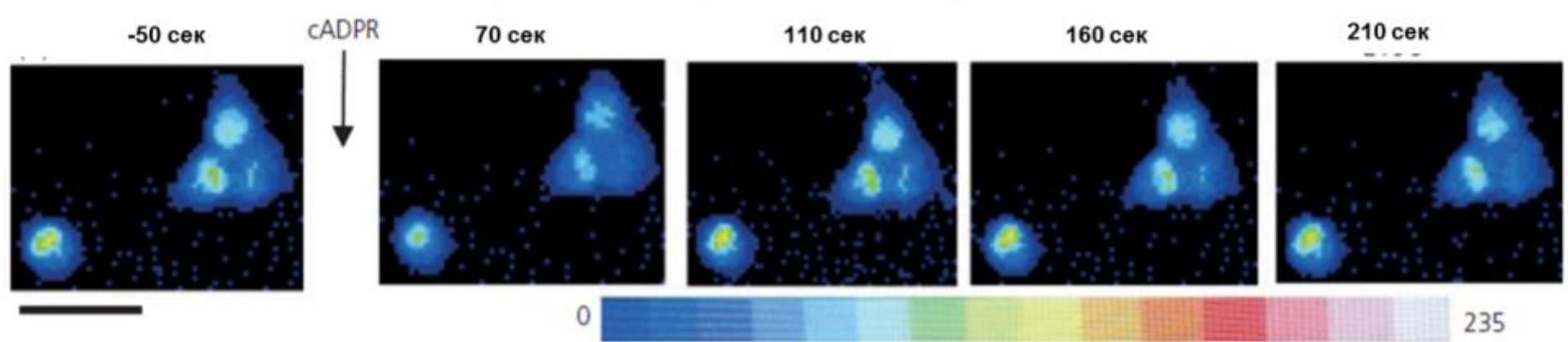


Рисунок 62 Флуоресцентные изображения клеток NG108-15 до и на 70, 110, 160 и 210 секунде применения цАДФ-рибозы (50 мМ) при 40°C. cADPR – циклическая АДФ-рибоза.

3.8.3 Увеличение ингибиции $[Ca^{2+}]_i$ с помощью 8-bromo-cADPR

Мы рассмотрели эффекты 8-bromo-cADPR (антагонист высвобождения Ca^{2+} из внутриклеточных пулов Ca^{2+} путем ингибирующего связывания цАДФ-рибозы) на высвобождения кальция с участием рианодиновых рецепторов [222, 380].

8-bromo-cADPR (50 мМ) значительно ингибирует цАДФ-рибоза/термо-индуцированное увеличение $[Ca^{2+}]_i$ - пиковый уровень составил $121\pm9\%$ от уровня предстимуляции (рисунок 63). Аналогичным образом эффект 8-bromo-cADPR наблюдали в ответах на стимуляцию 100 мМ β -НАД⁺ и температурой: $138\pm5\%$ и $118\pm13\%$ в отсутствие и присутствии 8-bromo-cADPR, соответственно. Эффект β -НАД⁺ и тепла также был ингибирован аппликацией 10 мМ никотинамида, ингибитора превращения β -НАД⁺ в цАДФ-рибозу (данные не показаны). Эти результаты свидетельствуют о том, что мобилизация Ca^{2+} из внутриклеточных депо осуществляется за счет цАДФ-рибозы [242].

Также нами было исследовано влияние АДФ-рибозы (агонист TRPM2 каналов, но не влияет на опосредованное рианодиновыми рецепторами высвобождение Ca^{2+} - отличие от цАДФ [70]. Повышение $[Ca^{2+}]_i$, вызываемое АДФ-рибозой (50 мМ) и теплом, было очень небольшим, но статистически значимым ($118\pm4\%$, $n=4$, однофакторный ANOVA - $F_{(1,28)}=16,98$, $P=0,0356$). Продолжительность «всплеска» Ca^{2+} составляло 1-2 мин (рисунок 64). Этот результат хорошо согласуется с наблюдениями в клетках НЕК-293, в которых кратковременное применение АДФ-рибозы приводило к открытию канала TRPM2 в течение 1-2 мин [70].

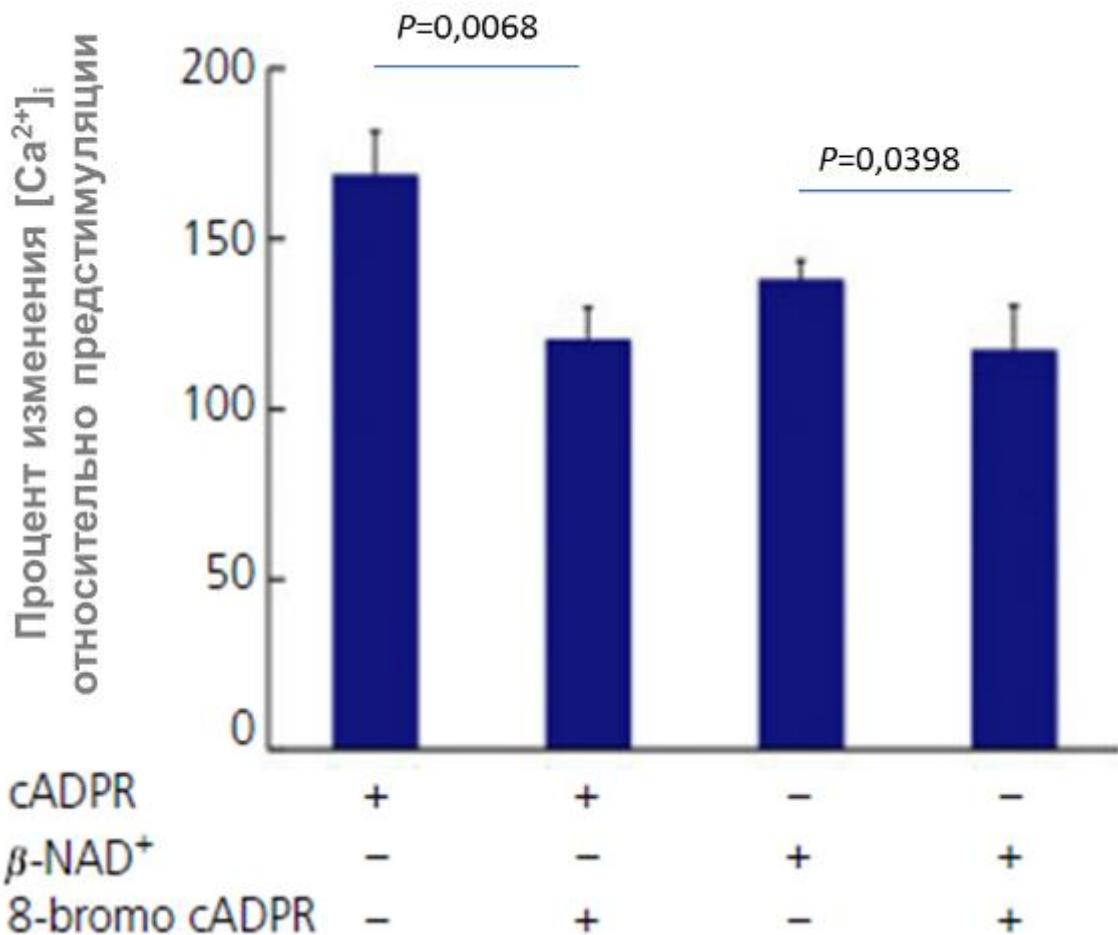


Рисунок 63 Действие цАДФ-рибозы на осцилляции $[Ca^{2+}]_i$. Увеличение $[Ca^{2+}]_i$, индуцированное внеклеточным применением 50 мМ цАДФ-рибозы (cADPR) или 100 мМ β -НАД⁺ (β -NAD⁺) при 40°C в присутствии или в отсутствие 50 мМ 8-бром-сADPR. n=4-6, однофакторный ANOVA ($F_{(1,32)}=15,60$, $P=0,0458$) с последующим *post-hoc* Sidak's тестом множественных сравнений.

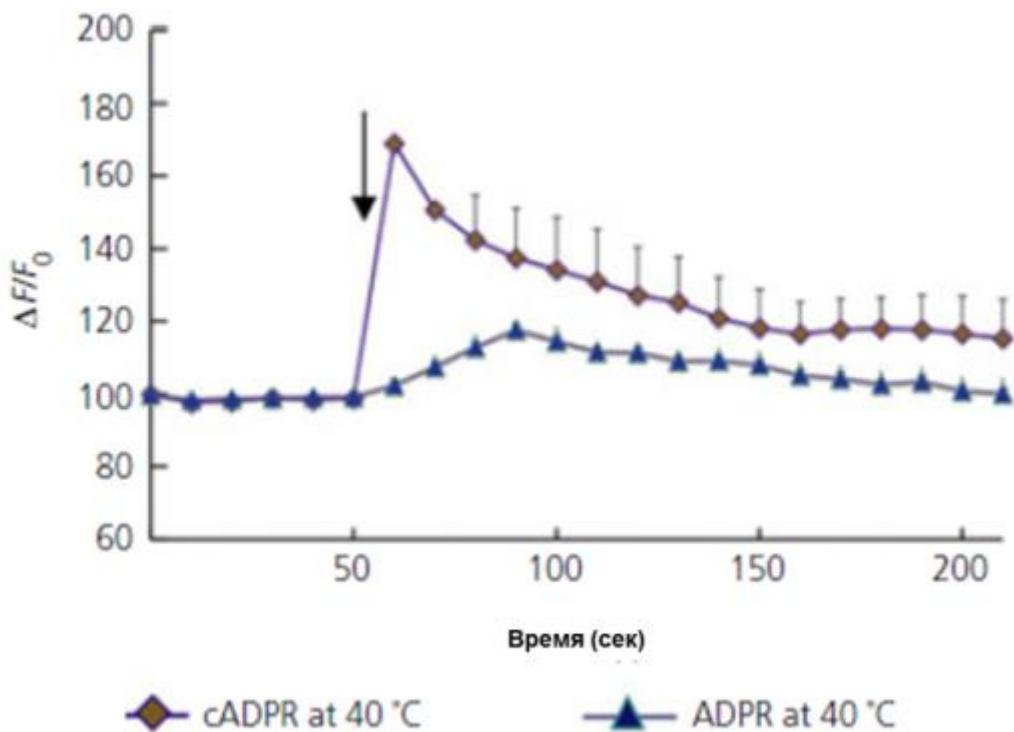


Рисунок 64 Кинетические кривые осцилляций $\text{Ca}^{2+}]_i$ при стимуляции 50 мкл цАДФ-рибозы (cADPR, \diamond) и 50 мМ АДФ-рибозы (ADPR, Δ) при 40°C. Данные показывают изменение интенсивности флуоресценции по отношению состоянию покоя ($\Delta F/F_0$). $n=4-6$.

3.8.4 Окситоцин-индуцируемое повышение содержания кальция в клетках NG108-15, экспрессирующие рецепторы к окситоцину

Чтобы проанализировать, действует ли циклическая АДФ-рибоза в качестве вторичного мессенджера рецепторов к окситоцину и является ли TRPM2-подобным термочувствительным каналом, активируемым стимуляцией окситоцинового рецептора, мы использовали клетки NG108-15 с трансфекцией кДНК рецепторов окситоцина человека (рисунок 65). Предыдущие эксперименты с использованием клеток NG108-15 с гиперэкспрессией CD38 или мускариновых рецепторов [162, 165], показывали обнаружение GFP-флуоресценции

функционирующих окситоциновых рецепторов. Как показано на **рисунке 65**, применение 100 нМ ОХТ (концентрация, при которой наблюдается максимальная активация АДФ-рибозилциклизы в гипоталамусе мышей) повышает $[Ca^{2+}]_i$ до $134 \pm 3\%$ ($n=7$) и $151 \pm 4\%$ ($n=7$) при $35^{\circ}C$ и $40^{\circ}C$, соответственно. Применение однофакторного ANOVA подтверждает статистически увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в 1,5 раза при повышении температуры $40^{\circ}C$ ($F_{(1,32)}=15,70, P=0,001$).

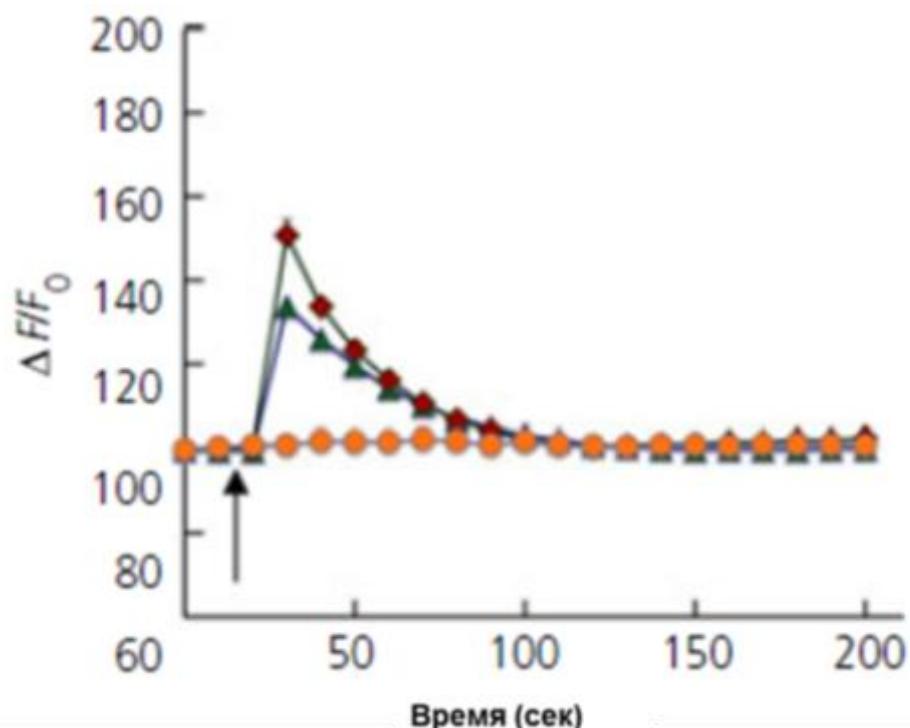


Рисунок 65 Влияние окситоцина на $[Ca^{2+}]_i$ в контроле или клеток NG108-15 клеток с экспрессией окситоциновых рецепторов (OXTR) человека. $[Ca^{2+}]_i$ измеряли либо при $35^{\circ}C$ (Δ , OXTR $^+$) или $40^{\circ}C$ (\diamond , OXTR $^+$). Контроль – клетки без экспрессии OXTR (O). Стрелка указывает на добавление ОХТ (конечная концентрация - 100 нМ). Данные показаны в виде отношения изменения интенсивности флуоресценции к состоянию покоя ($\Delta F/F_0$). $n=7$.

Поскольку все приведенные выше осцилляции Ca^{2+} являются относительными, для подтверждения влияния действия внеклеточных циклической АДФ-рибозы и температуры нами были измерены уровни $[Ca^{2+}]_i$,

индуцированные KCl-зависимой деполяризацией в NG108-15 клетки при 35°C. Как показано на **рисунке 60**, возрастание $[Ca^{2+}]_i$ ассоциировано с действием цАДФ-рибозы и повышением температуры (169%), что эквивалентно аппликации 50 мМ KCl (**рисунок 66**), который деполяризует эти клетки до -10-20 мВ от потенциала покоя -60 мВ [291]. Кроме того, известно, что та же деполяризующая стимуляция 50 мМ KCl повышает уровни $[Ca^{2+}]_i$ до 170 нМ относительно концентрации покоя 70 нМ в клетках NG108-15 [165]. 50-70 мМ KCl деполяризующая стимуляция облегчает высвобождение окситоцина в 2,3 раза в первичных тканях, выделенных из гипоталамуса и гипофиза мыши [193]. Поэтому мы можем оценить, что внеклеточное применение 50 мМ циклической АДФ-рибозы вызывает достаточное высвобождение окситоцина.

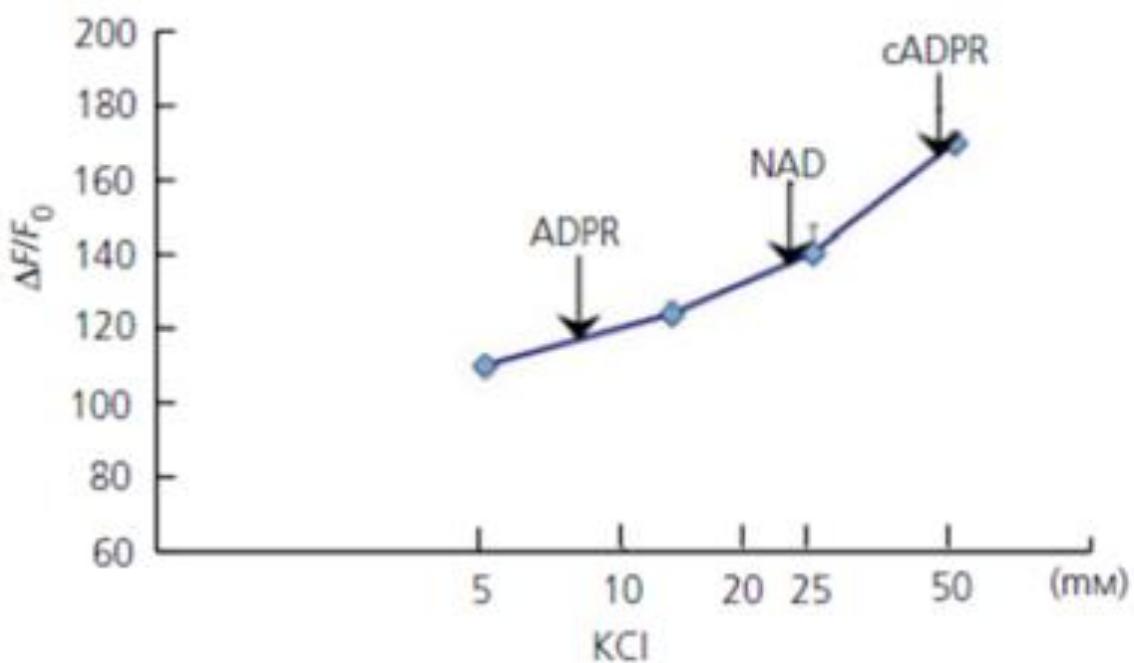


Рисунок 66 Влияние внеклеточных концентраций KCl на уровни $[Ca^{2+}]_i$ в клетках NG108-15. $[Ca^{2+}]_i$ при 37°C. Данные показывают изменение интенсивности флуоресценции по отношению состоянию покоя ($\Delta F/F_0$). n=5-9. Стрелки показывают максимальное значение $\Delta F/F_0$, полученное внеклеточной аппликацией циклической АДФ-рибозы (cADPR, 50 мкМ), АДФ-рибозы (ADPR, 50 мкМ) и β -NAD⁺ (100 мкМ) и повышением температуры.

3.9 Циклическая АДФ-рибоза и повышенная температура регулируют высвобождение окситоцина через CD38 и TRPM2 в гипоталамусе мышей при социальном или психологическом стрессе.

Полученные нами данные на клетках NG108-15 свидетельствуют о том, что катионный канал TRPM2 и CD38 одновременно участвуют в термо-индуцируемом и β -НАД⁺ метаболит-чувствительном возрастании $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в окситоцинергических нейронах. Далее, мы обратили внимание на высвобождение ОХТ в зависимости от активности каналов TRPM2 и исследовали, участвуют ли CD38 и TRPM2 в инициировании высвобождения ОХТ из остро-культивируемого гипоталамуса мыши посредством тепловой стимуляции и внешней аппликации цАДФ-рибозы в присутствии (или без) ингибитора TRPM2 или ингибитора рианодиновых рецепторов у мышей дикого типа и *Cd38^{-/-}* мышей. Мы также исследовали кинетику изменения концентрации ОХТ в инкубационной среде с интервалами 3 мин в одном культурированном гипоталамусе от каждой мыши, принадлежащей к группе дикого типа ICR. Кинетика высвобождения ОХТ с двумя стимулами была также исследована на гипоталамусе у мышей с локальным нокдауном по CD38 и TRPM2 (трансфицированных специфическими siRNAs).

В начале экспериментов мы ожидали, что эти факторы будут значительно влиять на выброс окситоцина у всех мышей. Неожиданно мы обнаружили разную чувствительность гипоталамусов к инкубации с 100 мкМ цАДФ-рибозы и сдвигу в температуре инкубации от 35°C до 38,5°C. У большинства исследованных животных (69,6%, n=46) уровень ОХТ увеличивался незначительно. Было отмечено, что секреция ОХТ значительно различалась у индивидуумов мышей (при групповом содержании) с травмами или без них. Это указывает на то, что групповое содержание мышей-самцов ассоциировано со стрессом и формированием социальной иерархии [241, 317]. Чтобы получить более прямое свидетельство относительно дифференциального выделения ОХТ в двух классах (доминирующих и подчиняющихся) мышей, мы провели эксперименты по микроперфузии мозга и измерили концентрации ОХТ в микроперфузатах

(внеклеточных жидкостях) из гипоталамуса. Чтобы прояснить связь между высвобождением ОХТ и температурой в стрессовых условиях *in vivo*, мы использовали два различных стрессовых состояния, которые, как известно, повышают температуру тела: тест «открытое поле» (стресс беспокойства из-за новой окружающей среды, [227]; и модель с введением липополисахарида (LPS) - индуцированная лихорадка [406]. Мы измеряли ректальную температуру и концентрации ОХТ в спинномозговой жидкости (CSF) в обеих моделях. Наконец, чтобы объяснить более легкое высвобождения ОХТ у подчиненных мышей с социальным стрессом на молекулярном уровне, мы исследовали уровни экспрессии CD38 и TRPM2 в гипоталамусе, измеряя уровни мРНК и иммунореактивности CD38 и TRPM2.

Несмотря на проводимые эксперименты, физиологическая значимость и важность высвобождения ОХТ, облегаемого гипертермией и стрессом, не выяснены. Однако было показано [281], что одна доза устранила симптомы аутизма у взрослых мышей с экспериментальной формой расстройства [282]. Вместе с сообщением 2007 года о том, что 83% детей с РАС показали временное улучшение при высокой температуре [88], это побудило нас продолжить эксперименты в направлении гипертермия-индуцированного высвобождения ОХТ в контексте клинических отчетов о поведенческом улучшении у детей с РАС, ассоциированном с лихорадкой [137, 138, 259].

Таким образом, для оценки того, может ли ОХТ высвобождаться из гипоталамуса под действием двух факторов, т.е. цАДФ-рибозы и температуры *in vitro*, мы использовали предыдущую парадигму системы культивирования гипоталамуса [193]. Мы измеряли ОХТ в инкубационной среде культивируемой ткани гипоталамуса, которая была получена от взрослых самцов мышей дикого типа (*Cd38^{+/+}*) или *Cd38* нокаутных (*Cd38^{-/-}*) мышей.

3.9.1 Высвобождение ОХТ стимулируется циклической АДФ-рибозой и нагреванием *in vitro*

Рисунок 67А иллюстрирует кинетику изменения концентраций ОХТ в инкубационной среде с интервалами в 3 мин в изолированном гипоталамусе у мышей дикого типа при групповом содержании. Инкубация только с 100 мкМ циклической АДФ-рибозой не индуцировала увеличения концентрации ОХТ в культуральной среде, но концентрация ОХТ значительно увеличивалась с введением дополнительной тепловой стимуляцией. Когда температура инкубации повышалась с 35 до 38,5°C, концентрация ОХТ возрастала в 2,6±0,27 раза и в 4,1±0,46 раза (n=14) по сравнению с уровнем предварительной стимуляции после 3 и 9 мин температурного сдвига соответственно (однофакторный ANOVA - $F_{(5,20)}=10,51, P=0,0001$). В качестве контроля использован уровень ОХТ в среде инкубации без стимуляции, который практически не изменялся в течение последующих семи замен инкубационной среды.

Чтобы проанализировать влияние исключительно температуры, последовательность стимуляции была изменена, то есть сначала был выполнен температурный сдвиг, а затем - аппликация циклической АДФ-рибозы (**рисунок 67Б**). В этом случае концентрация ОХТ возрастала в 2,7±0,54 раза относительно уровня предварительной стимуляции (n=21) в ответ на повышение температуры инкубации с 35 до 38,5°C в отсутствие циклической АДФ-рибозы (однофакторный ANOVA, $F_{(6,28)}=3,90, P<0,05$). Интересно, что увеличение было кратковременным и наблюдалось в течение лишь части 3-минутного периода. В отличие от этого, среднее увеличение в течение 9-15 мин в присутствии циклической АДФ-рибозы вместе с теплом составляло 3,7±2,7 раза по сравнению с уровнем предварительной стимуляции (n=16, однофакторный ANOVA, $F_{(4,200)}=30, P=0,01$). Эти переходные и накопленные ответы при термостимуляции и аппликации цАДФ-рибозы показывают, что температура и цАДФ-рибоза оказывают независимое влияние на высвобождение ОХТ.

Увеличение кратности концентрации ОХТ, индуцированное цАДФ-рибозой и нагреванием, значительно ингибирировалось неспецифическим ингибитором TRPM2, 2-APB, и антагонистом рианодиновых рецепторов: в присутствии либо 10 мкМ 2-APB ($1,4 \pm 0,29$ -кратное увеличение по отношению к предшествующему уровню стимуляции, $n=7$) или 100 мкМ 8-Br-cADPR ($1,4 \pm 0,29$ раза относительно уровня предварительной стимуляции, $n=7$, **рисунок 67**), соответственно (двухфакторный ANOVA, $F_{(12,78)}=6,40$, $P=0,0001$). *Post-hoc* Bonferroni's тест показал статистически значимую разницу между группами, обработанными «цАДФ-рибоза + температура» в сравнение 2-APB ($P=0,001$), и «цАДФ-рибоза + нагрев» по сравнению с 8-Br-cADPR ($P=0,01$) на 12 и 15 минуте. Общее увеличение ОХТ с различными условиями инкубации сравнивали, вычисляя общую площадь под кривой (TAUL): TAUL (цАДФ-рибоза) = 34,22; TAUL (8-Br-cADPR) = 20,43; TAUL (2-APB) = 21,66 условных единиц, соответственно.

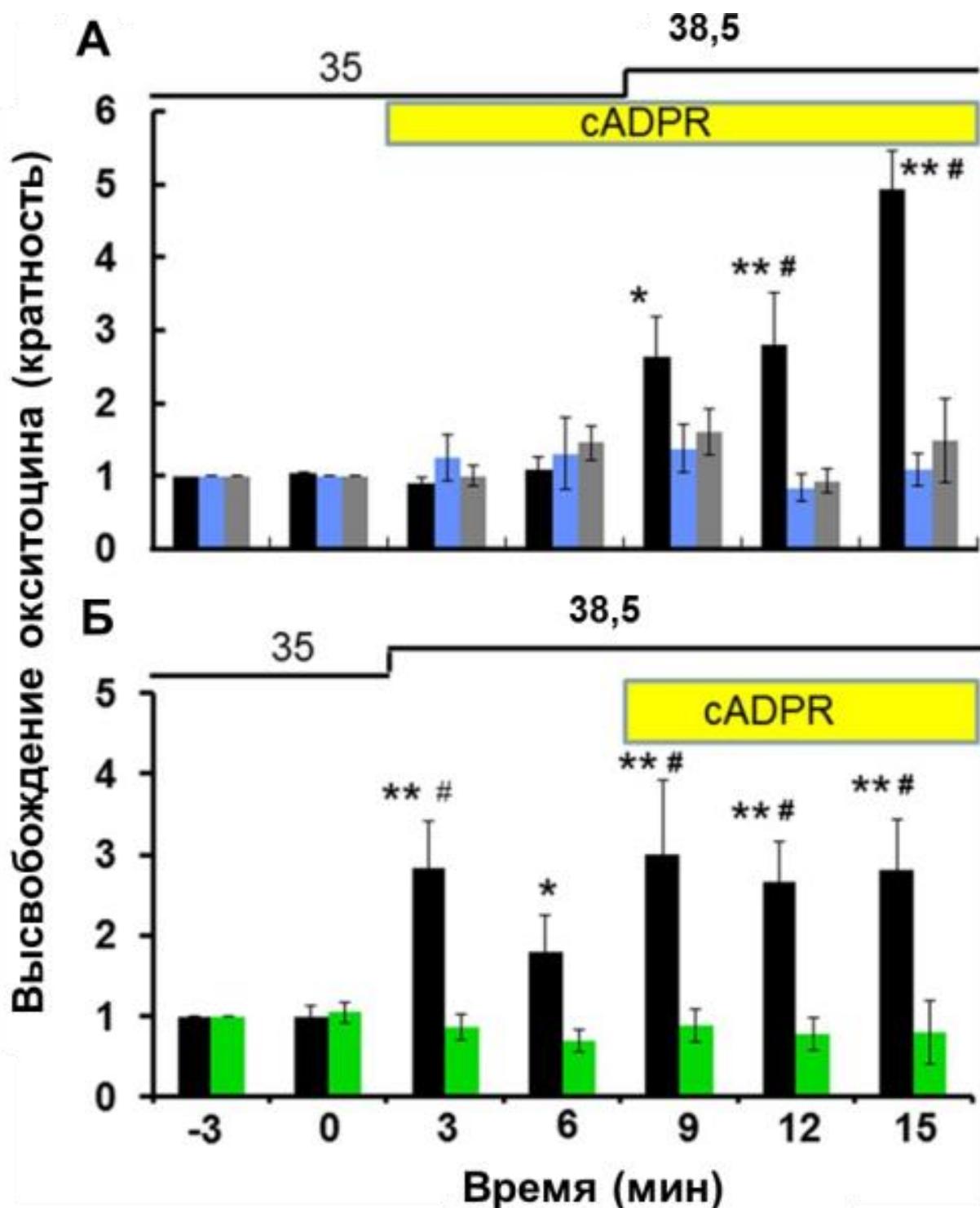


Рисунок 67 Высвобождение окситоцина из изолированного гипоталамуса. Концентрации ОХТ, высвобождаемые одним целым гипоталамусом в инкубационную среду, измерялись каждые 3 мин. Показаны стимуляция 100 мкМ cADPR (цАДФ-рибоза, желтый цвет) и температурный сдвиг 3,5°C от 35 до 38,5°C (толстая линия). Данные показаны как кратности

изменения уровня ОХТ по отношению к 6 минутам перед началом стимуляции, принятые за 1,0. **(А)** Применение цАДФ-рибозы с последующей термостимуляцией у мышей *Cd38^{+/+}*. Черный маркер - данные без каких-либо ингибиторов, синий маркер – присутствие 100 мкМ 8-Br-cADPR, серый маркер - 10 мкМ 2-APB. Двухфакторный ANOVA, $F_{(12, 78)}=6,40$, $P=0,0001$. *Post-hoc* Bonferroni's тест выявил существенные различия между группой без ингибиторов (черный маркер) по сравнению с группами с 2-APB (${}^{\#}P<0,01$) и 8-Br-cADPR (${}^{\#}P<0,01$) через 12 и 15 минут. **(Б)** Применение термостимуляции с последующей аппликацией cADPR. Черный маркер – *Cd38^{+/+}* мыши, зеленый маркер - *Cd38^{-/-}* мыши. $n = 16$, однофакторный ANOVA для *Cd38^{+/+}* мышей, $F_{(4,200)}=30$, $P=0,01$, *Post-hoc* Bonferroni's тест, ${}^{***}P<0,05$ и 0,01 от базального уровня, соответственно. Двухфакторный ANOVA, $F_{(6, 56)}=3,18$, $P=0,01$. Различия между двумя генотипами были значимыми $F_{(1, 56)}=40,07$, $P=0,0001$. Данные, полученные от *Cd38^{-/-}* мышей, значительно отличались от контрольной группы (${}^{\#}P=0,01$). Исходное значение концентрации ОХТ (принятое за 1,0) на 12-й смене в инкубационной среде составило $17,8\pm2,6$ пг/мл ($n=30$).

3.9.2 Высвобождение гипоталамического ОХТ у мышей с локальным нокаутом по CD38 или TRPM2 *in vitro*

Вовлечение CD38 и TRPM2 в высвобождение ОХТ было исследовано фармакологически в вышеуказанных экспериментах. Все описанные выше эксперименты были выполнены с использованием тканей гипоталамуса мышей, которые содержались в группах по генотипу, *Cd38^{+/+}* или *Cd38^{-/-}*. Таким образом, генетические доказательства участия CD38/цАДФ-рибоза ясны, но для TRPM2 это не так. Было бы интересно провести эксперименты по термо- и цАДФ-рибоза-зависимому высвобождению ОХТ у мышей, нокаутных по TRPM2 [373], чтобы получить более ясное понимание участия TRPM2 в высвобождении ОХТ.

Однако, когда мы измерили уровни экспрессии в гипоталамусе мышей дикого типа C57BL/6, мы обнаружили, что уровень мРНК TRPM2 каналов был относительно низким. Поэтому мы не проводили экспериментов на мышах TRPM2 КО. Вместо этого мы применили парадигму нокдауна мешающей РНК при высвобождении ОХТ из гипоталамуса.

Лентивирусы с короткими шпилечными РНК (shRNAs) для CD38 и TRPM2 инъецировали в третий желудочек *Cd38^{+/+}* мышей. После 2 недель восстановления уровни мРНК CD38 и TRPM2 снизились до $43\pm3\%$ ($n=4$) скремблированной РНК. Как и ожидалось, увеличение кратности концентраций ОХТ, вызванных тепловой стимуляцией, было значительно ниже в средах, содержащих гипоталамус, выделенный из мышей, обработанных shRNAs либо для CD38 ($1,6\pm0,25$, $n=4$), либо для TRPM2 ($1,3\pm0,43$, $n=5$) по сравнению с обработанными скремблированной shRNA ($3,2\pm1,2$, $n=3$). Увеличение кратности концентраций ОХТ при одновременной стимуляции теплом и cADPR также было значительно ниже у мышей, которым вводили shRNAs либо для CD38 ($1,5\pm0,25$; $n=6$), либо для TRPM2 ($1,3\pm0,43$; $n=5$) по сравнению с таковыми, обработанными скремблированной shRNA ($3,7\pm1,2$; $n=5$) (однофакторный ANOVA, $F_{(2,11)}=4,257$; $P=0,0358$). Таким образом, эти эксперименты с нокаутными животными и с локальным нокдауном показали, что оба белка, и CD38, и TRPM2, участвуют в цАДФ-рибоза- и термо-индуцированном высвобождении ОХТ *in vitro*.

3.9.3 Высвобождение ОХТ *in vitro* у социально стрессированных мышей

В вышеописанных экспериментах *in vitro* с измерением высвобождения ОХТ, мы наблюдали положительные реакции, но в то же время и чрезвычайно большие степени вариации от одного эксперимента к другому. После тщательного изучения процедуры мы отметили, что никаких (или более низких) ответов не было получено с использованием самцов дикого типа из одного и того же помета при групповом содержании и выращенные в виварии лаборатории. Кроме того,

вариации в реакции высвобождения ОХТ часто усиливались у самцов в группах, смешанных из разных пометов, полученных от внешнего поставщика.

У последних драки были регулярными, и мышей можно было классифицировать на победителей (без ран) и проигравших (с ранами). Чтобы подтвердить, что изменения в высвобождении ОХТ были связаны с различиями в социальном статусе, вызванными групповым содержанием, мы применили парадигму психологического стресса (например, воздействие новой среды [317]) [18, 19]. Мы определяли иерархические отношения между мышами, используя тест с трубой на доминантность.

Двенадцать мышей из смешанных пометов испытывали парным путем 14-20 раз в тесте с трубой, определяя мышей в доминирующие, промежуточные и подчиненные группы. Самая сильная мышь (#1) была соединена с самой сильной мышью в подчиненной группе (#9), и аналогичным образом #2, 3 и 4 мышей спаривались с #10, 11 и 12 мышами в четырех клетках. Разбитые по парам мыши испытывали стресс «смены клетки» (психологический стресс), путем перемещения их в чистые клетки каждое утро в течение 4 дней. Количество высвобожденного ОХТ измеряли в гипоталамусе, изолированном от одной трети побеждающих мышей (доминантная группа) и одной трети покорных мышей (подчиненная группа).

Как показано на **рисунке 68**, подчиненная группа ($n=25$, однофакторный ANOVA, $F_{(6, 168)}=2,30, P=0,0234$) выделяет намного больше ОХТ в ответ на теплостимуляцию или в комбинации с цАДФ-рибозой ($n=13$, однофакторный ANOVA, $F_{(6, 84)}=2,32, P=0,0187$). Увеличение складки кривой концентрации ОХТ в ответ на тепло и цАДФ-рибозу составляло $1,73\pm0,64$ и $2,08\pm0,37$ относительно уровня предварительной стимуляции у подчиненных и доминантных мышей соответственно. Двухфакторный ANOVA продемонстрировал, что взаимодействие между стимуляций и временем не было статистически значимым ($F_{(6,56)}=0,62; P=0,7162$), но значительное влияние оказывает стимуляция ($F_{(1,56)}=5,02; P=0,0487$) и время ($F_{(2, 56)}=2,54; P=0,0139$) как независимые факторы. Не было выявлено существенной разницы между двумя группами в соответствии

с *post hoc* Bonferroni's тестом. Мы рассчитали, что TAUL (доминирующие) = 8,45 и TAUL (подчиненные) = 13,13 произвольных единиц, соответственно.

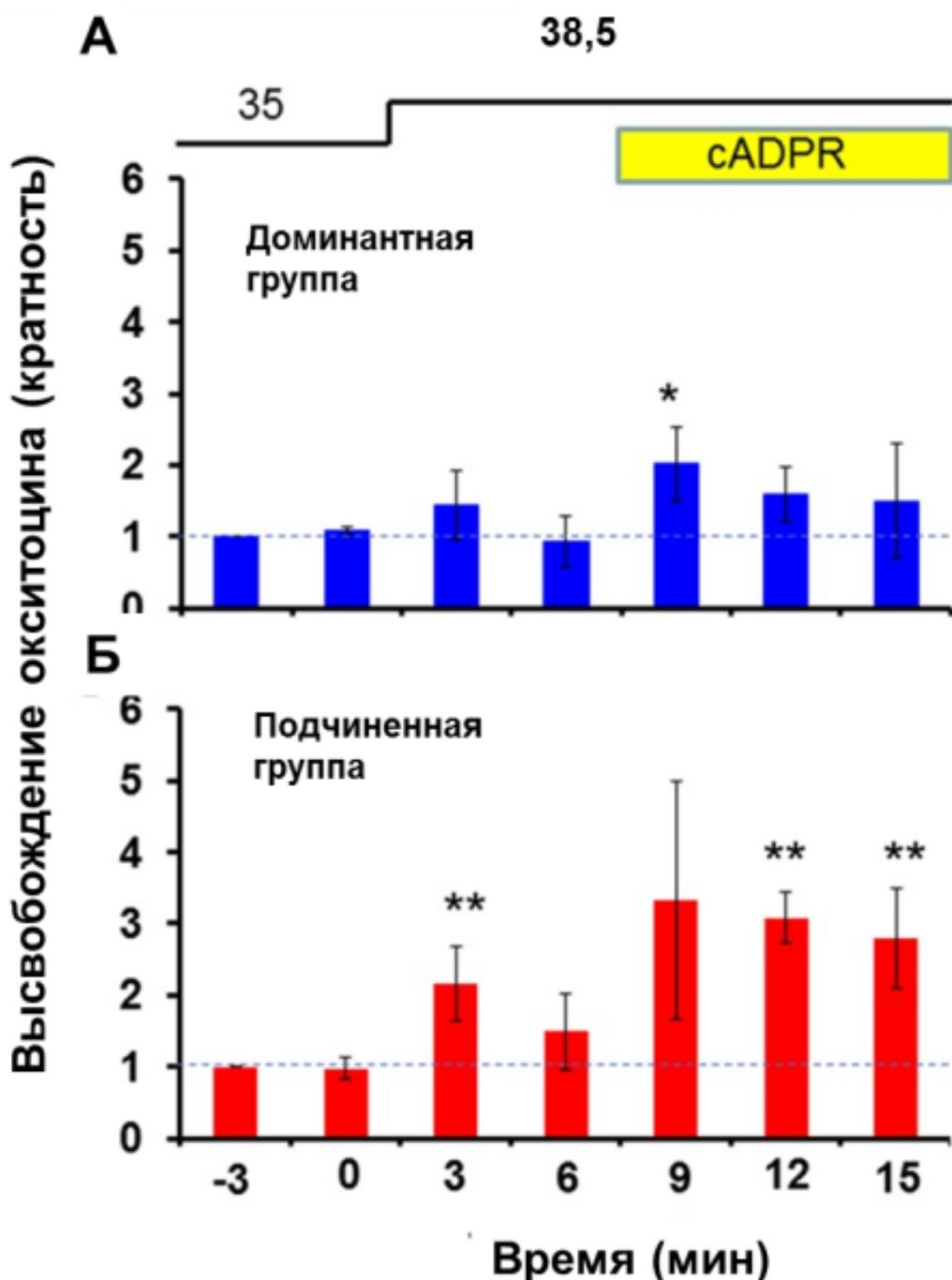


Рисунок 68 Высвобождение окситоцина изолированным и гипоталамусом мышей доминантной или подчиненной группы. Социальный статус *Cd38^{+/+}* мышей определяли с помощью теста с трубой в 1-й день эксперимента. Пары, состоящие из доминантного и подчиненного животного, подвергали психологическому стрессу путем смены домашней клетки каждое

утро в течение 4 дней. Через 3 ч после последнего стресса гипоталамус доминантных (А) и подчиненных (Б) мышей изолировали и инкубировали. Концентрацию ОХТ в инкубационной среде измеряли при термо-стимуляции с последующей аппликацией сADPR (цАДФ-рибоза). Данные показаны как изменение кратности концентрации ОХТ относительно уровня ОХТ до начала стимуляции, принятого за 1,0. n=25, однофакторный ANOVA, $F_{(6, 168)}=2,30$, $P=0,0234$ - у доминантных мышей. n = 13, однофакторный ANOVA, $F_{(6, 84)}=2,32$, $P=0,0187$ -у подчиненных мышей. *Post-hoc* Bonferroni's тест выявил существенные отличия от уровня предварительной стимуляции $^{***}P<0,05$ и 0,01, соответственно. Исходное значение концентрации ОХТ (принятое за 1,0) на 12-й смене в инкубационной среде составило $22,3\pm2,5$ и $16,2\pm7,0$ пг/мл для мышей доминантной и подчиненной группы, соответственно.

3.9.4 Высвобождение ОХТ *in vivo* при перфузии головного мозга с помощью цАДФ-рибозы у доминантных или подчиненных мышей

Необходимо продемонстрировать высвобождение ОХТ из гипоталамуса *in vivo* и показать отчетливый высокий или низкий уровень высвобождения ОХТ у подчиненных и доминантных мышей соответственно. На первом этапе мы использовали двухтактный тип микроперфузационного метода головного мозга в условиях свободного передвижения пар мышей, которые подвергались повторному социальному стрессу с помощью парадигмы смены клеток,. Количество ОХТ, высвобожденного в течение 60 мин у подчиненных мышей ($4,1\pm0,6$ раз против уровня предварительной стимуляции, соответственно, n=5), было значительно больше, чем у доминантных мышей ($2,2\pm0,5$ раза, n=6, относительно уровня предварительной стимуляции) при сравнении с уровнями у доминантных ($0,81\pm0,32$ раз) или подчиненных ($1,22\pm0,17$ раза) мышей, которых перфузировали физиологическим раствором в качестве контроля (**рисунок 69**).

Анализ результатов группы методом двухфакторного ANOVA выявил существенный эффект взаимодействия стимуляции и времени ($F_{(9,288)}=5,33$, $P=0,0001$). Также наблюдалось значительное влияние стимуляции ($F_{(3,288)}=22,53$, $P=0,0001$) и время ($F_{(3,288)}=10,05$; $P=0,0001$) как независимых факторов. Эти результаты позволяют предположить, что цАДФ-рибоза эффективна для высвобождения OXT *in vivo* при нормальной температуре тела (которая уже достаточно высока) и/или с нейрональной деполяризующей активностью, но без прайминга за счет повышения температуры тела.

3.9.5 Высвобождение OXT *in vivo* при перфузии головного мозга с помощью cADPR у мышей доминантной и подчиненной группы

Необходимо продемонстрировать высвобождение OXT из гипоталамуса *in vivo* и показать отчетливый высокий или низкий уровень высвобождения у подчиненных и доминантных мышей соответственно. На первом этапе мы использовали двухтактный тип микроперфузационного метода головного мозга в условиях свободного передвижения пар мышей, которые подвергались повторному социальному стрессу с помощью переключения клеток. Количество OXT, высвобожденного в течение 60 мин у подчиненных мышей (кратность $4,1\pm0,6$ - относительно уровня пред-стимуляции, $n=5$), было значительно больше, чем у доминантной группы (кратность $2,2\pm0,5$ - относительно уровня пред-стимуляции, $n=6$). Сравнение проводили с мышами доминантной и подчиненной группы, перфузированных и физиологическим раствором (**рисунок 69**).

3.9.6 Высвобождение OXT *in vivo* при гипертермии у мышей - эффекты воздействии открытого поля

Наиболее важный медицинский вопрос относительно социальных нарушений при психических расстройствах, каким образом высвобождение OXT связано с гипертермией в ответ на социальный стресс, потому что психологический стресс влияет на поведение и вегетативные функции, включая гипертермию [64, 238, 378]. Мы исследовали, может ли стресс социальной тревожности в новой среде индуцировать высвобождение OXT, подвергая мышей воздействию открытого поля, где индуцируется гипертермия [227]. Чтобы избежать эффектов, вызванных содержанием в группах, в этих экспериментах мы использовали мышей, содержащихся индивидуально. Мышей подвергали стрессу «новой среды» в лабиринте «Открытое поле». Ректальная температура значительно повышалась до $37,8 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ от контрольного уровня $36,4 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ в течение первых 5 минут, и повышение температуры поддерживалось в течение 15 минут (рисунок 70; $n=9-18$; однофакторный ANOVA $F_{(3, 28)}=8,373, P=0,001$).

Уровень OXT в спинномозговой жидкости также повышалась через 5 мин после нахождения животного в открытом поле. Средняя концентрация OXT составляла 605 ± 114 пг/мл по сравнению с контрольным уровнем перед тестом 251 ± 13 пг/мл (однофакторный ANOVA с Post hoc Bonferroni's тестом, $n=9-18$, $F_{(4, 62)}=4,60, P=0,005$).

Удивительно, что через 10 и 15 минут после воздействия концентрация OXT в CSF уже вернулась на уровень контроля (рисунок 70).

При такой же парадигме влияния открытого поля с использованием мышей *Cd38^{-/-}* (рисунок 70, $n=5-21$) было обнаружено, что повышение температуры начиналось в течение первых 5 мин ($37,8 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ от $36,6 \pm 0,1^{\circ}\text{C}, P=0,01$; однофакторный ANOVA, $F_{(3, 28)}=7,733, P=0,0001$), но не наблюдалось достоверного увеличения уровня OXT в CSF (однофакторный ANOVA, $F_{(4, 50)}=1,74, P=0,1567$). Эти результаты демонстрируют, что высвобождение OXT

периодически чувствительно к начальной фазе психологического стресса (в течение 5 мин) с повышением температуры тела у мышей дикого типа, но увеличение уровня ОХТ не было устойчивым.

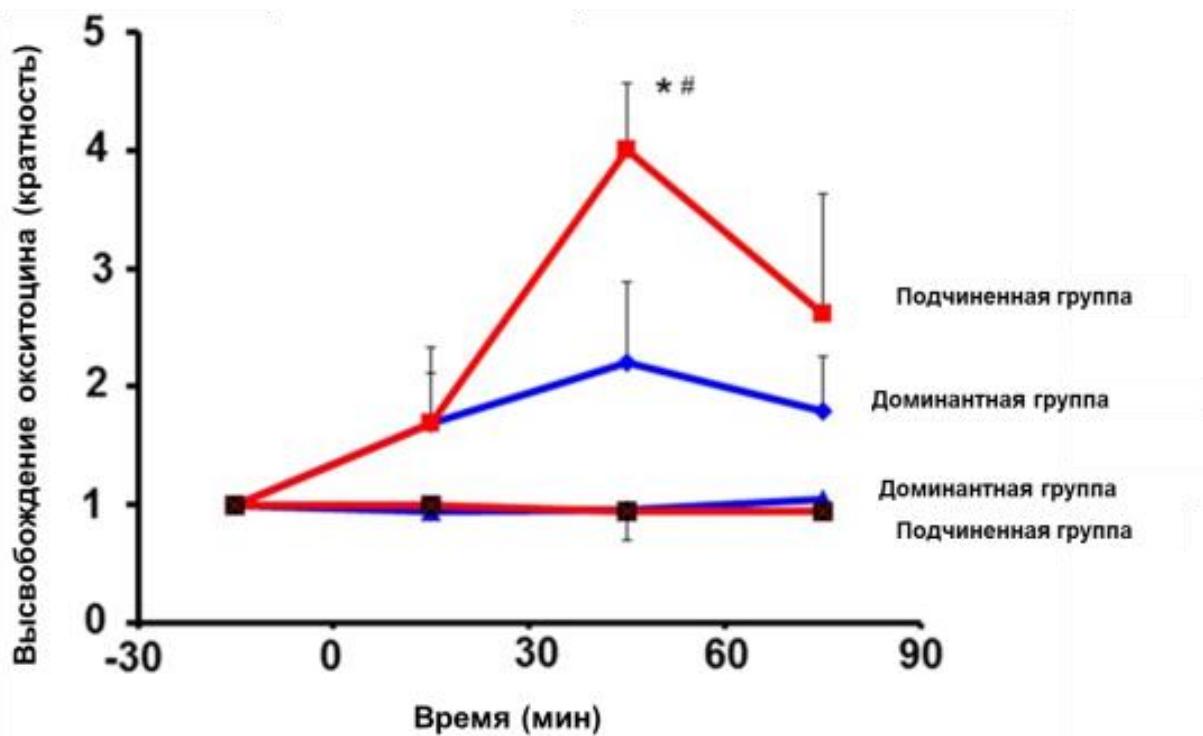


Рисунок 69 Повышение концентрации ОХТ с помощью цАДФ-рибозы в микроперфузатах головного мозга *Cd38^{+/+}* мышей. Пары, состоящие из доминантного и подчиненного животного, подвергали психологическому стрессу путем смены домашней клетки каждое утро в течение 4 дней. Внеклеточный флюид из PVN у обоих типов мышей собирали каждые 30 мин в течение 30 мин с использованием микроперфузационной системы двухтактного типа. Данные представлены в виде изменений кратности уровней ОХТ в течение 30 мин относительно уровня ОХТ до начала стимуляции, принятого за 1,0.. Кинетика изменения уровней ОХТ показана для подчиненных мышей с 100 мкМ сADPR (красная линия с красными квадратами) или физиологическим раствором (красная линия с черными квадратами) и для доминантных мышей с сADPR (голубая линия с ромбами) и физиологическим раствором (синие треугольники, контроль).

Однофакторный ANOVA с *Post-hoc* Bonferroni's тестом: $n=5$, $F_{(3,16)}=4,40$, $P=0,027$ для подчиненных мышей с cADPR; $n=6$, $F_{(3,20)}=1,13$, $P=0,3594$ для доминантных мышей. $*P<0,05$ от базального уровня. $^{\#}P<0,01$ по сравнению со значениями для мышей с физиологическим раствором. Двухфакторный ANOVA выявил существенные эффекты взаимодействия *Стимуляция* \times *Время* ($F_{(9, 288)}=5,33$, $P=0,0001$). Также наблюдалось значительные независимые эффекты стимуляции ($F_{(3,288)}=22,53$, $P=0,0001$) и времени ($F_{(3,288)}=10,05$, $P=0,0001$). Исходное значение концентрации OXT в начале отбора проб (-30 мин) составило $136,7 \pm 11,5$ пг/мл для всех 16 мышей.

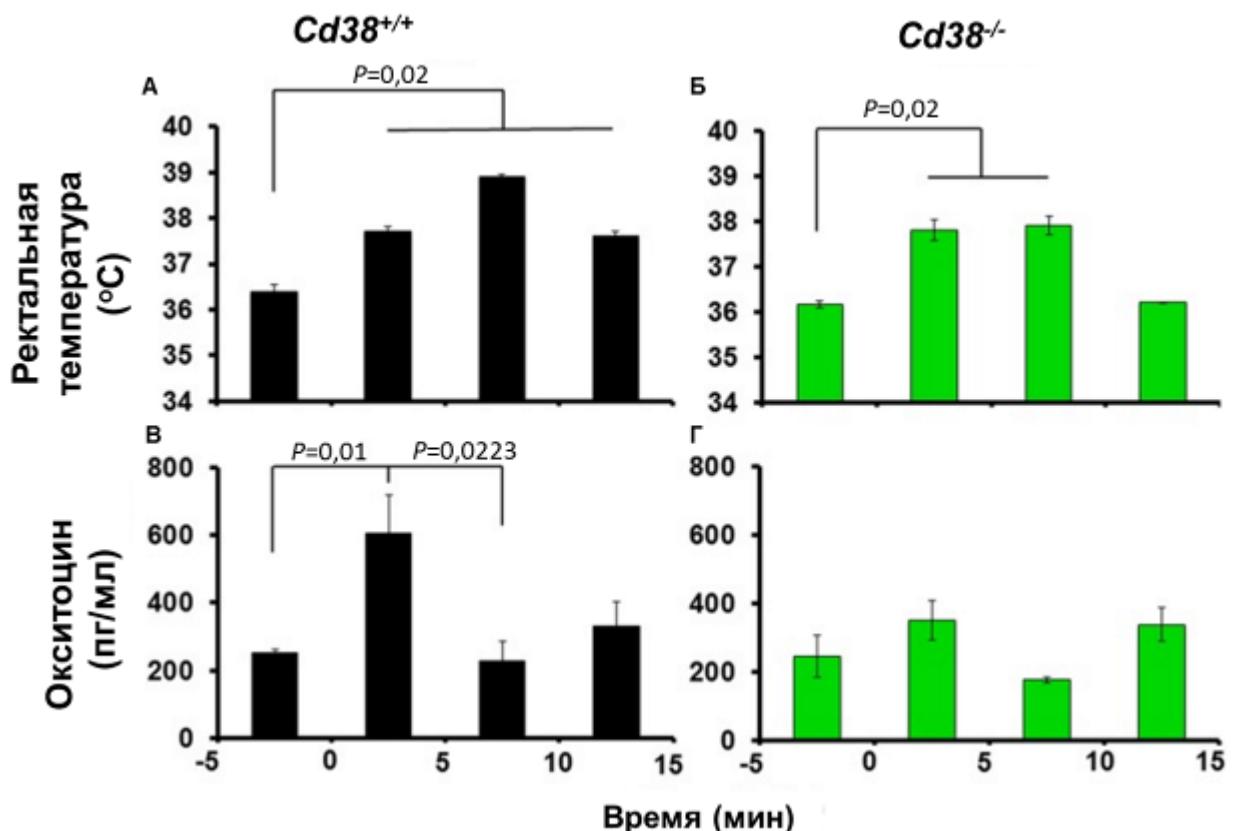


Рисунок 70 Температура тела и концентрация ОХТ в спинномозговой жидкости (CSF) после воздействия нового стресса окружающей среды в teste «Открытое поле». Ректальные температуры $Cd38^{+/+}$ (А) и $Cd38^{-/-}$ (Б) мышей до и после 5, 10 и 15 минут нахождения в лабиринте «Открытое поле» (стресс-тревога). $n=9-18$, однофакторный ANOVA ($F_{(3,28)}=8,373$, $P=0,001$ для $Cd38^{+/+}$ мышей; $n=9-18$, $F_{(4, 62)}=4,60$, $P=0,005$ для $Cd38^{-/-}$ мышей). Концентрации ОХТ в CSF, собранной у $Cd38^{+/+}$ (В) или $Cd38^{-/-}$ (Г) мышей после нахождения в открытом поле в течение

одного и того же времени. Однофакторный ANOVA с *post-hoc* Bonferroni's тестом: $n=9-18$, $F_{(4,62)}=4,60$, $P=0,01$ - у мышей $Cd38^{+/+}$; $n=5-21$, $F_{(4,50)}=1,74$, $P=0,1567$ - у $Cd38^{-/-}$ мышей.

3.9.7 Уровень OXT в CSF во время гипертермии у мышей с инъекцией липополисахарида (LPS)

Для получения дополнительных доказательств высвобождения OXT во время гипертермии, температурой тела мышей манипулировали проявлением лихорадки в модели с введением LPS. Мыши и крысы демонстрируют двухфазную реакцию температуры тела на введение липополисахарида: начальная гипотермия с последующей гипертермией [407]. Таким образом, ректальная температура у мышей $Cd38^{+/+}$, получивших внутрибрюшинную инъекцию 3 мг/кг LPS, снижалась в течение первых 5-6 ч, но затем поддерживалась на высоком уровне в течение 15-36 ч. Через 24 ч после инъекции LPS перед началом проведения тестов ректальная температура составляла $36,2 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$ по сравнению с $35,4 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ($n=8$) со средним увеличением $0,85 \pm 0,14^{\circ}\text{C}$, тогда как разница между временными точками после введения LPS, 0 и 24 ч, составляла $-0,04 \pm 0,20^{\circ}\text{C}$ ($n=6$) у мышей, обработанных фосфатно-буферным раствором (PBS) (**рисунок 71Б**).

На основании информации о температуре мы измеряли концентрации OXT в CSF, которые могли отражать влияние гипертермии на OXT-высвобождение *in vivo*. Концентрация OXT в CSF составляла $60,1 \pm 11,6$ пг/мг у мышей-самцов, получавших LPS, что было вдвое больше ($30,5 \pm 6,6$ пг/мл) по сравнению с контрольной группой (PBS, $n=8$).

Напротив, мы не наблюдали различий в концентрациях OXT в CSF у $Cd38^{-/-}$ мышей с инъекциями LPS ($26,4 \pm 9,1$ пг/мл) или PBS ($18,1 \pm 2,5$ пг/мл). Ректальная температура значительно повысилась на $0,62 \pm 0,16^{\circ}\text{C}$ при введение липополисахарида у $Cd38^{-/-}$ мышей (**рисунок 71А**). Двухфакторный ANOVA не обнаружил значительного взаимного влияния *Вводимый препарат x Генотип*

($F_{(1,16)}=1,84$, $P=0,1934$), но были обнаружены эффекты введения липополисахарида ($F_{(1,16)}=8,37$, $P=0,0106$) и эффекты генотипа ($F_{(1,16)}=5,30$, $P=0,0351$). *Post hoc* Bonferroni's тест показал существенную разницу между введением LPS или PBS у мышей дикого типа ($P=0,0001$).

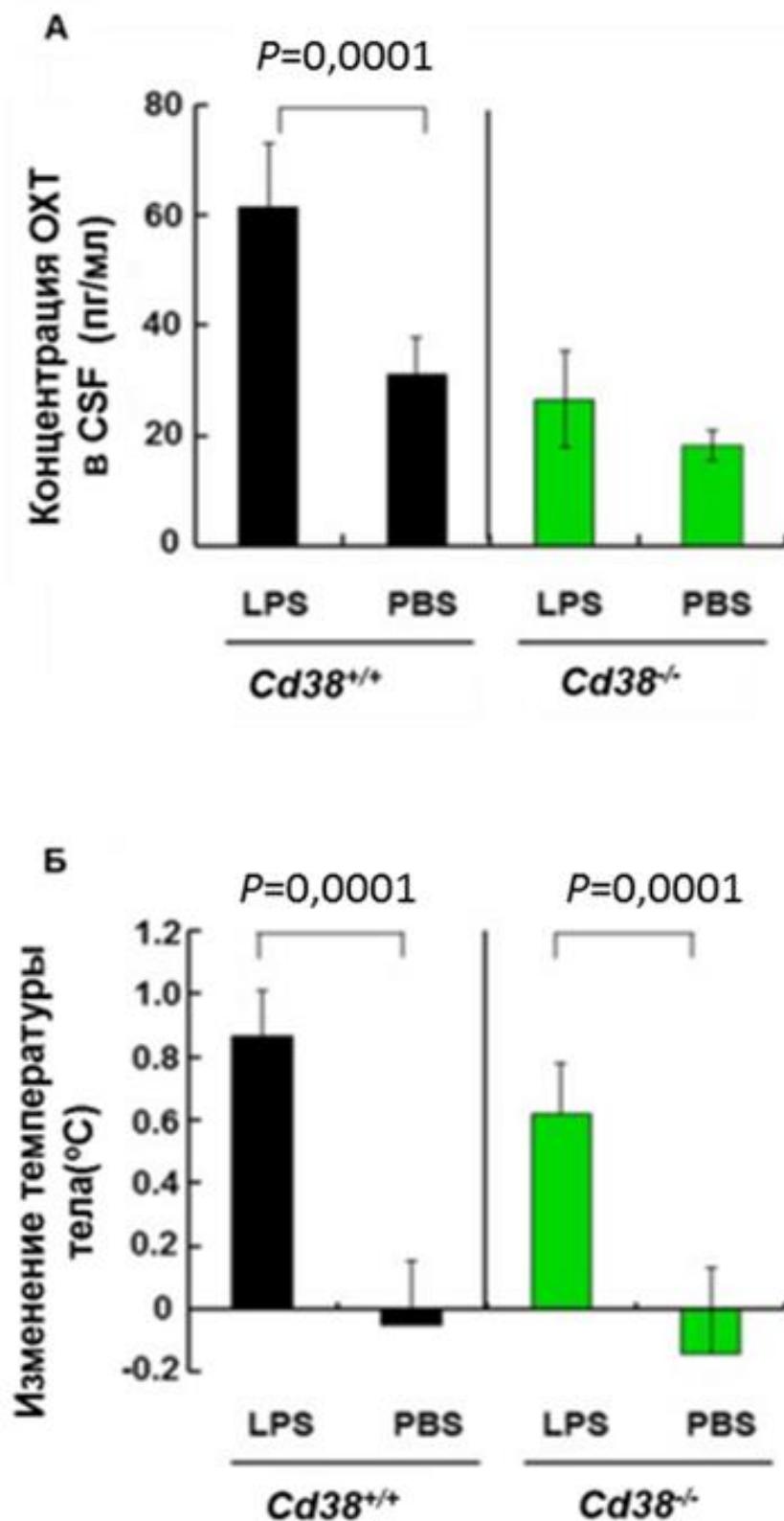


Рисунок 71 Влияние липополисахарида (LPS) на концентрацию окситоцина (OXT) в цереброспинальной жидкости (CSF) и температуру тела. (А) Концентрации OXT в CSF у *Cd38^{+/+}* и *Cd38^{-/-}* мышей через 24 часа после внутрибрюшинной инъекцией ЛПС (3 нг/кг) или фосфатно-солевого буферного раствора (PBS). (Б) Изменение температуры тела выражено как разница

ректальной температуры по отношению к начальным уровням (время 0) у *Cd38^{+/+}* и *Cd38^{-/-}* мышей. Двухфакторный ANOVA обнаружил независимые эффекты LPS ($F_{(1,16)}=8,37, P=0,0106$) и генотипа ($F_{(1,16)}=5,30, P=0,0351$). Post hoc Bonferroni's тест показал существенную существенную разницу между инъекциями LPS и PBS у *Cd38^{+/+}* и *Cd38^{-/-}* мышей ($P=0,0001$). n=5-10.

3.9.8 Механизмы стимулирующего высвобождения ОХТ на уровнях мРНК и белков CD38 и TRPM2

Результаты выше указанных экспериментов предполагают вклад цАДФ-рибозы и гипертермии для облегчения высвобождения ОХТ, что возможно связано либо с кинетической активацией, либо с обилием молекул CD38 и TRPM2. Поскольку очень трудно проанализировать первый возможный фактор, мы сначала проанализировали второй - уровни мРНК CD38 и TRPM2 и TRPM2 иммунореактивность. В настоящих экспериментах экспрессия мРНК была нормализована по сравнению с экспрессией мРНК глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) (рисунок 72). Уровни CD38 мРНК значительно снижались в гипоталамусе у мышей попарного содержания и стрессом «смена клетки» (каждое утро в течение 4 дней) по сравнению с мышами без стресса, но там не было обнаружено никакой разницы между подчиненными и доминантными группами животных.

Уровни мРНК TRPM2 значительно увеличивались в гипоталамусе у подчиненной группы мышей по сравнению с доминантной группой, которые получали одинаковый стресс «смена клетки». Уровни мРНК TRPM2 у доминантных мышей были такими же, как у мышей с групповым размещением без стресса.

Ранее было сообщено о высокой иммунореактивности CD38 в гипоталамусе [193], но не было показано, экспрессируется ли TRPM2 в данном отделе головного мозга, в частности окситоцинергическими нейронами, или сколько

TRPM2 ко-экспрессируется с CD38. Как показано на **рисунке 73**, экспрессия TRPM2 была значительна в гипоталамусе как в окситоцинергических нейронах, так и в других клетках. Совместная локализация CD38 и TRPM2 была обнаружена в $12,1 \pm 3,9\%$ клетках (400-500 клеток, подсчитанных в четырех областях), в то время как TRPM2 и CD38-положительно окрашенные клетки содержали соответственно $21,1 \pm 6,2\%$ и $32,1 \pm 4,3\%$ клеток.

Интенсивность экспрессии при совместном окрашивании CD38 и TRPM2 оказалась выше у подчиненных мышей (**рисунок 74А**) по сравнению с доминантной группой (**рисунок 74Б**), что, вероятно, связано с повышением активности TRPM2.

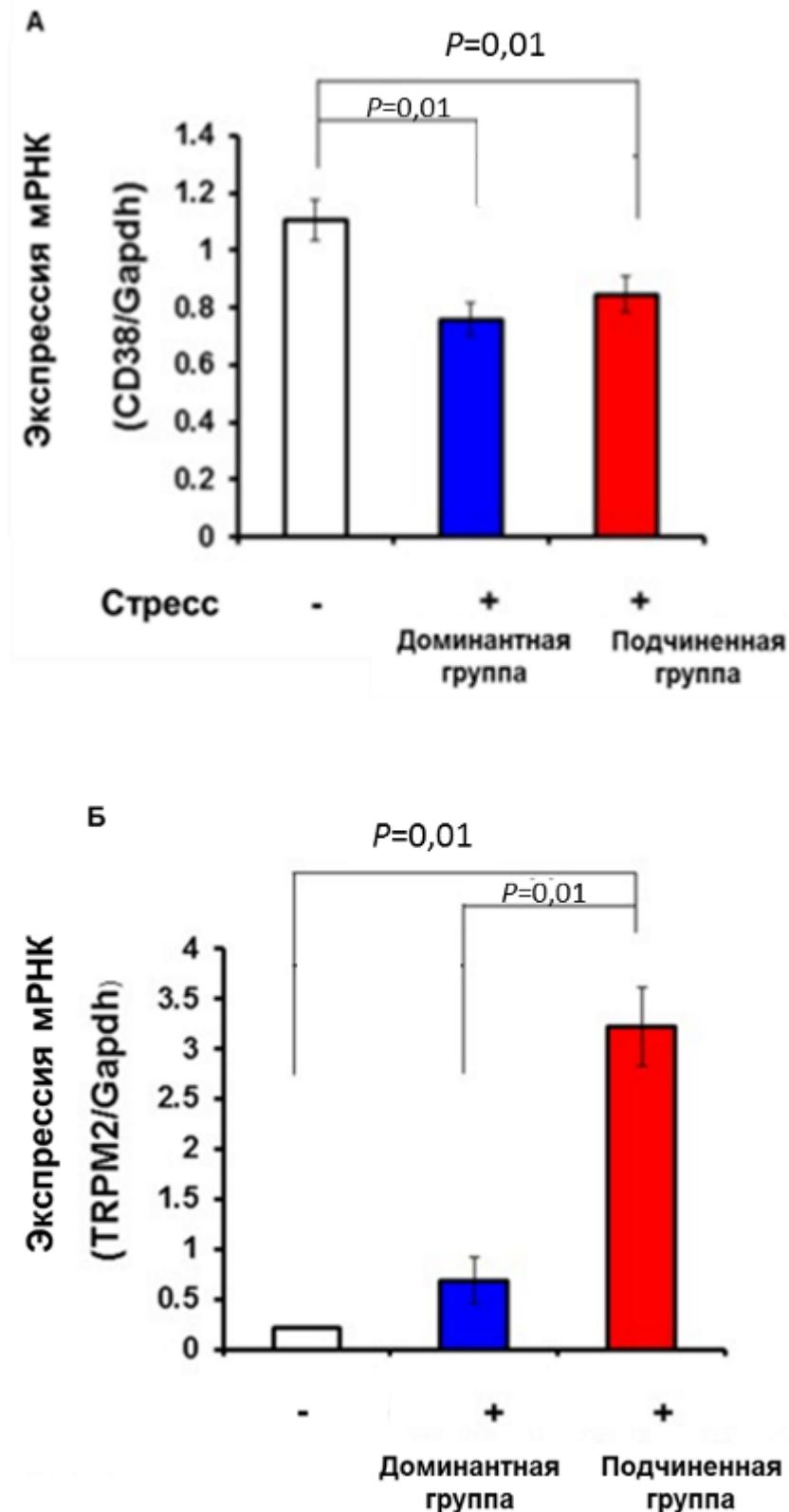


Рисунок 72 Изменения, вызванные социальным стрессом, в уровнях экспрессии мРНК CD38 и TRPM2. Суммарную РНК экстрагировали из гипоталамуса доминантных и подчиненных групп мышей, которые подвергались

социальному (содержание парами – доминант и подчиненный) и психологическому (смена домашней клетки каждое утро в течение 4 дней) стрессу. В качестве контроля – мыши с групповым содержанием (пять мышей в клетке) без психологического стресса (белый маркер). Уровни экспрессии относительных CD38 (А) и TRPM2 (Б) мРНК (выраженные как изменения кратности относительно контроля) у мышей доминантной (синий маркер) и подчиненной (красный маркер) группах определялись с помощью количественной ОТ-ПЦР с GAPDH в качестве контрольного реверсного гена. n=6-7 в каждой группе.

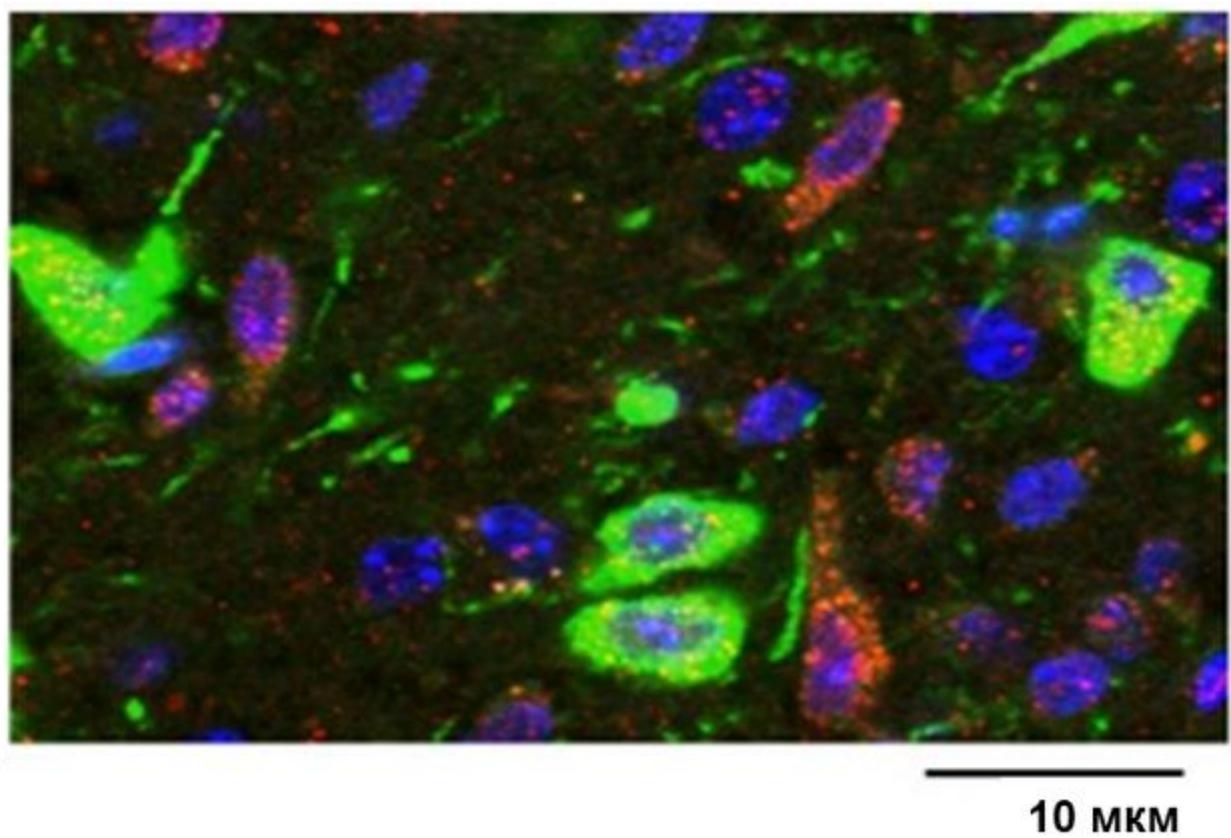
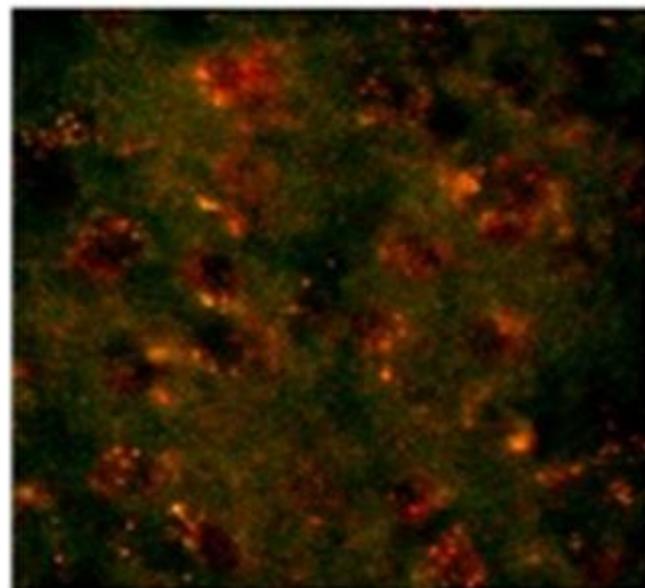
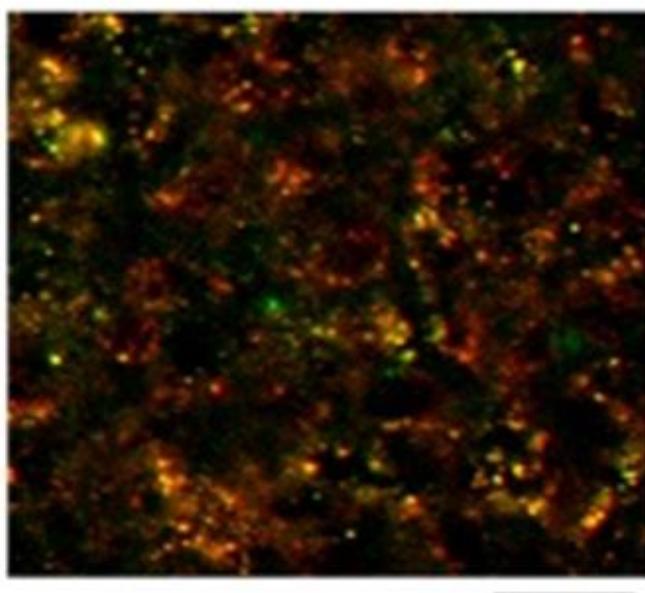


Рисунок 73 Колокализация окситоцина (OXT), CD38 или TRPM2 в паравентрикулярном ядре (PVN). Иммунореактивность OXT (зеленый), TRPM2 (красный), DAPI (ядро, синий) в гипоталамусе мышей, содержащихся в группе.

А**Б**

20 мкм

Рисунок 74 Изображения объединенной имmunoreактивности CD38 (красный) и TRPM2 (зеленый) в PVN у доминантных (А) и подчиненных (Б) мышей в паравентрикулярном ядре (PVN). Совместная локализация была усиlena у подчиненных мышей, которые подверглись социальному (содержание парами – доминант и подчиненный) и психологическому (смена домашней клетки каждое утро в течение 4 дней) стрессу.

ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Увеличивающееся число больных с синдромами различной этиологии под названием «расстройства аутистического спектра» (PAC) [277] объединяет ученых междисциплинарной научно-исследовательской платформы (включая моделирование патологии на животных) в поиске соответствующего фармакологического лечения (Shen et al., 2016; Wei et al., 2016; Zheng et al., 2016). Окситоцин (OXT) является наиболее перспективным в качестве терапии. OXT представляет собой нейропептид с мощным и глубоким действием для многих физиологических процессов в головном мозге, сердечно-сосудистой и репродуктивной системах [135]. Специфические свойства «многоголикого OXT» [420] напрямую связаны с характеристиками сложных форм поведения [375]. Низкий уровень эндогенного OXT ассоциирован с дефицитом социальной когниции при различных заболеваниях, включая PAC, шизофрению и состояния тревожности [111, 171, 179, 254, 356, 416]. Введение OXT устраняет дефицит социального поведения у животных [129, 193, 219, 369], а также и у людей во время клинических испытаний [46, 208, 273, 404].

Поведенческие изменения, ассоциированные с недостаточностью OXT, также связаны с мобилизацией внутриклеточного Ca^{2+} - модулятора высвобождения OXT из терминалов сомы, дендритов и аксонов нейронов гипоталамуса [169, 228]. Этот механизм регулируется активностью АДФ-рибозилклазы/CD38, которая является мультифункциональной молекулой со свойствами и энзима, и рецептора, а также играет ключевую роль во многих физиологических процессах в тканях организма (пролиферация, дифферентации, миграция, адгезия и секреция) [193, 224, 276, 330, 336]. Ранее нами было показано, что CD38 участвует в секреции OXT и реализации социального поведения (включая родительское) у мышей. Этот механизм характерен и для человека, как в раннем возрасте, так и в отдаленные периоды онтогенеза [193, 273, 274].

Использование экспериментальных моделей заболеваний развития на мышах для изучения социальной коммуникации и социального взаимодействия, а также клеточных культур для углубленного понимания молекулярных каскадов, является важной стратегией нейробиологии и патофизиологии. Применение экспериментальных моделей и современных методов анализа позволяют с каждым новым экспериментом все глубже продвинуться в понимании клеточных и молекулярных событий, которые лежат в основе формирования социального поведения и его реализации, а также найти новые молекулярные мишени для фармакологической коррекции подобных нарушений.

4.1 Циклическая ADP-рибоза-, TRPM2- и ОХТ-зависимые осцилляции внутриклеточного кальция в клетках нейрональной природы грызунов *in vitro*

Основываясь на наших исследования в области влияние ОХТ на поведенческие реакции и механизмах ауторегуляции окситоцина [242], мы проанализировали сигнальные механизмы с участием АДФ-рибозилцилазы, цАДФ-рибозы, опосредующая секрецию окситоцина, через наблюдения осцилляций внутриклеточного кальция и активацию TRPM2 каналов в клетках нейрональной природы NG108-15.

Мы впервые продемонстрировали, что цАДФ-рибоза является агонистом нейрональных клеток, и действует как внутриклеточный вторичный мессенджер с негативной регуляцией ОХТ рецепторов. Поскольку удаление внеклеточного Ca^{2+} нивелировало увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, то этот ответ был в значительной степени результатом поступления Ca^{2+} через катионные каналы, например, каналы TRPM2 [372]. Это подтверждается присутствием мРНК TRPM2, увеличивающей возрастание $[\text{Ca}^{2+}]_i$, индуцированное комбинацией повышения температуры и введением цАДФ-рибозы; и подавлением цАДФ-рибоза-индуцированного возрастания $[\text{Ca}^{2+}]_i$ с помощью неспецифического, но сильного ингибитора

TRPM2 каналов [370]. Кроме того, при отсутствии каких-либо тестируемых нуклеотидов, только нагревание также вызывает увеличение $[Ca^{2+}]_i$, как и сообщалось ранее Togashi et al. [370]. АДФ-рибоза, которая не оказывает действия на рецепторы к рианодину, также индуцировала увеличение $[Ca^{2+}]_i$, которое продолжалось в течение 1-2 мин, что наблюдается и в случае TRPM2 каналов [308, 372]. Таким образом, наши результаты доказывают свойство внеклеточной цАДФ-рибозы стимулировать термо-чувствительное Ca^{2+} -индуцируемое высвобождение кальция через каналы TRPM2 в клетках NG108-15 (**рисунок 75**).

Таким образом, эти результаты указывают на то, что в организме млекопитающего каналы TRPM2, скорее всего, не открываются достаточно при нормальной температуре тела, но становятся активными, когда температура тела повышается, то есть эта система может функционировать в условиях высокой температуры. Такие особенности работы TRPM2 косвенно свидетельствуют о роли этих каналов в развитии лихорадочных состояний и, вероятно, неврологических расстройств, ассоциированных с ними. Полагаем, что это представляет интересное направление для последующих исследований.

Окситоцин-индуцированное возрастание $[Ca^{2+}]_i$ в клетках NG108-15, экспрессирующих человеческие рецепторы к окситоцину, продолжалось в течение 1-3 мин. Эта продолжительное возрастание $[Ca^{2+}]_i$ подобно увеличению, вызываемому цАДФ-рибозой и температурой, но значительно короче в присутствие окситоцина, наблюдаемое в нервных окончаниях гипофиза мыши [242]. В нервных окончаниях цАДФ-рибоза в значительной степени опосредовала стабильный сигнал Ca^{2+} в течение 5 минут и была блокирована предварительной обработкой нервных окончаний 8-bromo-cADPR или ингибиторами протеинкиназы С [242].

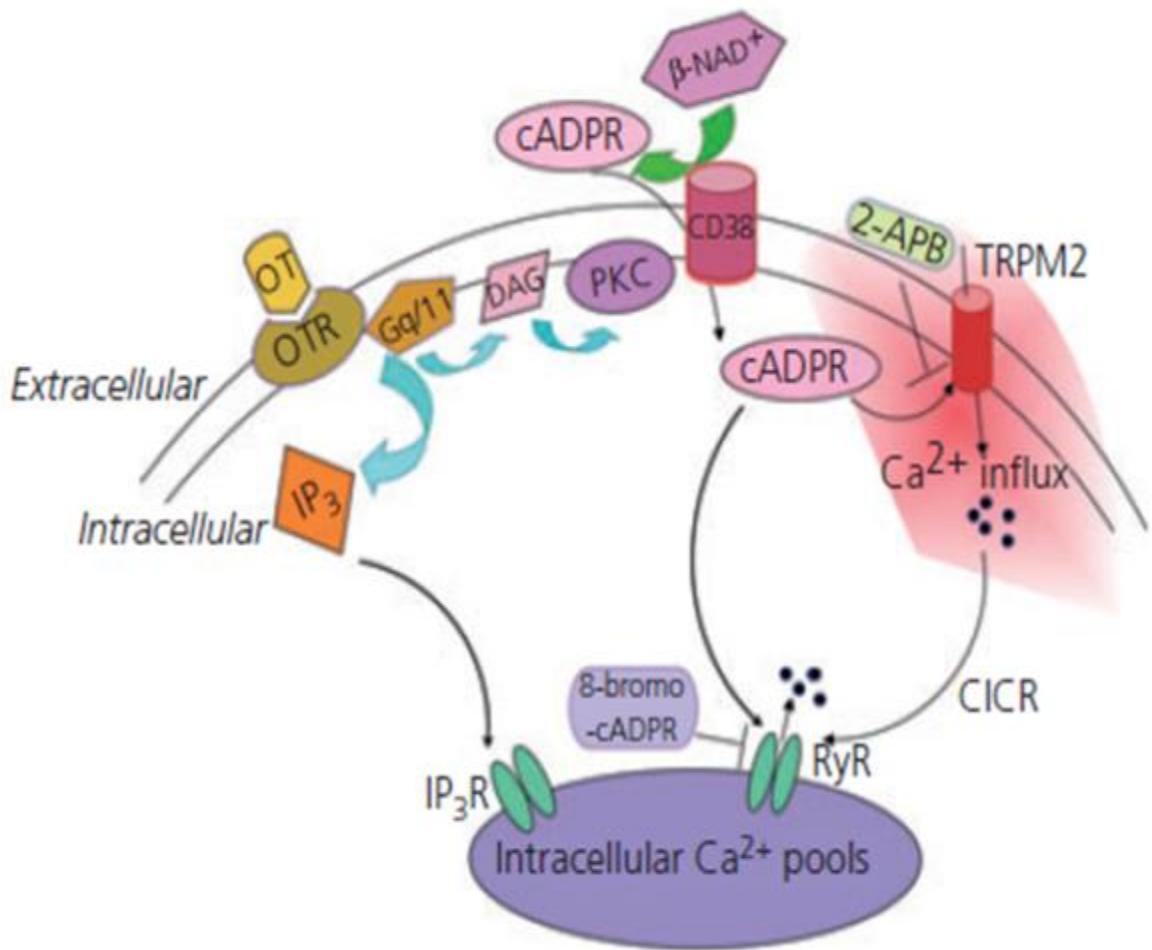


Рисунок 75 Схематическая модель цАДФ-рибоза- и термо- зависимого возрастания $[Ca^{2+}]_i$ в клетках NG108-15. Внеклеточная аппликация цАДФ-рибозы (cADPR), с последующим преобразованием АДФ-рибозилциклизной активностью CD38, транспортируется в клетку, и активирует рецепторы к рианодину (RyR). Вследствие этого происходит связывание цАДФ-рибозы TRPM2 каналами и инициирует возрастание $[Ca^{2+}]_i$. Молекулярные события, ассоциированные с термочувствительностью, заретушированы красным цветом. OT, окситоцин; OTR, receptor к окситоцину; DAG, диацилглициерин; IP₃, инозитолтрифосфат; IP₃R, receptor к инозитолтрифосфату; PKC, протеинкиназа С; CICR, Ca^{2+} -индуцированное высвобождение кальция.

Проведенные эксперименты показывают, что окситоцин может вызвать цАДФ-рибоза-опосредованное увеличение $[Ca^{2+}]_i$, двумя способами: (i) высвобождение Ca^{2+} через связывание с рианодиновыми рецепторами RyR (протеинкиназа С – зависимый механизм) и (ii) высвобождение Ca^{2+} через каналы TRPM2 (рисунок 75). Открытым остается вопрос, в какой степени TRPM2-каналы могут способствовать увеличению $[Ca^{2+}]_i$ в гипоталамических нейронах или нейрогипофизарных нервных окончаниях, приводящих к эффективному высвобождению окситоцина.

4.2 Концентрация OXT в CSF и стресс

Концентрации OXT в CSF увеличивались в течение 5 мин от начала психологического стресса (беспокойство в новой среде) в тесте «Открытое поле». Интересно, что ректальная температура также увеличивалась одновременно в течение 5 минут с момента начала стресса, поэтому увеличение концентрации OXT в CSF, по-видимому, было вызвано высвобождением OXT из гипоталамуса в мозг, опосредованное гипертермией и цАДФ-рибозой. Тем не менее, кинетика изменения концентрации OXT и ректальной температуры была совершенно разной. Временное увеличение концентрации OXT в CSF, по-видимому, отражает переходный характер увеличения концентрации OXT в среде инкубации, вызванной только температурным сдвигом. Термостимуляция в присутствии цАДФ-рибозы индуцировала начальное кратковременное увеличение $[Ca^{2+}]_i$. Переходное высвобождение OXT в течение 5 мин в открытом поле, вероятно, связано с взаимодействием между каналами TRPM2 и цАДФ-рибозой и/или АДФ-рибозой.

Ранее сообщалось, что изменения в эмоциональном поведении (локомоции) в открытом поле очевидны уже в течение 5-минутного периода наблюдения, прежде чем активность снижается до более низкого уровня [72, 193]. Эти результаты показывают, что стресс в открытом поле эффективно контролирует эмоциональность в течение 5 минут, и что животные постепенно адаптируются к

новому стрессу окружающей среды. По нашим наблюдениям, увеличение высвобождения ОХТ происходит через 5 минут после воздействия открытого поля. Таким образом, разумно предположить, что анксиолитический эффект инициируется или, по крайней мере, связан с этим высвобождением ОХТ.

Мы использовали *Cd38*^{-/-} мышей или ингибиторы цАДФ-рибозы и TRPM2 у *Cd38*^{+/+} мышей, но каждый ингибитор или дефект не различал функциональные роли сADPR или TRPM2. Конечно, следует учитывать концентрации ингибиторов, но, возможно, что эти сигналы могут иметь последовательные каскады, а не быть опосредованными независимым путем (**рисунок 75, 76**).

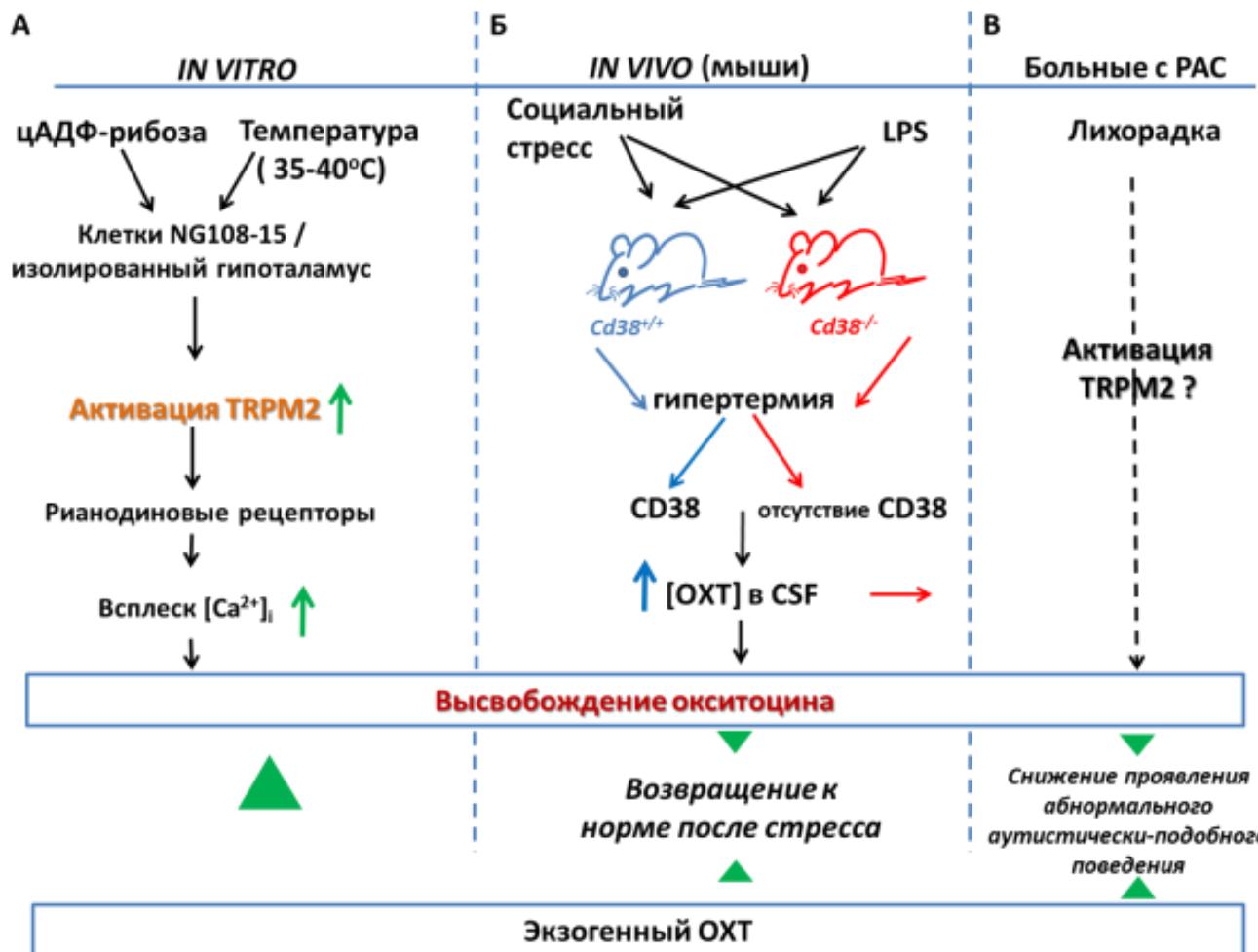


Рисунок 76 Обобщающая схема восстановления после стресса и снижения выраженности проявлений аутистического фенотипа за счет высвобождения ОХТ. (А) Внутриклеточные концентрации кальция увеличиваются одновременной стимуляцией цАДФ-рибозой и температурой *in vitro*. (Б) Разница в выбросе ОХТ у мышей дикого типа и дефицитных по гену *Cd38*, стимулированных социальным стрессом или LPS. (В) Гипертермия у человека временно способствует снижению проявления аутистически-подобного поведения.

4.3 Социальные нарушения, гипертермия и аутизм

На сегодняшний день было проведено несколько интересных исследований лихорадки у пациентов с РАС. Некоторые дети с РАС демонстрировали улучшение характерного аутистического поведения во время фебрильных инцидентов, и регрессия лихорадки может быть связана с началом РАС [88, 259, 281]. Было предложено несколько возможных объяснений этого мелиоративного эффекта: (1) высвобождение глутамина из скелетных мышц [138], 2013); (2) улучшение мозгового кровотока [137]; (3) развитие лихорадки и изменения поведенческого состояния при аутизме зависят от селективной нормализации ключевых компонентов в функционировании поврежденного локуса [260]. Однако обмен ОХТ никогда не рассматривался в качестве основного механизма. В этом исследовании мы предполагаем, что во время лихорадки усиливается высвобождение ОХТ, что приводит к снижению проявления аномального аутистического поведения (**рисунок 77**), поскольку прямое введение ОХТ улучшает аберрантное поведение у грызунов и людей [193, 273, 274, 362, 385, 404].

Было установлено, что ОХТ играет важную роль в социальном распознавании и социальной памяти [76, 108, 110, 167, 295, 322, 403]. Делеция связанных с ОХТ генов, таких как сам ген *OXT* [122], ген *OXT-рецепторы* [365] и ген *Cd38* [169, 193], приводит к социальным нарушениям у мышей [147, 264] и человека [262]. Накопленные данные свидетельствуют о том, что одиночные нуклеотидные полиморфизмы в генах ОХТ рецепторов, ОХТ и CD38 ассоциированы с аутизмом или высокофункциональным аутизмом, или они являются по меньшей мере фактором риска [112, 118, 119, 411]. Наши результаты показывают, что канал *TRPM2* или однонуклеотидные полиморфизмы в гене *TRPM2* могут быть новым молекулами-мишениями, и этот ген должен быть экранирован для оценки его связи с аутизмом.

Гипертермия, вероятно, также ассоциирована с социальным стрессом, как описано ранее [42, 64, 204, 227, 296, 347]. Процедура социального стресса оказывает гораздо более стрессовое воздействие на подчиненные группы в социальной иерархии [20, 21, 382] (**рисунок 78**). Результаты настоящего исследования показали, что большее количество ОХТ высвобождается, когда испытывается большее напряжение, и в подчиненной группе высвобождение большего количества ОХТ, по-видимому, позволяет восстановить напряжение и достичь равновесия (**рисунок 78**) [22, 31]. В то же время, например, не было обнаружено различий в экспрессии вазопрессина при формировании депрессивного поведения у активных и пассивных крыс [23]. Некоторые генотипы по окситоцину могут считаться «уязвимыми» в негативной окружающей среде [77]. Эти генотипы могут также быть более чувствительными к воздействию положительной среды. Данные согласуются с теорией биологической чувствительности [65] и теорией пластиности [57]. Наконец, канал TRPM2 может быть новой мишенью для модуляции социального стресса и психических расстройств с нарушениями в социальном поведении (**рисунок 62**).

4.4 Тревожное и депрессивное поведение у взрослых мышей с делецией гена CD157/BST1 (фактор риска болезни Паркинсона)

Наши результаты показывают, что молодые взрослые (8 до 10 недель) самцы мужского пола с делецией *Cd157 (BST1)* демонстрируют устойчивый и хорошо воспроизводимый эмоциональный фенотип: *Cd157^{-/-}* мыши проявляют тяжелое беспокойство, связанное с поведением в новой окружающей среде; также проявляют беспокойство по отношению к новым несоциальным и/или социальным объектам. Сниженный интерес к общению с новыми социальными объектами и социальное избегание также являются значительными характеристиками фенотипа. Кроме того, *Cd157^{-/-}* мыши проявляют депрессивно-подобное поведение.

Все эти нарушения социального поведения во множественных парадигмах указывают на нейропсихические особенности у *Cd157^{-/-}* мышей. Таким образом, данная линия мышей может быть хорошим инструментом (моделью) для изучения психических расстройств, в том числе, характерных и для человека [87].

Тревожность, выявленная стандартными тестами у *Cd157^{-/-}* мышей, была полностью нивелирована диазепамом, типичным антитревожным препаратом, и недавно разработанным антидепрессантом, миртазапином. Депрессивно-подобное поведение, обнаруженное с помощью парадигмы подвешивания за хвост, также купировалось диазепамом. В то же время, коррекция миртазапином была более эффективна у *Cd157^{-/-}* мышей, чем у контрольной группы. Те же фенотипические недостатки, которые наблюдались в teste «Принудительное плавание», не поддавались коррекции диазепамом, но были эффективно нивелированы миртазапином. Склонность к вскарабкиванию на стенку бассейна у *Cd157^{-/-}* мышей может также представлять собой сенсорный дефицит, купированный с помощью обоих лекарственных средств, и коррелирующий с измененным состоянием страха. Такая эффективность фармакологического вмешательства предполагает устойчивое нарушение сигнал-шум в эмоциональных ответах и обеспечивает легко воспроизводимую базовую линию для терапевтического ответа у *Cd157^{-/-}* мышей.

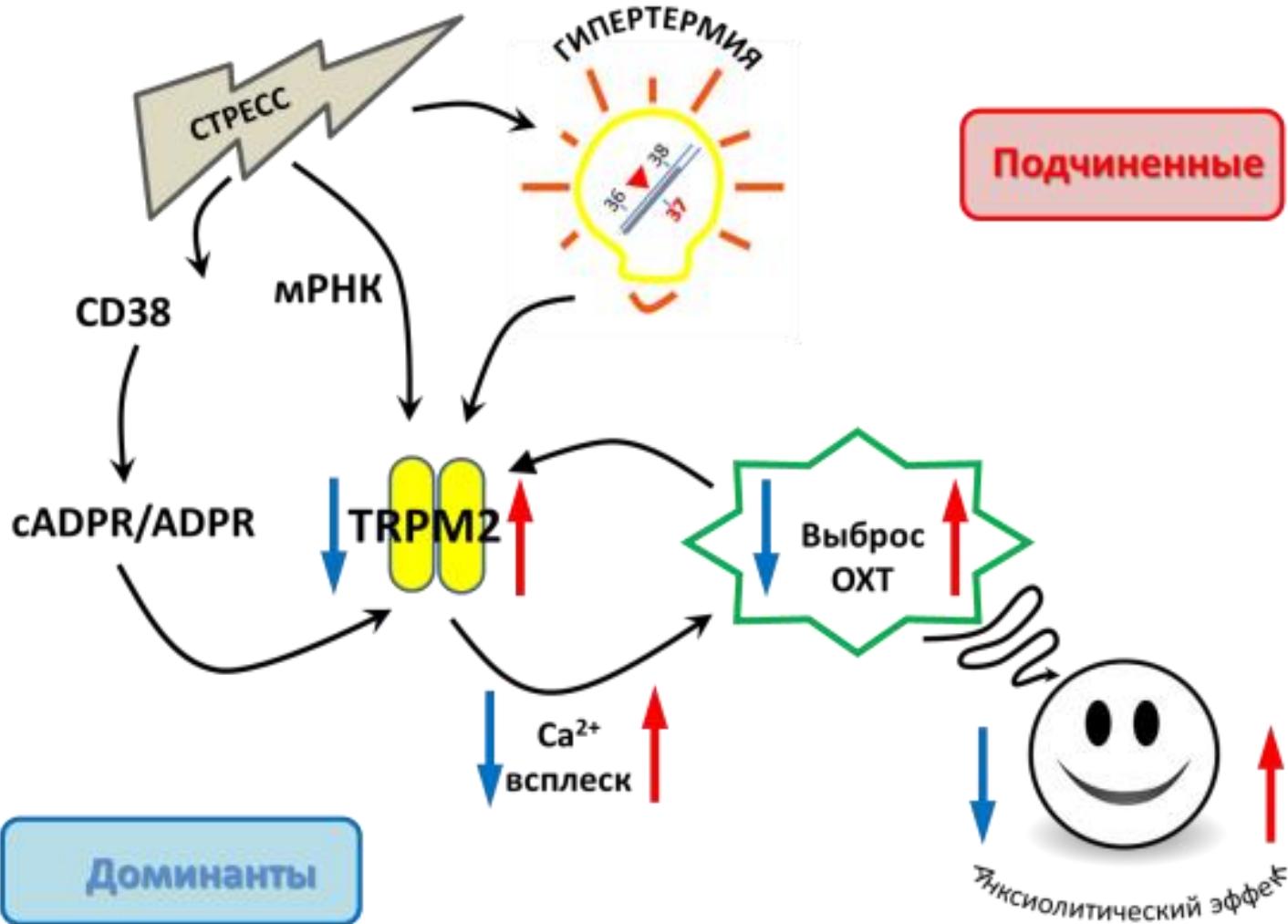


Рисунок 77 Схема, показывающая изменение продукции ОХТ в ответ на стресс. Социальный стресс вызывает изменения уровня экспрессии мРНК TRPM2, гипертермии и притока Ca^{2+} и последующего высвобождения окситоцина. Окончательный полученный анксиолитический эффект больше в подчиненных группах мышей (красные стрелки) по сравнению с доминантной группой (синие стрелки).

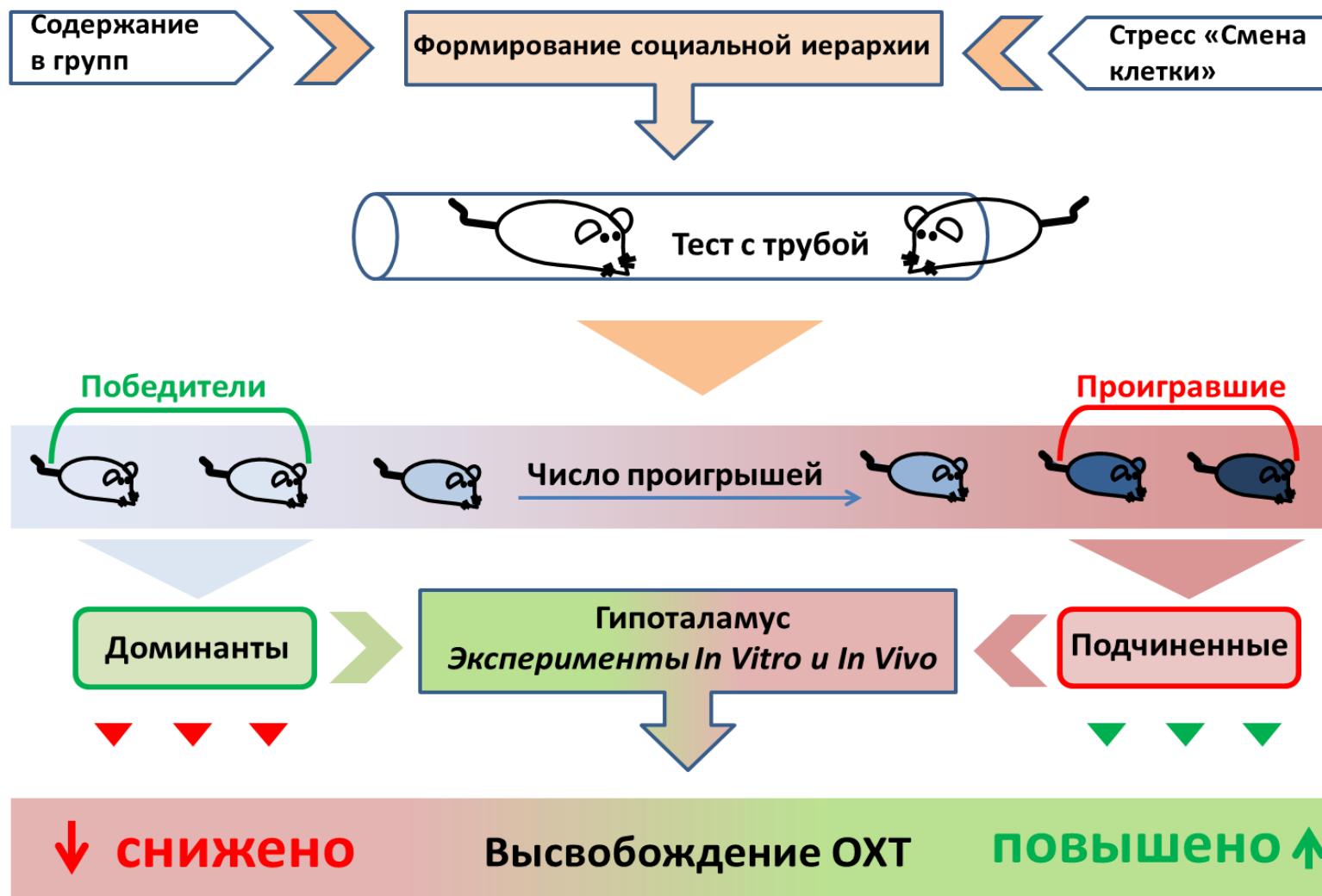


Рисунок 78 Схематический чертеж высвобождения окситоцина (ОХТ) гипоталамусами, изолированными из мозга групп доминантных и подчиненных мышей. Схема показывает, что ОХТ меньше высвобождается у доминантных мышей и больше - у подчиненных, что помогает адаптировать к стрессу и вернуться к состоянию нормы.

Несмотря на то, что данные демонстрируют небольшие различия в чувствительности к препаратам у обоих фенотипов, так как мы использовали один способ применения и дозу препаратов, слишком рано определять подробные фармакологические особенности эмоционального фенотипа у нокаутных мышей. Генетические терапевтические манипуляции у *Cd157^{-/-}* мышей не были представлены здесь и не являлись целью данной работы по причине трудностей в заражении и экспрессии молекулы, связанной с гликозилфосфатидилинозолом. Однако, генетические манипуляции с реэкспрессией *Cd157* в мозге мышей с использованием технологии лентивирусной инфекции [44, 193] были бы убедительным дополнением.

Мы не обнаружили какой-либо видимого физического дефицита у молодых взрослых *Cd157^{-/-}* мышей. Отсутствовали нарушения в движении, координации, в процессах обучения и формирования моторной памяти. Напротив, *Cd157^{-/-}* мыши демонстрировали меньшую добровольную активность в повседневной жизни с 24-часовым мониторингом в течение 7 дней в их домашней клетке по сравнению с мышами дикого типа. Это несоответствие в принудительной и добровольной локомоторной активности может быть характерным поведенческим параметром, выявляющим сильный эмоциональный дисбаланс у нокаутных мышей. Несмотря на то, что при записи активности в домашней клетке невозможно точно оценить работу мышц мышей, но однозначно, что мыши проводили время в одном месте в течение длительного времени, вероятно, из-за состояния апатии, вызванного депрессивными особенностями фенотипа у *Cd157^{-/-}* мышей. Поэтому, более и другие модели для индивидуального мониторинга поведения должны быть использованы дополнительно. С другой стороны, интересно, что дневной и ночной цикл у *Cd157^{-/-}* мышей был таким же, как у контрольной группы, что указывает на то, что у *Cd157^{-/-}* мышей циркадные ритмы не нарушены.

Интересно, что в нескольких геномных ассоциациях и мета-анализах болезни Паркинсона были идентифицированы инtronные однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) в гене CD157 (также известного как BST1) на хромосоме 4p15 человека как новые локусы восприимчивости [186, 236, 294], хотя можно

утверждать, что общие SNP CD157 обеспечивают небольшой риск. Таким образом, могут потребоваться дополнительные генетические манипуляции и факторы окружающей среды для определения патогенной роли генетической модификации или делеции гена *CD157* [84].

Нейропсихические состояния при болезни Паркинсона не изучались интенсивно на соответствующих моделях у животных [73, 90], хотя тревога наблюдалась у обычных крыс и мышей, страдающих от нейротоксикации [67, 73, 90, 316]. Представляет интерес проверить, могут ли эти поведенческие нарушения у *Cd157*^{-/-} мышей быть ассоциированы с функционированием миндалины [155, 361]. Однако, нет прямых доказательств того, что CD157 играет роль в миграции нейронов во время нейрогенеза, хотя CD157 связывает интегрины в моноцитах человека [240] и играет роль в миграции нейтрофилов [312]. Наши предварительные результаты показали, что CD157 экспрессируется в Nestin-позитивных нервных стволовых клетках вблизи зоны желудочка головного мозга. Таким образом, вполне вероятно, что дефицит CD157 может привести к аномалиям в миндалине.

Интересно, что оба гена *Cd157*, *Cd38* участвуют в образовании незрелых нейронов, и участвуют в пролиферации нейрональных клеток. При этом CD157 не влияет на количество незрелых нейронов, тогда как CD38 оказывает противоположное влияние. Вместе с тем, отсутствие и CD157, и CD38 негативно сказывается на процессах синаптогенеза. А развитие нейродегенерации сопровождается увеличением экспрессии CD38 и CD157 в клетках микроглии, что возможно ассоциировано с их активацией. Увеличение экспрессии CD38 в подтипе зрелых астроцитов, которые существуют с кровеносными сосудами, может быть связано со стимуляцией притока Ca^{2+} , астроцитозом и снижением ингибирования сборки микротрубочек [157].

Недавно было оценено, что аномалии в дополнительных нейронных областях, а не в нигростриальной области, потенциально могут участвовать в прогрессировании болезни Паркинсона, и могут способствовать появлению предмоторных симптомов, таких как тревожность, депрессия, ухудшение памяти,

нарушения обоняния, сна и желудочно-кишечные расстройства [351, 355, 363, 386]. Тревога и депрессия являются самыми ранними проявлениями болезни Паркинсона, а у пациентов с высокой тревожностью повышен риск развития БП [109, 319, 337]. Основные биологические механизмы, которые приводят к этим симптомам на любой стадии заболевания, включая предмоторную фазу, неизвестны [311, 355]. Поэтому разумно, что наши текущие эксперименты были разработаны для изучения связанных с эмоциями поведенческих эффектов во временном окне от 8 до 10 недель. Необходима дальнейшая работа по выявлению взаимосвязи эмоциональных состояний у *Cd157^{+/−}* мышей и аспектами эмоционального статуса человека при болезни Паркинсона.

В настоящее время мы не можем объяснить расхождение между уровнями ОХТ в плазме крови и гипоталамусе. Так как большинство ОХТ нейронов выделяет ОХТ в кровь, мы предполагаем, что высвобождение ОХТ из терминалов аксонов в гипофизе может быть ослаблено у *Cd157* нокаутных мышей без видимых изменений содержания ОХТ в ядрах гипоталамуса, которые обогащены ОХТ. Окситоцинергические нейроны одновременно функционируют и в заднем отделе гипофиза, и в др. отделах мозга (за счет проекций ОХТ нейронов), например, в миндалине, которая участвует в процессах реакции на страх [205, 206]. Таким образом, CD157 может прямо или косвенно влиять на центральное аксональное высвобождение ОХТ. Наблюдаемое изменение системы ОХТ (концентрации в плазме) и компенсаторное воздействие ОХТ на поведение обеспечивают клинически и терапевтически релевантные выводы.

Альтернативный сценарий, лежащий в основе вклада ОХТ в развитие нокаутных мышей CD157, заключается в нарушении передачи сигналов ОХТ в головном мозге. Чтобы исследовать эту проблему, необходимы данные относительно экспрессии рецепторов к ОХТ в соответствующих областях головного мозга. В предварительном эксперименте мы измеряли уровни мРНК рецептора к ОХТ в миндалине ($n = 5$). К сожалению, нам не удалось обнаружить каких-либо различий в уровне мРНК рецепторов к ОХТ в обоих генотипах. Необходимы дальнейшие подробные анализы для определения уровней мРНК и

белка молекул, связанных с ОХТ-сигнальной трансдукцией в каждой подобласти миндалевидного тела.

Существуют разногласия относительно того, может ли периферически введенный ОХТ эффективно проникать через гематоэнцефалический барьер [86, 246]. Поэтому точный механизм действия ОХТ в настоящем исследовании остается неясным. Однако многочисленные исследования на грызунах и у человека показали убедительные просоциальные эффекты ОХТ, применяемого периферически, включая интраназальное введение [287, 357, 384].

Таким образом, становится очевидным, что CD157 играет важную роль в ткани головного мозга в норме и при патологии. Вместе с предыдущими сообщениями (Ishihara and Hirano, 2000; Yilmaz et al., 2012; Quarona et al., 2013), эти наблюдения указывают на то, что CD157 имеет множество функций в различных тканях, в частности, в иммунной системе, в эндокринной системе, в клоногенных нишах. Настоящие данные о роли этого белка в ЦНС подтверждают предположение о том, что CD157 можно определить как мультисистемный регулятор, что важно при рассмотрении биологического значения продуктов его катализической активности, включая циклическую АДФ-рибозу. Отсутствие различий в активности ADP-рибозилцилазы в двух различных областях головного мозга, наблюдаемые у взрослых особей, может быть результатом взаимной суррогатной роли, которую играют другие члены одной и той же семьи. Поэтому дальнейшие эксперименты с использованием мышей дефицитных одновременно по *Cd38/Cd157* необходимы для решения ряда оставшихся открытыми вопросов.

4.5 Нарушение ультразвуковой коммуникации в период грудного вскармливания у *Cd157* нокаутных мышей: временная коррекция окситоцином

В настоящем исследовании мы показали, что делеция гена *Cd157* у мышей вызывает отклонение в развитии продуцирования ультразвуковой вокализации в период лактации.

Хорошо известно, что мыши – социальные животные, продуцирующие USV в различных контекстуальных условиях на протяжении всей жизни [335]. Детеныши мышей, удаленные из гнезда и изолированные от матери, вокализируют с коммуникативной направленностью, что коррелирует с социальными контактами и исследовательским поведением грызунов [89, 334]. С момента первого описания Zippelius and Schleidt [423], неонатальные USV интерпретируются как коммуникативное поведение [154, 335, 342, 399]. Неонатальные USV могут быть проводником в понимании отдаленных взрослых профилей тревожности [101, 335]. Однако, снижение вокализации после PND 3, которую мы наблюдали у *Cd157*^{-/-} мышей, может быть рассмотрена как отсроченное нарушение коммуникативных навыков [9, 16, 17]. Это может быть частично ассоциировано с ранее отмеченным аутистически- (тревожно- и беспокойно-) подобным поведением у *Cd157*^{-/-} мышей.

Структура и организация языка активно изучается у пациентов с РАС. Прагматика – наиболее «социально мотивированный» и последовательно обесцененный домен при РАС, потому что он требуют понимания языка и его правильной интерпретации в ходе социальных взаимодействий [114]. Язык обучения привязан к механическим и двигательным функциям, поскольку существует связь между моторикой и речевой функцией. Атипичные моторные движения наблюдались при различных фенотипах РАС [51]. Бедный словарный запас [113] и активное его использование у пациентов с РАС кажется ассоциированным со сниженной мотивацией к общению [49]. Регистрация USV,

продуцируемых детенышами мышей при социальной изоляции, можно выделить как индекс социальной мотивации детенышей для стимулирования родительской заботы и как маркер полученных ранних дефицитов коммуникации в моделях РАС у мышей в ожидании других, отдаленных, изменений [153, 173, 271, 325, 327]. Подобные научные исследования демонстрируют потенциальный положительный эффект введения ОХТ в плане повышения мотивации для целенаправленного поведения [283] и содействие фундаментальным психофизиологическим функциям при реализации социального поведения, что в свою очередь, способствует социальной активности [199]. Введение экзогенного ОХТ может улучшать функционирование головного мозга у детей с РАС [141]. С учетом всех полученных нами данных и ранее опубликованных научных исследованиях, мы предполагаем, что введение ОХТ активирует потенциальную гибкость функций нейронов, которая не напрямую стимулирует косвенную мотивацию и, возможно, способствует развитию лексики и увеличению словарного запаса.

Система нейротрансмитеров, регулирующая ультразвуковую вокализацию у мышей, была ранее проанализирована [67]. Мы нашли, что обнаруженная коммуникативная способность *Cd157^{-/-}* мышей в PND 3 соответствует повышенным уровнем ОХТ в плазме крови и активности АДФ-рибозилцилазы в гипоталамусе, но последующая потеря коммуникативных навыков была ассоциирована со снижением активности АДФ-рибозилцилазы и уровнем ОХТ в плазме крови. На седьмой день постнатального развития введение ОХТ восстанавливает коммуникативную способность и уровень ОХТ в плазме крови у *CD157^{-/-}* мышей, но подобного эффекта не наблюдается у контрольной группы. Экзогенное введение ОХТ изолированным детенышам крыс снижало их вокализацию [185]; однако, введение антагониста ОХТ не влияло на спектр USV [185]. Мыши дефицитны по ОХТ демонстрировали сниженную ультразвуковую вокализацию по сравнению с контрольной группой [393]. Эти противоречивые находки (экзогенный ОХТ может так же снижать способность к вокализации) могут быть интерпретированы как очевидность того факта, что краткосрочная

социальная изоляция не всегда является критичным стрессом и не провоцирует вокализации в отсутствие OXT [335, 393, 394]. Мыши, дефицитные по рецепторам к OXT, вокализируют меньше на седьмой день постнатального развития [365], что подтверждает гипотезу о том, что трансмиссия OXT необходима для продуцирования USV в ответ на социальную изоляцию. На 7 день постнатального развития у *Cd157^{-/-}* мышей меняется активность АДФ-рибозилциклизы, опосредующей высвобождение OXT, что сказывается на продуцировании USV. Интересно, что этот эффект может быть блокирован введением экзогенного окситоцина. Следует отметить, что мыши, дефицитные по *Cd38*, имеют изменённую вокализацию (по сравнению с мышами дикого типа) на 7 день постнатального периода, ассоциированную с низким уровнем активности АДФ-рибозилциклизы в гипоталамусе и гипофизе.

Суммируя все вышесказанное, это первое исследование, демонстрирующие связь CD157 с ранним постнатальным развитием и коммуникативными способностями (которые могут быть восстановлены с помощью введения экзогенного OXT). Ген *CD157* может быть геном-кандидатом и риск-фактором развития состояний тревожности и социального избегания (социальной боязни). Наши данные могут внести большой вклад в изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе нарушений социальных взаимодействий, в особенности, коммуникативных дефицитов при РАС.

4.6 CD157/BST-1 - нейрорегулятор

CD157 и CD38 имеют подобную последовательность аминокислот в своей структуре и обладают похожими ферментными функциями, и оба вовлечены в метаболизм НАД⁺. А также ген человека *CD157* имеет сходную уникальную организацию с геном человека *CD38* [302]. Более того, CD38 и CD157 принадлежат к одному семейству NAD⁺-гликогидролаз, что позволяет нам

предполагать, что CD157 может быть вовлечен в механизм высвобождения окситоцина подобно CD38 (**рисунок 79**).

CD157 и CD38 и ассоциированная с их активностью молекулярная сигнализация может быть подобна при состояниях тревоги, аутизме, ранней атипичной моторной функции, нарушениях речи, социальной боязни и т.д. Хотя и есть некоторые различия в поведении мышей, дефицитных по гену *Cd38* и *Cd157* (в частности, фона, на котором сделаны эти мыши), очевидна роль CD157 в секреции OXT и регуляции социального поведения, и требует дальнейших научных исследований. Одним из рекомендуемых - создание линии мышей, дефицитных одновременно по двум генам *Cd38/Cd157*, чтобы нивелировать компенсирующую роль *Cd157* у *Cd38^{-/-}* мышей.

Наиболее важным результатом настоящего исследования было обнаружение того, что функция CD157 опосредована только вторичным мессенджером цАДФ-рибозой, а не NAADP. Это первая демонстрация дифференциального действия CD157 в отношении вторичных мессенджеров, мобилизующих флуктуации внутриклеточного $[Ca^{2+}]_i$. Известно, что CD38 обладает устойчивой способностью катализировать образование цАДФ-рибозы, а также образование NAADP во многих тканях организма, включая островки Лангерганса [167, 193, 202, 226, 239, 298]. NAADP, как мессенджер сигнализации Ca^{2+} , играет важную роль в секреции инсулина [202]. Однако это поднимает критический вопрос о CD157, опосредующем его функции в нервной системе и стволовых клетках через цАДФ-рибозу, но не в формировании NAADP. Хорошим примером является решающая роль как цАДФ-рибозы, так и CD157 в кишечных клетках Панета [180, 405].

Второе важное открытие состоит в том, что иммунореактивность CD157 локализована с Nestin-позитивными клетками и элементами, вероятно, нейропрогениторными или нейролиновыми клетками, в субвентрикулярной зоне эмбрионов. Наши результаты показали, что CD157 является функциональной молекулой или, по крайней мере, присутствует в стволовых клетках, как показано в клетках Панета в пищеварительном тракте [180, 405], клетках легких [401] и

мезенхимальных клетках [367]. Функциональная роль в этих стволовых клетках могут быть обусловлена цАДФ-рибозой.

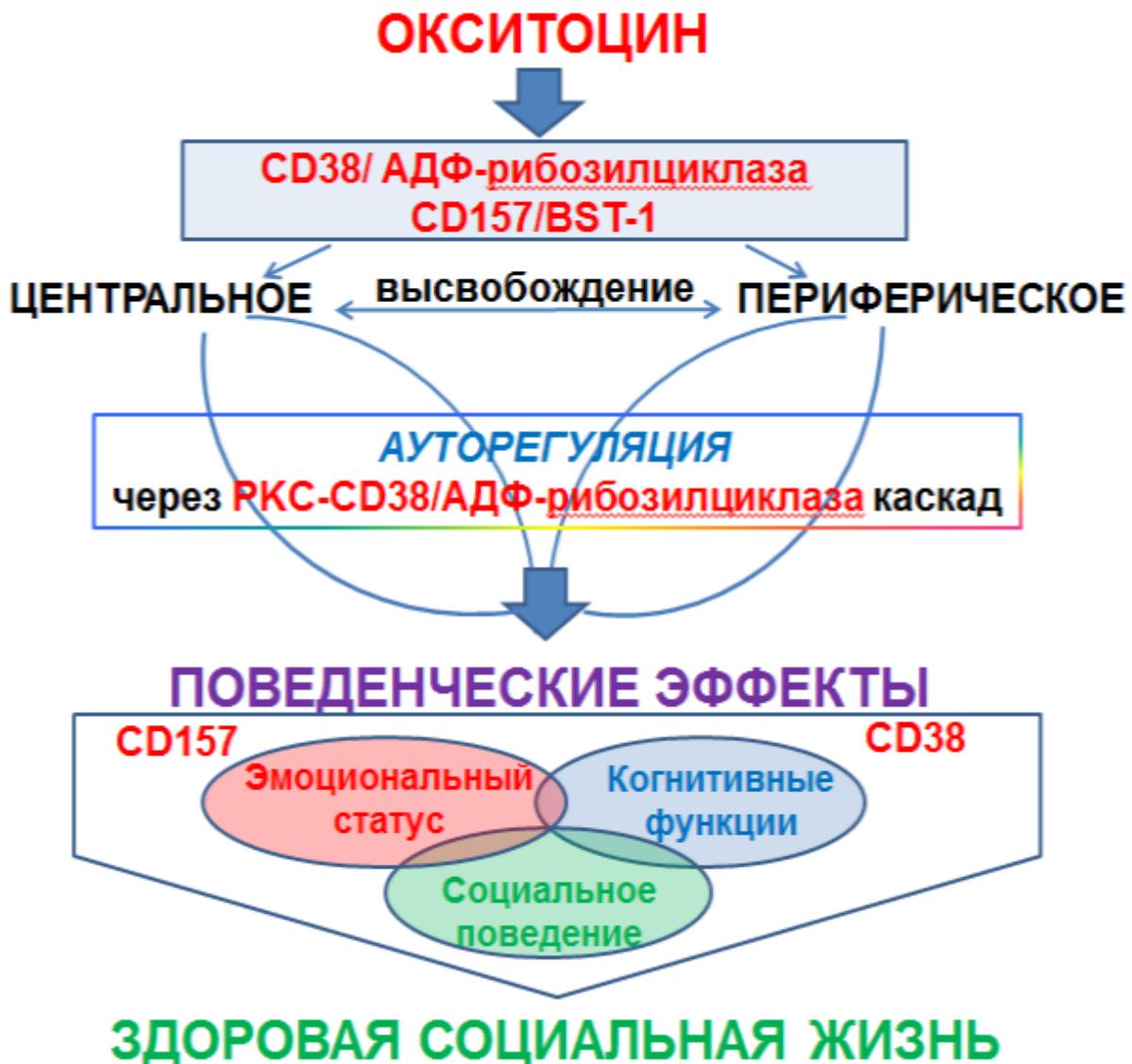


Рисунок 79 Обобщенная схема вовлеченности CD157 и CD38 в молекулярные каскады высвобождения ОХТ и реализации социального поведения.

Однако в нервной системе CD157 может также играть роль в миграции нейронов при нейрогенезе. Было показано, что CD157 связывается с белками семейства интегринов [340]. Кроме того, интегрин $\beta 3$ и переносчик серотонина взаимодействуют для модуляции поглощения серотонина в мозге мыши [390].

Поэтому было бы интересно изучить, способствует ли цАДФ-рибоза самообновлению нервных стволовых клеток, и определяется ли третичный комплекс «CD157-интегрин - транспортер серотонина» в мозге мыши.

CD157 является родственной молекулой клеточного поверхностного антигена CD38 с активностью ADP-рибозилциклизы [202, 226, 251], но фенотипы мышей линий *Cd157*^{-/-} и *Cd38*^{+/+} значительно отличаются [161, 167, 169, 193, 244]. CD38 опосредует продукцию цАДФ-рибозы, активацию TRMP2 и ERK1/2, мобилизацию внутриклеточного кальция и высвобождение OXT [367] (**рисунок 80**). Кроме того, CD38 участвует в высвобождении OXT путем активации молекулярных каскадов ауторегуляции OXT [193]. Напротив, CD157 связывается с транспортером серотонина и интегрином β и вызывает множественные эффекты, чтобы управлять поведением, вызывающим тревогу и депрессию [302, 312]. CD157 играет роль в индуцированном цАДФ-рибозой высвобождении OXT, который может не совпадать с CD38 (**рисунок 80**). Дефицит CD157 приводит к дефициту поведенческих функций и повышенной тревожности.. Уменьшение объема миндалины, важной составляющей «социального мозга», может быть вызвано потерей CD157 в нейрональных стволовых клетках на стадиях развития.

Поведенческие нарушения у *Cd157*^{-/-} мышей были купированы экзогенным OXT, вероятно, потому, что OXT непосредственно участвует во внутриклеточных сигнальных каскадах социального мозга по пути CD157, который может быть независим от CD38 и его сигнальных процессов (**рисунок 80**). Это наблюдение позволяет предположить, что OXT возможно будет использовать для лечения социального избегания при психологических расстройствах. Более того, мы можем экстраполировать результаты, полученные на мышах, на поведенческие эффекты у человека, тем более, что были сообщения об эффективности OXT для нарушения социального взаимодействия в случаях расстройства спектра аутистического спектра [208, 274, 385].

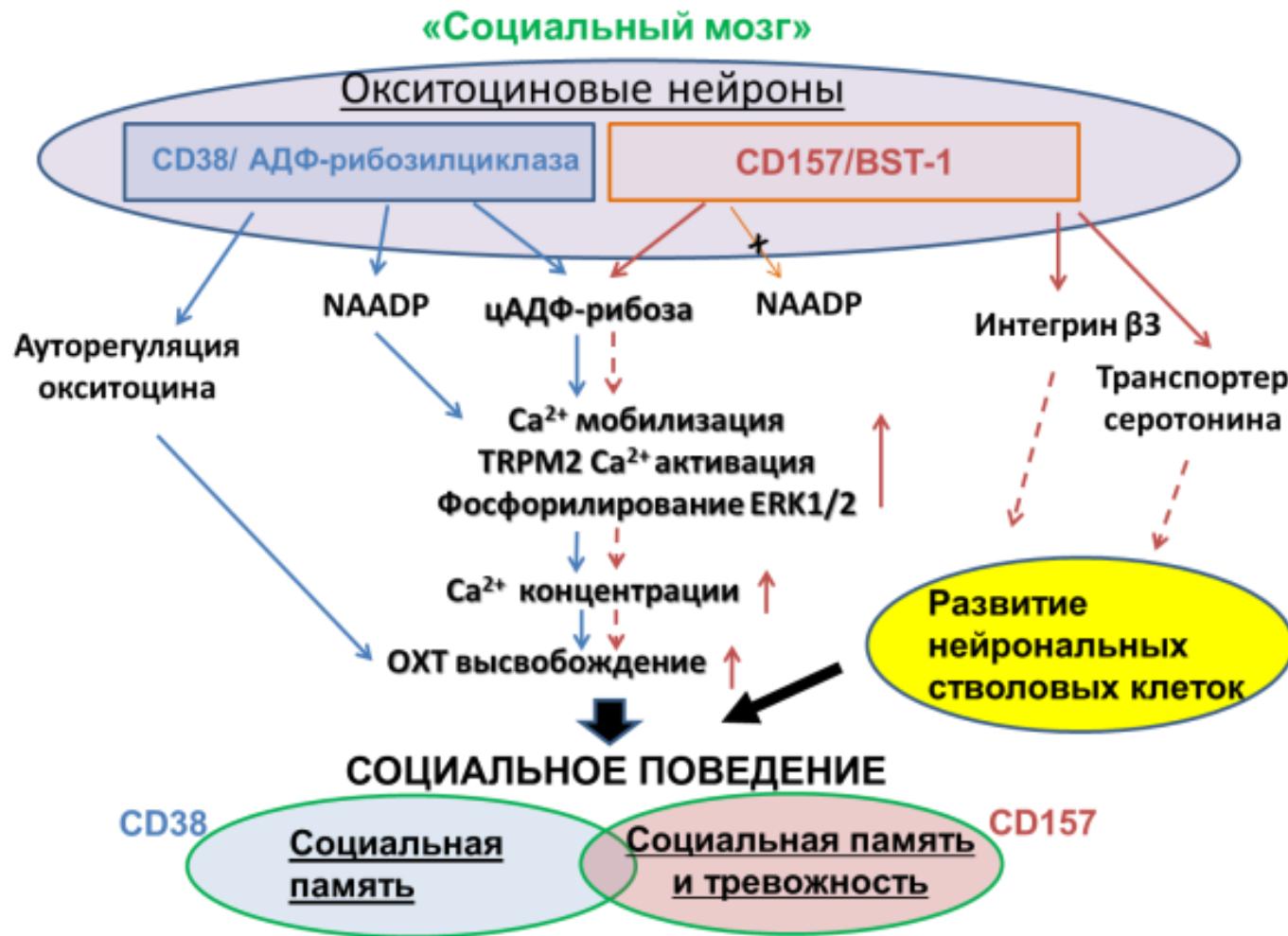


Рисунок 80 Схема CD38- и CD157-опосредованных молекулярных путей в регуляции социального поведения. Схема показывает возможные молекулярные пути образования цАДФ-рибозы, высвобождение ОХТ и поведенческие эффекты, связанные с CD38 и CD157 в ОХТ нейронах в «социальном мозге».

Было показано, что SNPs CD38 связаны с развитием РАС [81, 118, 119, 175, 229, 321] [57-62]. Поскольку CD157 изобилует на этапах эмбрионального развития, понятно предположение относительно ассоциации между SNPs CD157 и РАС. Недавно было обнаружены взаимосвязи между РАС и тремя SNP CD157 (rs4301112, rs28532698 и rs10001565). Эти SNP имеют хромосомные местоположения (от chr4: 15717226 до chr14: 15722573), отличные от тех, которые связаны с болезнью Паркинсона (chr14: 15725766 до chr4: 15737937) [408].

Таким образом, была определена роль CD157 в нервной системе в дополнение к его известным функциям в пищеварительной и иммунной системах. Поэтому CD157 можно называть мультисистемным регулятором. Меньшая экспрессия CD157 во взрослом мозге вызывает вопросы об общих чертах, связанных с поздним началом болезни Паркинсона. Поскольку CD157 экспрессируется в эмбриональном мозге в большом количестве, он может участвовать в процессах развития нейронов, нарушения которых актуальны при ряде нейропсихических расстройств, например, при РАС и шизофрении.

4.7 Эффекты делеции гена *Cd38* на процессы развития в ювенильном периоде у мышей-самцов. Роль экзогенного окситоцина

Результаты настоящего исследования продемонстрировали, что локомоторная активность, вызванная изоляцией от матери на 7 день постнатального периода, была выше, и количество испускаемых ультразвуков было ниже у мышей линии *Cd38*^{-/-}. Тем не менее, эти отклонения в поведении были гораздо мягче, чем те, которые наблюдались у нокаутных мышей по ОХТ и ОХТ рецепторам [365, 393], что свидетельствует о более легкой форме нарушения социального поведения у мышей по сравнению с двумя вышеуказанными нокаутами (**таблица 5**).

Таблица 5 Поведенческие особенности раннего возраста у мышей, дефицитных по гену *Cd38*, *OXT* и *OXT* рецепторам.

	Тип генетического дефицита		
	<i>OXT</i> *	<i>OXT</i> -рецепторы**	<i>CD38</i> ***
Количество испускаемых ультразвуков	-80%	-95%	-38%
Индивидуальная локомоторная активность	-	+500%	+161%

*Winslow et al., 2000; Ferguson et al 2001; **Takayanagi et al., 2005; ***, настоящая работа

Интересно, что уровни ОХТ в плазме крови в процессе развития от рождения до третьей недели постнатального развития у молодых мышей оставались на одном уровне у двух генотипов, хотя активность АДФ-рибозилциклизы была явно ниже у нокаутных мышей от рождения. Резкое падение уровня окситоцина после 21 дня постнатального периода, наблюдаемое только у *Cd38^{-/-}* мышей, по-видимому, указывает на важный критический период и позволяет выделить разные составляющие общего уровня ОХТ в плазме крови в ювенильном и взрослом периодах развития: эндогенный (источник – собственная экспрессия) и экзогенный (источник – молоко матери).

Таким образом, логично предположить, что молоко, поступающее от матери, единственный источник пищи у лактирующих детенышней, и есть источник ОХТ. Мы обнаружили, что ткани молочной железы и молоко самок обоих генотипов одинаково богато окситоцином, и у нокаутных самок не наблюдалось проблем с лактацией. Тогда как для мышей, дефицитных по ОХТ или ОХТ-рецепторам, характерны проблемы с грудным вскармливанием и вынашиванием потомства. Однако, остаётся открытым вопрос, насколько и как данный источник экзогенного ОХТ может поддерживать уровень ОХТ и развитие нокаутных животных на уровне дикого типа, поскольку, считается, что ОХТ не проникает через ГЭБ и до сих пор не выявлены механизмы его транспорта из кровотока в головной мозг.

Поведенческие нарушения, наблюдаемые у нокаутных животных в детском возрасте, ассоциированные с нормальным уровнем ОХТ в плазме, позволяют нам говорить о важности секреция ОХТ в головном мозге и его роли в формировании и развитии социального поведения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования были выявлены новые механизмы регуляции активности НАД⁺-конвертирующего фермента CD38 в клетках нейрональной природы, нейротрансмиттер-регулируемую активность АДФ-рибозилциклиз/CD38 в клетках головного мозга, продемонстрировано участие CD38 в регуляции секреции окситоцина, ауторегуляции окситоцина, развитии аутистических форм поведения у экспериментальных животных.

Продемонстрирована роль гликопротеина CD157 при состояниях тревожности. CD157, принадлежащая к семейству АДФ-рибозилциклиз и обладающая гидролазной активностью по отношению к NAD⁺ и цАФД-рибозе, поддерживает выживание и функцию В-лимфоцитов и гемопоэтических или кишечных стволовых клеток. Хотя CD157/Bst1 является локусом риска при болезни Паркинсона, мало известно о функции CD157 в нервной системе. Было выявлено, что двигательной дисфункции не наблюдалось у нокаутных мышей самцов (*CD157^{-/-}*). *CD157^{-/-}* мыши проявляли тревожное и депрессивно-подобное поведения по сравнению с мышами дикого типа, что компенсировалось введением анти-психиатрических препаратов и окситоцина. Экспрессия CD157 и c-fos была слабо выражена в миндалине у нокаутных животных по сравнению с мышами дикого типа. Таким образом, становится очевидным, что CD157 играет роль нейрорегулятора и является потенциально значимым для проявления симптомов, предшествующих двигательным нарушениям при болезни Паркинсона.

Изучены новые механизмы нейропластичности применительно к реализации сложных форм поведения, обусловленные эффектами центральной секреции окситоцина. Впервые идентифицированы новые механизмы регуляции секреции окситоцина, определяющие характер социальных взаимодействий, а также влияние окситоцина на процессы синаптогенеза и функциональной активности клеток головного мозга в норме и при повреждении головного мозга

на ранних этапах развития организма. Получены принципиально новые данные о влиянии окситоцина на пластичность лимбико-гипоталамо-гипофизарно системы на разных этапах развития головного мозга в норме и при патологии.

Эти данные позволяют идентифицировать новые молекулы-мишени (**рисунок 81**). для фармакологической модуляции процессов секреции окситоцина и коррекции нарушенных форм социального поведения при заболеваниях центральной нервной системы различного генеза. Полученные результаты формируют новое представление о процессах, ответственных за секрецию и биологическую активность окситоцина, в контексте его регуляторного влияния на процессы социального распознавания и социального поведения в целом, в норме и при развитии заболеваний аутистического спектра, а также иных видов патологии головного мозга, ассоциированной с нарушением социальных взаимодействий и эмоциональной сферы (хроническая нейродегенерация). В более широком смысле, сформированы и научно обоснованы принципиально новые подходы к коррекции нарушений социального поведения и пластичности головного мозга.

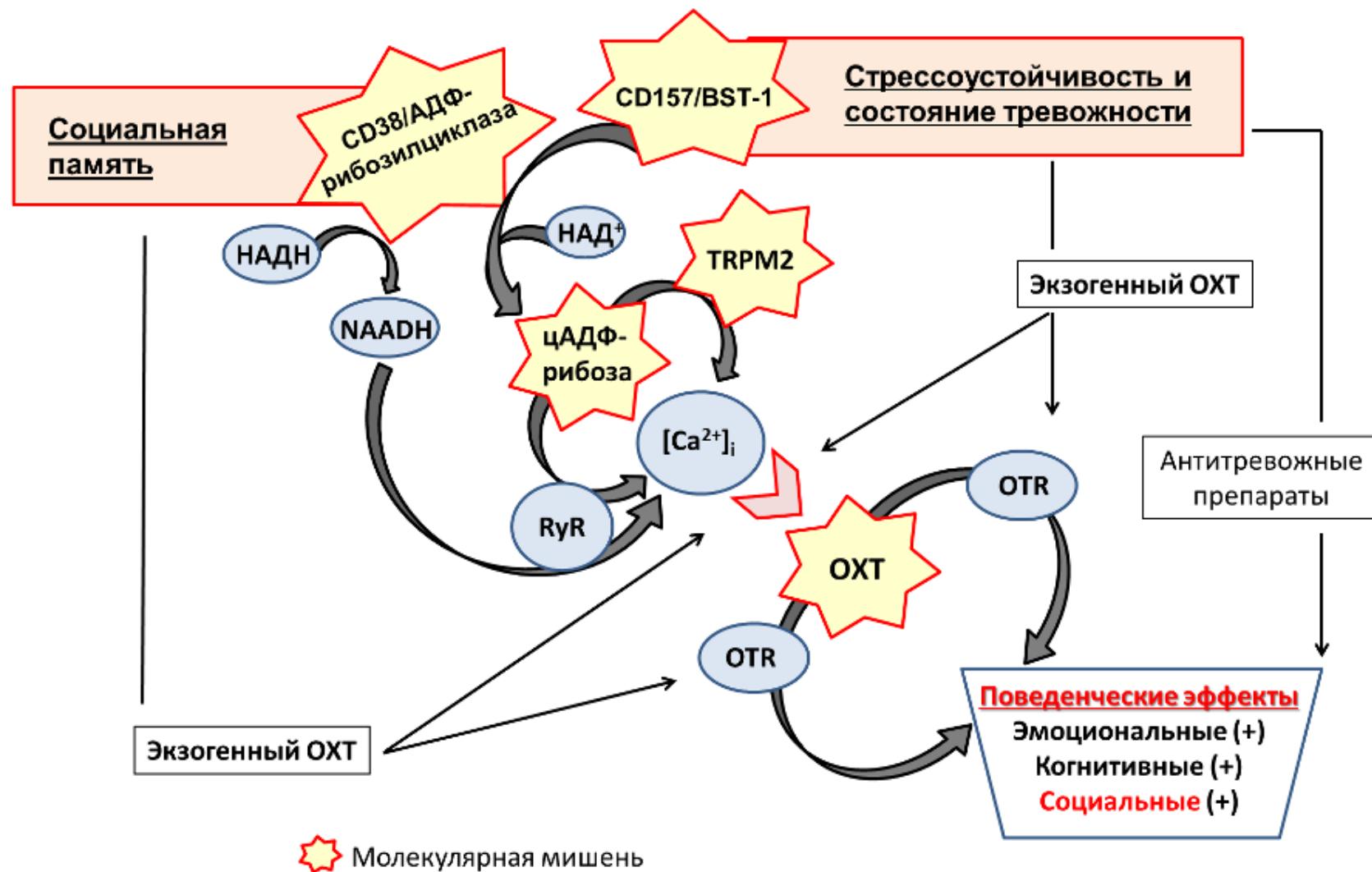


Рисунок 81 Новые молекулярные мишени для коррекции механизмов регуляции социального поведения и тревожных состояний.

ВЫВОДЫ

1. цАДФ-рибоза, продуцируемая в клетках нейрональной природы за счет каталитической активности CD38 и CD157, действует как вторичный мессенджер с негативной регуляцией активности ОХТ рецепторов и стимулирующим действием на процессы термочувствительной Ca^{2+} -индуцируемой мобилизации кальция через каналы TRPM2.
2. Окситоцин, инициируя процессы ауторегуляции, вызывает цАДФ-рибоза-опосредованное увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в клетках-мишениях двумя способами: (i) высвобождение Ca^{2+} через рианодиновые рецепторы (протеинкиназа С-зависимый механизм) и (ii) мобилизация Ca^{2+} через каналы TRPM2.
3. Белок TRPM2 и однонуклеотидные полиморфизмы в гене, кодирующем TRPM2, являются новыми молекулами-мишениями при заболеваниях, ассоциированных с нарушением социального поведения и стрессоустойчивости, формированием аутистического фенотипа.
4. CD157 является мультисистемным регулятором, обеспечивающим синтез цАДФР-рибозы в клетках центральной нервной системы. Нарушение его экспрессии является фактором риска развития состояний тревожности и социального избегания, а также некоторых клинических симптомов при хронической нейродегенерации (экспериментальная болезнь Паркинсона).
5. CD157 и CD38 участвуют в регуляции процессов нейрогенеза, с преимущественным влиянием CD38 на ранние его этапы, а также важны для эффективного синаптогенеза. Развитие хронической нейродегенерации (экспериментальная болезнь Альцгеймера) сопровождается увеличением экспрессии CD38 и CD157 в клетках микроглии ольфакторных луковиц, что свидетельствует об участии этих белков в генезе нейровоспаления.
6. Экспрессия CD157 влияет на центральное аксональное высвобождение ОХТ, что определяет эффективность раннего постнатального развития головного мозга и «верbalной» коммуникации между особями. Линия *Cd157^{7-/-}* мышей

является релевантной моделью для изучения психических расстройств, ассоциированных с развитием тревожности.

7. Секреция эндогенного ОХТ определяет особенности социального поведения и обеспечивает анксиолитический эффект при стрессе. Экзогенный ОХТ обеспечивает анксиолитический эффект, стимулирует мотивацию к социальной активности, способствует увеличению эффективности «вербальной» коммуникации и компенсирует нарушения социального поведения у *Cd157^{-/-}* мышей.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Определение уровня окситоцина в плазме периферической крови может быть рекомендовано при диагностике состояний, связанных с нарушениями социального поведения, и при мониторинге эффективности проводимой терапии.
2. Определение полиморфизмов гена CD157 может быть рекомендовано в качестве дополнительного диагностического критерия при болезни Паркинсона (прогнозирование ранних признаков нарушений социализации и возникновения предмоторных проявлений) и нейропсихической патологии, сопровождающейся развитием тревожности.
3. Определение экспрессии CD38 и CD157 в ткани головного мозга может быть рекомендовано для оценки эффективности нейрогенеза и синаптогенеза в норме и при хронической нейродегенерации альцгеймеровского типа.
4. Применение экзогенного окситоцина (или его аналогов) и направленная модуляция экспрессии молекул, определяющих эффективность секреции окситоцина или реализации его биологических эффектов (CD38, CD157, TRPM2, PKC, RyR) оправдано при терапии заболеваний, ассоциированных с нарушением стрессоустойчивости, развитием тревожности, ограничением социальных контактов и нарушением социальной памяти.

Обозначения и сокращения

АДФ – аденоzinидифосфат

цАДФ-рибоза -- циклическая АДФ-рибоза

ФГБОУ ВО - федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

БА – болезнь Альцгеймера

БП – болезнь Паркинсона

НАД - никотинамиадениндинуклеотид

NAADP – nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate - адениндинуклеотидфосфат никотиновой кислоты

мл – миллилитр

нг – нанограмм

РАС - расстройства аутистического спектра

сек - секунда

ЦНС – центральная нервная система

BSA - bovine serum albumin - бычий сывороточный альбумин

cADPR - cyclic ADP Ribose – циклическая АДФ-рибоза

CD157/BST – bone marrow stromal cell antigen/АДФР-циклаза 2 типа

CD38 – НАД+-гликогидролаза/CD38

CSF- cerebrospinal fluid

GFAP - glial fibrillary acidic protein - глиальный фибриллярный кислый белок - маркер астроцитов

i.p. – intraperitoneal - интраперитонеально

Mean – среднее значение

OXT – окситоцин

OXTR – окситоциновые рецепторы

NAD – никотинамид адениндинуклеотид

NMN - nicotinamide mononucleotide – никотинамид мононуклеотид

PBS - phosphate-buffered saline – фосфатный буфер

PCA - perchloric acid – хлорная кислота

PND – postnatal day - день постнатального развития

PPi - inorganic pyrophosphate – неорганический пирофосфат

S100 β - кальций связывающий белок, экспрессируется только подтипом зрелых астроцитов, которые сосуществуют с кровеносными сосудами

S.E.M. – standard error of mean - стандартная ошибка среднего

USV – ultrasonic vocalization - ультразвуковая вокализация

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Амстиславская Т.Г. [и др.]. Влияние сексуального опыта на половое мотивационное и копуляторное поведение самцов крыс // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2010. № 2 (96). С. 154–162.
2. Бажанова Е.Д. [и др.]. Изменения окситоцинергических нейросекреторных клеток в добавочных крупноклеточных нейроэндокринных ядрах гипоталамуса у крыс при старении // Морфология. 1997. № 111. С. 44.
3. Бажанова Е.Д. [и др.]. Регуляция апоптоза нейросекреторных клеток гипоталамуса у трансгенных мышей HER-2/NEU в онтогенезе // Успехи геронтологии. 2007. № 4 (20). С. 31–35.
4. Балабан П.М., Гуляева Н.В. Нейрофилософия // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2015. № 4 (65). С. 498.
5. Белокоскова С.Г., Цикунов С.Г. Агонист ν 2 рецепторов вазопрессина 1-дезамино-8-d-аргинин-вазопрессин редуцирует симптомы паркинсонизма // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2013. № 4 (11). С. 61–67.
6. Беляева Ю.С. [и др.]. Ингибиование BCL-2 стимулирует пролиферацию нейрональных клеток-предшественников в органотипической культуре гиппокампа мышей // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2013. № 8 (99). С. 976–983.
7. Галямина А.Г. [и др.]. Влияние диазепама на смешанное тревожно-депрессивное расстройство у самцов мышей // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2013. № 11 (99). С. 1240–1249.
8. Гербек Ю.Э. [и др.]. Окситоцин: коэволюция человека и доместицированных животных // Вавиловский журнал генетики и селекции. № 2 (20). С. 220–227.
9. Гончарова Н.Д. [и др.]. Возрастные и индивидуальные особенности вазопрессинергической регуляции гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы у приматов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2014. № 12 (158). С. 773–776.

10. Горшков-Кантакузен В.А., Шпикалова М.А. Корреляции уровней окситоцина у детей разных этнических групп с аутизмом и расстройствами аутистического спектра // Бюллетень науки и практики. 2016. № 12 (13). С. 171–178.
11. Григорьева А.Е. [и др.]. Проагрессивный эффект диазепама у самцов мышей с повторным опытом агрессии // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2013. № 4 (63). С. 486.
12. Григорьева, М. Е., Голубева, М. Г. Окситоцин: строение, синтез, рецепторы и основные эффекты // Нейрохимия. 2010. № 2 (27). С. 93–101.
13. Дудук С.Л. Клиническая и нейропсихологическая характеристика пациентов, страдающих болезнью альцгеймера // Психиатрия, психотерапия и клиническая психология. 2010. № 1. С. 20–25.
14. Зюзина А.Б., Балабан П.М. Угашение и реконсолидация памяти // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2015. № 5 (65). С. 564.
15. Иллариошкин С.Н. Паркинсонизм с ранним началом // Нервные болезни. 2006. № 3. С. 14–20.
16. Иллариошкин С.Н. Ранние (додементные) формы когнитивных расстройств // Consilium Medicum. 2007. № 2 (9). С. 107–111.
17. Ким П.А. [и др.]. Отставленные эффекты неонатального введения аргинин-вазопрессина и его структурного аналога AC-D-MPRG на ориентировочно-исследовательское поведение и уровень тревожности белых крыс // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2011. № 4 (9). С. 17–22.
18. Коваленко И.Л. [и др.]. Снижение потребления раствора сахарозы мышами линии svb/lac в условиях хронического социального стресса // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2010. № 5 (60). С. 609–614.
19. Кудрявцева Н.Н. [и др.]. Влияние повторного опыта побед и поражений в социальных конфликтах на состояние серотонинергической системы головного мозга самцов мышей. // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 1996. № 6 (46). С. 1088.
20. Кудрявцева Н.Н., Бондарь Н.П., Августинович Д.Ф. Влияние повторного опыта агрессии на агрессивную мотивацию и развитие тревожности у самцов

мышей // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2003. № 3 (53). С. 361–371.

21. Меркулов В.М., Меркулова Т.И., Бондарь Н.П. Механизмы формирования глюкокортикоидной резистентности в структурах головного мозга при стресс-индуцированных психопатологиях обзор // Биохимия. 2017. № 3 (82). С. 494–510.
22. Миронова В.И., Рыбникова Е.А. Нейроэндокринные механизмы протективного эффекта гипоксического прекондиционирования в экспериментальных моделях депрессии и тревоги // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2010. № 1 (8). С. 53–54.
23. Миронова В.И., Рыбникова Е.А., Ракицкая В.В. Экспрессия вазопрессина в гипоталамусе активных и пассивных крыс при развитии постстрессорной депрессии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2005. № 12 (140). С. 618–621.
24. Мисюк Н.Н. [и др.]. Нейрофизиологические исследования при аутизме // Психиатрия, психотерапия и клиническая психология. 2012. № 4(10). С. 96–109.
25. Нейсон Б. О ключевых проблемах аутизма сенсорные аспекты аутизма // Аутизм и нарушения развития. 2016. № 3(52) (14). С. 42–48.
26. Романова И.В., Михрина А.Л., Чернышева М.П. Анализ становления морфофункциональных взаимосвязей CART и AGRP с дофаминергическими нейронами в онтогенезе млекопитающих // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2014. № 5 (50). С. 392–398.
27. Салмина А.Б. [и др.]. Развитие апоптоза и изменение активности АДФ-рибозилцилазы при ишемическом повреждении головного мозга // Развитие апоптоза и изменение активности АДФ-рибозилцилазы при ишемическом повреждении головного мозга. 2006. № 4 (41). С. 22–27.
28. Салмина А.Б. [и др.]. Нарушения метаболизма НАД⁺ в нейрональной дисфункции при критических состояниях // Общая реаниматологи. 2008. № 1 (IV). С. 80–84.
29. Салмина А.Б. [и др.]. НАД⁺-зависимые механизмы нарушения жизнеспособности клеток головного мозга в остром периоде гипоксически-

- ишемического перинатального поражения // Нейрохимия. 2008. № 3 (25). С. 247–254.
30. Салмина А.Б. [и др.]. Изменение экспрессии и активности CD38 в клетках астроглиальной природы при нарушениях нейрон-глиальных взаимодействий при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении головного мозга // Нейрохимия. 2009. № 3 (26). С. 237–244.
31. Самойлов М.О., Рыбникова Е.А. Молекулярно-клеточные и гормональные механизмы индуцированной толерантности мозга к экстремальным факторам среды // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2012. № 1 (98). С. 108–126.
32. Симашкова Н.В. [и др.]. Мультидисциплинарная клинико-биологическая характеристика гиперкинетических расстройств при детском аутизме // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2012. № S2. С. 78–83.
33. Скворцова В.И., Лимборская С.А., Левицкий Г.Н. Современные представления об этиологии, патогенезе и лечении болезни двигательного нейрона // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2005. № 1 (105). С. 4–12.
34. Строганова Т.А., Орехова Е.В. Психофизиология индивидуальных различий в младенчестве: современное состояние проблемы // Вопросы психологии. 1998. № 1. С. 124–146.
35. Строганова Т.А., Орехова Е.В., Галюта И.А. Нейронные механизмы нарушений ориентировки внимания у детей с расстройством аутистического спектра // Экспериментальная психология. 2015. № 3 (8). С. 7–23.
36. Тендитник М.В. [и др.]. Эффекты диазепама на субпопуляционный состав лимфоцитов иммунокомпетентных органов тревожных самцов мышей // Сибирский научный медицинский журнал. 2010. № 4 (30). С. 46–51.
37. Трифонова Е.А., Хлебодарова Т.М., Грунтенко Н.Е. Аутизм как проявление нарушения молекулярных механизмов регуляции развития и функций синапсов // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016. № 6 (20). С. 959–967.

38. Тюзиков И.А. [и др.]. Вазопрессин: неклассические эффекты и роль в патогенезе ассоциированных с возрастом заболеваний // Эффективная фармакотерапия. 2015. № 26. С. 38–50.
39. Хазипов Р.Н., Гиниатуллин Р.А. Окситоцин и физиологическая адаптация плода во время родов // Казанский медицинский журнал. 2011. № 5 (92). С. 700–706.
40. Чернышева М.П., Ноздрачев А.Д. Нонапептид окситоцин: соматические и висцеральные функции при некоторых психопатологиях // Психофармакология и биологическая наркология. 2009. № 3–4 (9). С. 2574–2590.
41. Aarhus R. [и др.]. ADP-ribosyl Cyclase and CD38 Catalyze the Synthesis of a Calcium-mobilizing Metabolite from NADP+ // Journal of Biological Chemistry. 1995. № 51 (270). С. 30327–30333.
42. Adriaan Bouwknecht J., Olivier B., Paylor R.E. The stress-induced hyperthermia paradigm as a physiological animal model for anxiety: A review of pharmacological and genetic studies in the mouse // Neuroscience & Biobehavioral Reviews. 2007. № 1 (31). С. 41–59.
43. Akimoto N. [и др.]. Immunohistochemistry of CD38 in Different Cell Types in the Hypothalamus and Pituitary of Male Mice // Messenger. 2013. № 1 (2). С. 54–61.
44. Akther S. [и др.]. CD38 in the nucleus accumbens and oxytocin are related to paternal behavior in mice // Molecular Brain. 2013. № 1 (6). С. 41.
45. Altamura A.C. [и др.]. Understanding the pharmacokinetics of anxiolytic drugs // Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology. 2013. № 4 (9). С. 423–440.
46. Althaus M. [и др.]. Do blood plasma levels of oxytocin moderate the effect of nasally administered oxytocin on social orienting in high-functioning male adults with autism spectrum disorder? // Psychopharmacology. 2016. № 14 (233). С. 2737–2751.
47. Andari E. [и др.]. Promoting social behavior with oxytocin in high-functioning autism spectrum disorders // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010. № 9 (107). С. 4389–4394.

48. Aoki Y. [и др.]. Oxytocin improves behavioural and neural deficits in inferring others' social emotions in autism // *Brain: A Journal of Neurology*. 2014. № Pt 11 (137). C. 3073–3086.
49. Arunachalam S., Luyster R.J. The integrity of lexical acquisition mechanisms in autism spectrum disorders: A research review: lexical acquisition in ASD // *Autism Research*. 2016. № 8 (9). C. 810–828.
50. Auyeung B. [и др.]. Oxytocin increases eye contact during a real-time, naturalistic social interaction in males with and without autism // *Translational Psychiatry*. 2015. № 2 (5). C. e507.
51. Barbeau E.B. [и др.]. A greater involvement of posterior brain areas in interhemispheric transfer in autism: fMRI, DWI and behavioral evidences // *NeuroImage: Clinical*. 2015. (8). C. 267–280.
52. Barraza J.A., Zak P.J. Empathy toward strangers triggers oxytocin release and subsequent generosity // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009. (1167). C. 182–189.
53. Bartz J.A. [и др.]. Effects of oxytocin on recollections of maternal care and closeness // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010. № 50 (107). C. 21371–21375.
54. Bartz J.A. [и др.]. Social effects of oxytocin in humans: context and person matter // *Trends in Cognitive Sciences*. 2011.
55. Beck A. [и др.]. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate and cyclic ADP-ribose regulate TRPM2 channels in T lymphocytes // *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2006. № 7 (20). C. 962–964.
56. Bell C.J. [и др.]. Plasma oxytocin levels in depression and their correlation with the temperament dimension of reward dependence // *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*. 2006. № 5 (20). C. 656–660.
57. Belsky J., Pluess M. Beyond diathesis stress: Differential susceptibility to environmental influences. // *Psychological Bulletin*. 2009. № 6 (135). C. 885–908.

58. Bendix M. [и др.]. Plasma oxytocin and personality traits in psychiatric outpatients // *Psychoneuroendocrinology*. 2015. (57). C. 102–110.
59. Boittin F.-X. [и др.]. Vasodilation by the calcium-mobilizing messenger cyclic ADP-ribose // *The Journal of Biological Chemistry*. 2003. № 11 (278). C. 9602–9608.
60. Born J. [и др.]. Sniffing neuropeptides: a transnasal approach to the human brain // *Nature Neuroscience*. 2002. № 6 (5). C. 514–516.
61. Bosch O.J. [и др.]. Brain oxytocin correlates with maternal aggression: link to anxiety // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 2005. № 29 (25). C. 6807–6815.
62. Bosch O.J. Maternal nurturing is dependent on her innate anxiety: the behavioral roles of brain oxytocin and vasopressin // *Hormones and Behavior*. 2011. № 2 (59). C. 202–212.
63. Bosch O.J., Neumann I.D. Brain vasopressin is an important regulator of maternal behavior independent of dams' trait anxiety // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008. № 44 (105). C. 17139–17144.
64. Bouwknecht J.A. [и др.]. Differential effects of exposure to low-light or high-light open-field on anxiety-related behaviors: Relationship to c-Fos expression in serotonergic and non-serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus // *Brain Research Bulletin*. 2007. № 1 (72). C. 32–43.
65. Boyce W.T., Ellis B.J. Biological sensitivity to context: I. An evolutionary–developmental theory of the origins and functions of stress reactivity // *Development and Psychopathology*. 2005. № 02 (17).
66. Brambilla M. [и др.]. Effects of Intranasal Oxytocin on Long-Term Memory in Healthy Humans: A Systematic Review // *Drug Development Research*. 2016. № 8 (77). C. 479–488.
67. Branchi I., Santucci D., Alleva E. Ultrasonic vocalisation emitted by infant rodents: a tool for assessment of neurobehavioural development // *Behavioural Brain Research*. 2001. № 1–2 (125). C. 49–56.
68. Brown C.H., Bosch O.J. Vasopressin and Oxytocin: Conductors of the Symphony of Physiology and Behaviour // *Journal of Neuroendocrinology*. 2016. № 4 (28).

69. Brunton P.J., Russell J.A. The expectant brain: adapting for motherhood // *Nature Reviews Neuroscience*. 2008. № 1 (9). C. 11–25.
70. Bruzzone S. [и др.]. A self-restricted CD38-connexin 43 cross-talk affects NAD⁺ and cyclic ADP-ribose metabolism and regulates intracellular calcium in 3T3 fibroblasts // *The Journal of Biological Chemistry*. 2001. № 51 (276). C. 48300–48308.
71. Burg E.H. van den, Neumann I.D. Bridging the gap between GPCR activation and behaviour: oxytocin and prolactin signalling in the hypothalamus // *Journal of molecular neuroscience: MN*. 2011. № 2 (43). C. 200–208.
72. Butterweck V., Prinz S., Schwaninger M. The role of interleukin-6 in stress-induced hyperthermia and emotional behaviour in mice // *Behavioural Brain Research*. 2003. № 1–2 (144). C. 49–56.
73. Campos F.L. [и др.]. Rodent models of Parkinson's disease: beyond the motor symptomatology // *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2013. (7).
74. Caravaggio F. [и др.]. Intranasal oxytocin does not modulate jumping to conclusions in schizophrenia: Potential interactions with caudate volume and baseline social functioning // *Psychoneuroendocrinology*. 2017. (81). C. 80–87.
75. Cardoso C., Kingdon D., Ellenbogen M.A. A meta-analytic review of the impact of intranasal oxytocin administration on cortisol concentrations during laboratory tasks: moderation by method and mental health // *Psychoneuroendocrinology*. 2014. (49). C. 161–170.
76. Carter C.S. [и др.]. Consequences of Early Experiences and Exposure to Oxytocin and Vasopressin Are Sexually Dimorphic // *Developmental Neuroscience*. 2009. № 4 (31). C. 332–341.
77. Caspi A. [и др.]. Genetic Sensitivity to the Environment: The Case of the Serotonin Transporter Gene and Its Implications for Studying Complex Diseases and Traits // *American Journal of Psychiatry*. 2010. № 5 (167). C. 509–527.
78. Ceni C. [и др.]. CD38-dependent ADP-ribosyl cyclase activity in developing and adult mouse brain // *The Biochemical Journal*. 2003. № Pt 1 (370). C. 175–183.

79. Ceni C. [и др.]. The CD38-independent ADP-ribosyl cyclase from mouse brain synaptosomes: a comparative study of neonate and adult brain // The Biochemical Journal. 2006. № 2 (395). C. 417–426.
80. Ceroni F. [и др.]. A Deletion Involving *CD 38* and *BST 1* Results in a Fusion Transcript in a Patient With Autism and Asthma: *CD38/BST1* deletion with autism and asthma // Autism Research. 2014. № 2 (7). C. 254–263.
81. Chang S.-C. [и др.]. Are genetic variations in OXTR, AVPR1A, and CD38 genes important to social integration? Results from two large U.S. cohorts // Psychoneuroendocrinology. 2014. (39). C. 257–268.
82. Chang X.-L. [и др.]. Association of GWAS loci with PD in China // American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics. 2011. № 3 (156). C. 334–339.
83. Chaudhury D. [и др.]. Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons // Nature. 2012. № 7433 (493). C. 532–536.
84. Chen M.-L. [и др.]. BST1 rs11724635 interacts with environmental factors to increase the risk of Parkinson's disease in a Taiwanese population // Parkinsonism & Related Disorders. 2014. № 3 (20). C. 280–283.
85. Chung S.J. [и др.]. Alzheimer's disease and Parkinson's disease genome-wide association study top hits and risk of Parkinson's disease in Korean population // Neurobiology of Aging. 2013. № 11 (34). C. 2695.e1-2695.e7.
86. Churchland P.S., Winkielman P. Modulating social behavior with oxytocin: How does it work? What does it mean? // Hormones and Behavior. 2012. № 3 (61). C. 392–399.
87. Crawley J.N. Behavioral Phenotyping Strategies for Mutant Mice // Neuron. 2008. № 6 (57). C. 809–818.
88. Curran L.K. [и др.]. Behaviors Associated With Fever in Children With Autism Spectrum Disorders // PEDIATRICS. 2007. № 6 (120). C. e1386–e1392.
89. D'amato F.R. Courtship ultrasonic vocalizations and social status in mice // Animal Behaviour. 1991. № 5 (41). C. 875–885.

90. Dawson T.M., Ko H.S., Dawson V.L. Genetic Animal Models of Parkinson's Disease // *Neuron*. 2010. № 5 (66). C. 646–661.
91. Dayanithi G., Sabatier N., Widmer H. Intracellular calcium signalling in magnocellular neurones of the rat supraoptic nucleus: understanding the autoregulatory mechanisms // *Experimental Physiology*. 2000. (85 Spec No). C. 75S–84S.
92. D'Cunha T.M. [и др.]. Oxytocin receptors in the nucleus accumbens shell are involved in the consolidation of maternal memory in postpartum rats // *Hormones and Behavior*. 2011. № 1 (59). C. 14–21.
93. De Dreu C.K.W. [и др.]. The neuropeptide oxytocin regulates parochial altruism in intergroup conflict among humans // *Science (New York, N.Y.)*. 2010. № 5984 (328). C. 1408–1411.
94. De Felice A. [и др.]. Prenatal Exposure to a Common Organophosphate Insecticide Delays Motor Development in a Mouse Model of Idiopathic Autism // *PLOS ONE*. 2015. № 3 (10). C. e0121663.
95. Deaglio S. [и др.]. CD38/CD31, a receptor/ligand system ruling adhesion and signaling in human leukocytes // *Chemical Immunology*. 2000. (75). C. 99–120.
96. Deaglio S., Robson S.C. Ectonucleotidases as Regulators of Purinergic Signaling in Thrombosis, Inflammation, and Immunity Elsevier, 2011. 301–332 c.
97. Demirci E. [и др.]. The relationship between aggression, empathy skills and serum oxytocin levels in male children and adolescents with attention deficit and hyperactivity disorder // *Behavioural Pharmacology*. 2016. № 8 (27). C. 681–688.
98. Deshpande D.A. [и др.]. CD38/cyclic ADP-ribose signaling: role in the regulation of calcium homeostasis in airway smooth muscle // *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2005. № 5 (288). C. L773-788.
99. Devost D., Carrier M.-E., Zingg H.H. Oxytocin-induced activation of eukaryotic elongation factor 2 in myometrial cells is mediated by protein kinase C // *Endocrinology*. 2008. № 1 (149). C. 131–138.
100. Di Simplicio M. [и др.]. Oxytocin enhances processing of positive versus negative emotional information in healthy male volunteers // *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*. 2009. № 3 (23). C. 241–248.

101. Dichter G.S., Brunelli S.A., Hofer M.A. Elevated plus-maze behavior in adult offspring of selectively bred rats // *Physiology & Behavior*. 1996. № 1 (60). C. 299–304.
102. DiStefano C. [и др.]. Communication growth in minimally verbal children with ASD: The importance of interaction: Communication in minimally verbal children // *Autism Research*. 2016. № 10 (9). C. 1093–1102.
103. Ditzen B. [и др.]. Effects of different kinds of couple interaction on cortisol and heart rate responses to stress in women // *Psychoneuroendocrinology*. 2007. № 5 (32). C. 565–574.
104. Ditzen B. [и др.]. Intranasal oxytocin increases positive communication and reduces cortisol levels during couple conflict // *Biological Psychiatry*. 2009. № 9 (65). C. 728–731.
105. Domes G. [и др.]. Oxytocin improves «mind-reading» in humans // *Biological Psychiatry*. 2007. № 6 (61). C. 731–733.
106. Domes G. [и др.]. Oxytocin differentially modulates eye gaze to naturalistic social signals of happiness and anger // *Psychoneuroendocrinology*. 2013. № 7 (38). C. 1198–1202.
107. Domes G. [и др.]. Oxytocin promotes facial emotion recognition and amygdala reactivity in adults with asperger syndrome // *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2014. № 3 (39). C. 698–706.
108. Donaldson Z.R., Young L.J. Oxytocin, Vasopressin, and the Neurogenetics of Sociality // *Science*. 2008. № 5903 (322). C. 900–904.
109. Drijgers R.L. [и др.]. Validation of diagnostic criteria for apathy in Parkinson's disease // *Parkinsonism & Related Disorders*. 2010. № 10 (16). C. 656–660.
110. Dulac C., O'Connell L.A., Wu Z. Neural control of maternal and paternal behaviors // *Science*. 2014. № 6198 (345). C. 765–770.
111. Eapen V. [и др.]. Separation Anxiety, Attachment and Inter-Personal Representations: Disentangling the Role of Oxytocin in the Perinatal Period // *PLoS ONE*. 2014. № 9 (9). C. e107745.

112. Ebstein R.P. [и др.]. Genetics of Human Social Behavior // *Neuron*. 2010. № 6 (65). C. 831–844.
113. Edmunds S.R. [и др.]. Longitudinal prediction of language emergence in infants at high and low risk for autism spectrum disorder // *Development and Psychopathology*. 2016. C. 1–11.
114. Eigsti I.-M. [и др.]. Language acquisition in autism spectrum disorders: A developmental review // *Research in Autism Spectrum Disorders*. 2011. № 2 (5). C. 681–691.
115. Encinas J.M., Enikolopov G. Identifying and quantitating neural stem and progenitor cells in the adult brain // *Methods in Cell Biology*. 2008. (85). C. 243–272.
116. Febo M. [и др.]. Oxytocin modulates unconditioned fear response in lactating dams: an fMRI study // *Brain Research*. 2009. (1302). C. 183–193.
117. Feldman R. [и др.]. Natural variations in maternal and paternal care are associated with systematic changes in oxytocin following parent-infant contact // *Psychoneuroendocrinology*. 2010. № 8 (35). C. 1133–1141.
118. Feldman R. [и др.]. Sensitive Parenting Is Associated with Plasma Oxytocin and Polymorphisms in the OXTR and CD38 Genes // *Biological Psychiatry*. 2012. № 3 (72). C. 175–181.
119. Feldman R. [и др.]. Oxytocin Pathway Genes: Evolutionary Ancient System Impacting on Human Affiliation, Sociality, and Psychopathology // *Biological Psychiatry*. 2016. № 3 (79). C. 174–184.
120. Feldman R. [и др.]. Oxytocin Pathway Genes: Evolutionary Ancient System Impacting on Human Affiliation, Sociality, and Psychopathology // *Biological Psychiatry*. 2016. № 3 (79). C. 174–184.
121. Feldman R., Vengrober A., Ebstein R.P. Affiliation buffers stress: cumulative genetic risk in oxytocin–vasopressin genes combines with early caregiving to predict PTSD in war-exposed young children // *Translational Psychiatry*. 2014. № 3 (4). C. e370.
122. Ferguson J.N. [и др.]. Social amnesia in mice lacking the oxytocin gene // *Nature Genetics*. 2000. № 3 (25). C. 284–288.

123. Ferrero E., Saccucci F., Malavasi F. The human CD38 gene: polymorphism, CpG island, and linkage to the CD157 (BST-1) gene // Immunogenetics. 1999. № 7–8 (49). C. 597–604.
124. Fitch W.T., Huber L., Bugnyar T. Social Cognition and the Evolution of Language: Constructing Cognitive Phylogenies // Neuron. 2010. № 6 (65). C. 795–814.
125. Fleig A., Penner R. The TRPM ion channel subfamily: molecular, biophysical and functional features // Trends in Pharmacological Sciences. 2004. № 12 (25). C. 633–639.
126. Fleming A.S., O'Day D.H., Kraemer G.W. Neurobiology of mother-infant interactions: experience and central nervous system plasticity across development and generations // Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 1999. № 5 (23). C. 673–685.
127. Fleming J.O. [и др.]. Improvements in obtaining and characterizing mouse cerebrospinal fluid☆Application to mouse hepatitis virus-induced encephalomyelitis // Journal of Neuroimmunology. 1983. № 2 (4). C. 129–140.
128. Franklin K.B.J., Paxinos G. The mouse brain in stereotaxic coordinates / K.B.J. Franklin, G. Paxinos, 3. ed-е изд., Amsterdam: Elsevier, AP, 2008. 162 c.
129. Freeman S.M. [и др.]. Plasma and CSF oxytocin levels after intranasal and intravenous oxytocin in awake macaques // Psychoneuroendocrinology. 2016. (66). C. 185–194.
130. Freeman S.M., Young L.J. Comparative Perspectives on Oxytocin and Vasopressin Receptor Research in Rodents and Primates: Translational Implications // Journal of Neuroendocrinology. 2016. № 4 (28).
131. Frijling J.L. Preventing PTSD with oxytocin: effects of oxytocin administration on fear neurocircuitry and PTSD symptom development in recently trauma-exposed individuals // European Journal of Psychotraumatology. 2017. № 1 (8). C. 1302652.
132. Funaro A. CD157 is an important mediator of neutrophil adhesion and migration // Blood. 2004. № 13 (104). C. 4269–4278.
133. Gainer H., Fields R.L., House S.B. Vasopressin gene expression: experimental models and strategies // Experimental Neurology. 2001. № 2 (171). C. 190–199.

134. Gaub S., Fisher S.E., Ehret G. Ultrasonic vocalizations of adult male *Foxp2* - mutant mice: behavioral contexts of arousal and emotion: Ultrasonic vocalizations of *Foxp2* mutant mice // *Genes, Brain and Behavior*. 2016. № 2 (15). C. 243–259.
135. Gimpl G., Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation // *Physiological Reviews*. 2001. № 2 (81). C. 629–683.
136. Goldman M.B. [и др.]. Divergent effects of two different doses of intranasal oxytocin on facial affect discrimination in schizophrenic patients with and without polydipsia // *Psychopharmacology*. 2011. № 1 (216). C. 101–110.
137. Good P. Does Fever Relieve Autistic Behavior by Improving Brain Blood Flow? // *Neuropsychology Review*. 2011. № 1 (21). C. 66–67.
138. Good P. Does infectious fever relieve autistic behavior by releasing glutamine from skeletal muscles as provisional fuel? // *Medical Hypotheses*. 2013. № 1 (80). C. 1–12.
139. Gordon I. [и др.]. Prolactin, Oxytocin, and the development of paternal behavior across the first six months of fatherhood // *Hormones and Behavior*. 2010. № 3 (58). C. 513–518.
140. Gordon I. [и др.]. Oxytocin and the development of parenting in humans // *Biological Psychiatry*. 2010. № 4 (68). C. 377–382.
141. Gordon I. [и др.]. Oxytocin enhances brain function in children with autism // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013. № 52 (110). C. 20953–20958.
142. Grabowski H. [и др.]. Rabbit whey acidic protein concentration in milk, serum, mammary gland extract, and culture medium // *Journal of Dairy Science*. 1991. № 12 (74). C. 4143–4150.
143. Graeff R.M. [и др.]. Enzymatic synthesis and characterizations of cyclic GDP-ribose. A procedure for distinguishing enzymes with ADP-ribosyl cyclase activity // *The Journal of Biological Chemistry*. 1994. № 48 (269). C. 30260–30267.
144. Green L. [и др.]. Oxytocin and autistic disorder: alterations in peptide forms // *Biological Psychiatry*. 2001. № 8 (50). C. 609–613.

145. Grewen K.M. [и др.]. Effects of partner support on resting oxytocin, cortisol, norepinephrine, and blood pressure before and after warm partner contact // Psychosomatic Medicine. 2005. № 4 (67). C. 531–538.
146. Grimsley J.M.S., Monaghan J.J.M., Wenstrup J.J. Development of Social Vocalizations in Mice // PLoS ONE. 2011. № 3 (6). C. e17460.
147. Grinevich V. [и др.]. Ontogenesis of oxytocin pathways in the mammalian brain: late maturation and psychosocial disorders // Frontiers in Neuroanatomy. 2015. (8).
148. Grinevich V. [и др.]. Assembling the Puzzle: Pathways of Oxytocin Signaling in the Brain // Biological Psychiatry. 2016. № 3 (79). C. 155–164.
149. Guastella A.J. [и др.]. Intranasal oxytocin improves emotion recognition for youth with autism spectrum disorders // Biological Psychiatry. 2010. № 7 (67). C. 692–694.
150. Guastella A.J., Mitchell P.B., Dadds M.R. Oxytocin increases gaze to the eye region of human faces // Biological Psychiatry. 2008. № 1 (63). C. 3–5.
151. Guse A.H. Second messenger function and the structure-activity relationship of cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR) // FEBS Journal. 2005. № 18 (272). C. 4590–4597.
152. Haas B.W. [и др.]. Epigenetic modification of *OXT* and human sociability // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2016. № 27 (113). C. E3816–E3823.
153. Hamilton S.M. [и др.]. Multiple autism-like behaviors in a novel transgenic mouse model // Behavioural Brain Research. 2011. № 1 (218). C. 29–41.
154. Hammerschmidt K. [и др.]. Female mice respond to male ultrasonic «songs» with approach behaviour // Biology Letters. 2009. № 5 (5). C. 589–592.
155. Harding A.J. Clinical correlates of selective pathology in the amygdala of patients with Parkinson's disease // Brain. 2002. № 11 (125). C. 2431–2445.
156. Hashii M., Minabe Y., Higashida H. cADP-ribose potentiates cytosolic Ca²⁺ elevation and Ca²⁺ entry via L-type voltage-activated Ca²⁺ channels in NG108-15 neuronal cells // The Biochemical Journal. 2000. (345 Pt 2). C. 207–215.
157. Hattori T. [и др.]. CD38 positively regulates postnatal development of astrocytes cell-autonomously and oligodendrocytes non-cell-autonomously: HATTORI et al. // Glia. 2017. № 6 (65). C. 974–989.

158. Heinrichs M. [и др.]. Social support and oxytocin interact to suppress cortisol and subjective responses to psychosocial stress // *Biological Psychiatry*. 2003. № 12 (54). C. 1389–1398.
159. Hermosura M.C. [и др.]. Altered functional properties of a TRPM2 variant in Guamanian ALS and PD // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008. № 46 (105). C. 18029–18034.
160. Higashida C. Actin Polymerization-Driven Molecular Movement of mDia1 in Living Cells // *Science*. 2004. № 5666 (303). C. 2007–2010.
161. Higashida C. [и др.]. Dopamine-Induced Regulation and Dereulation of the Catabolism of Cyclic ADP-Ribose, an Intrinsic mTOR Signal Inhibitor, During Development in the Rodent Striatum // *Messenger*. 2013. № 1 (2). C. 33–43.
162. Higashida H. [и др.]. Muscarinic receptor-mediated dual regulation of ADP-ribosyl cyclase in NG108-15 neuronal cell membranes // *The Journal of Biological Chemistry*. 1997. № 50 (272). C. 31272–31277.
163. Higashida H. [и др.]. Sympathetic potentiation of cyclic ADP-ribose formation in rat cardiac myocytes // *The Journal of Biological Chemistry*. 1999. № 47 (274). C. 33348–33354.
164. Higashida H. [и др.]. Cyclic ADP-ribose as a second messenger revisited from a new aspect of signal transduction from receptors to ADP-ribosyl cyclase // *Pharmacology & Therapeutics*. 2001. № 2–3 (90). C. 283–296.
165. Higashida H. [и др.]. Overexpression of human CD38/ADP-ribosyl cyclase enhances acetylcholine-induced Ca²⁺ signalling in rodent NG108-15 neuroblastoma cells // *Neuroscience Research*. 2007. № 3 (57). C. 339–346.
166. Higashida H. [и др.]. Cyclic ADP-ribose as a universal calcium signal molecule in the nervous system // *Neurochemistry International*. 2007. № 2–4 (51). C. 192–199.
167. Higashida H. [и др.]. CD38 and its role in oxytocin secretion and social behavior // *Hormones and Behavior*. 2012. № 3 (61). C. 351–358.
168. Higashida H. [и др.]. Social memory, amnesia, and autism: Brain oxytocin secretion is regulated by NAD⁺ metabolites and single nucleotide polymorphisms of CD38 // *Neurochemistry International*. 2012. № 6 (61). C. 828–838.

169. Higashida H. Somato-axodendritic release of oxytocin into the brain due to calcium amplification is essential for social memory // The journal of physiological sciences: JPS. 2016. № 4 (66). C. 275–282.
170. Hirata Y. [и др.]. ADP ribosyl cyclase activity of a novel bone marrow stromal cell surface molecule, BST-1 // FEBS Letters. 1994. № 2–3 (356). C. 244–248.
171. Hoge E.A. [и др.]. Oxytocin Levels in Social Anxiety Disorder // CNS Neuroscience & Therapeutics. 2008. № 3 (14). C. 165–170.
172. Holtfrerich S.K.C. [и др.]. Endogenous Testosterone and Exogenous Oxytocin Modulate Attentional Processing of Infant Faces // PloS One. 2016. № 11 (11). C. e0166617.
173. Homberg J.R. [и др.]. Understanding autism and other neurodevelopmental disorders through experimental translational neurobehavioral models // Neuroscience & Biobehavioral Reviews. 2016. (65). C. 292–312.
174. Hoshi N. [и др.]. AKAP150 signaling complex promotes suppression of the M-current by muscarinic agonists // Nature Neuroscience. 2003. № 6 (6). C. 564–571.
175. Hovey D. [и др.]. Associations between oxytocin-related genes and autistic-like traits // Social Neuroscience. 2014. № 4 (9). C. 378–386.
176. Howard M. [и др.]. Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38 // Science (New York, N.Y.). 1993. № 5136 (262). C. 1056–1059.
177. Huber D., Veinante P., Stoop R. Vasopressin and oxytocin excite distinct neuronal populations in the central amygdala // Science (New York, N.Y.). 2005. № 5719 (308). C. 245–248.
178. Hurlemann R. [и др.]. Oxytocin enhances amygdala-dependent, socially reinforced learning and emotional empathy in humans // The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience. 2010. № 14 (30). C. 4999–5007.
179. Husarova V.M. [и др.]. Plasma Oxytocin in Children with Autism and Its Correlations with Behavioral Parameters in Children and Parents // Psychiatry Investigation. 2016. № 2 (13). C. 174.

180. Igarashi M., Guarente L. mTORC1 and SIRT1 Cooperate to Foster Expansion of Gut Adult Stem Cells during Calorie Restriction // *Cell*. 2016. № 2 (166). C. 436–450.
181. Inamura K. [и др.]. Response to ADP-ribose by activation of TRPM2 in the CRI-G1 insulinoma cell line // *The Journal of Membrane Biology*. 2003. № 3 (191). C. 201–207.
182. Insel T.R. The Challenge of Translation in Social Neuroscience: A Review of Oxytocin, Vasopressin, and Affiliative Behavior // *Neuron*. 2010. № 6 (65). C. 768–779.
183. Insel T.R., Shapiro L.E. Oxytocin receptor distribution reflects social organization in monogamous and polygamous voles // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992. № 13 (89). C. 5981–5985.
184. Insel T.R., Wang Z.X., Ferris C.F. Patterns of brain vasopressin receptor distribution associated with social organization in microtine rodents // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 1994. № 9 (14). C. 5381–5392.
185. Insel T.R., Winslow J.T. Central administration of oxytocin modulates the infant rat's response to social isolation // *European Journal of Pharmacology*. 1991. № 1 (203). C. 149–152.
186. International Parkinson Disease Genomics Consortium [и др.]. Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies // *Lancet (London, England)*. 2011. № 9766 (377). C. 641–649.
187. Ishihara K., Hirano T. BST-1/CD157 Regulates the Humoral Immune Responses in vivo под ред. K. Mehta, F. Malavasi, Basel: KARGER, 2000. 235–255 с.
188. Ito M. [и др.]. Glycoprotein Hyposialylation Gives Rise to a Nephrotic-Like Syndrome That Is Prevented by Sialic Acid Administration in GNE V572L Point-Mutant Mice // *PLoS ONE*. 2012. № 1 (7). C. e29873.
189. Itoh M. [и др.]. Molecular Cloning of Murine BST-1 Having Homology with CD38 and Aplysia ADP-Ribosyl Cyclase // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1994. № 2 (203). C. 1309–1317.

190. Itoh M. [и др.]. Deletion of bone marrow stromal cell antigen-1 (CD157) gene impaired systemic thymus independent-2 antigen-induced IgG3 and mucosal TD antigen-elicited IgA responses // *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950). 1998. № 8 (161). С. 3974–3983.
191. Jesso S. [и др.]. The effects of oxytocin on social cognition and behaviour in frontotemporal dementia // *Brain: A Journal of Neurology*. 2011. № Pt 9 (134). С. 2493–2501.
192. Jiang L.-H. [и др.]. TRPM2 channel properties, functions and therapeutic potentials // *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2010. № 9 (14). С. 973–988.
193. Jin D. [и др.]. CD38 is critical for social behaviour by regulating oxytocin secretion // *Nature*. 2007. № 7131 (446). С. 41–45.
194. Johnson Z.V., Young L.J. Oxytocin and vasopressin neural networks: Implications for social behavioral diversity and translational neuroscience // *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2017. № Pt A (76). С. 87–98.
195. Kaisho T. [и др.]. BST-1, a surface molecule of bone marrow stromal cell lines that facilitates pre-B-cell growth. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994. № 12 (91). С. 5325–5329.
196. Kajimoto Y. [и др.]. Pancreatic Islet Cells Express BST-1, a CD38-like Surface Molecule Having ADP-Ribosyl Cyclase Activity // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1996. № 3 (219). С. 941–946.
197. Kanat M. [и др.]. Restoring effects of oxytocin on the attentional preference for faces in autism // *Translational Psychiatry*. 2017. № 4 (7). С. e1097.
198. Kato I. [и др.]. CD38 disruption impairs glucose-induced increases in cyclic ADP-ribose, $[Ca^{2+}]_i$, and insulin secretion // *The Journal of Biological Chemistry*. 1999. № 4 (274). С. 1869–1872.
199. Kemp A.H. [и др.]. Oxytocin Increases Heart Rate Variability in Humans at Rest: Implications for Social Approach-Related Motivation and Capacity for Social Engagement // *PLoS ONE*. 2012. № 8 (7). С. e44014.
200. Kéri S., Kiss I., Kelemen O. Sharing secrets: oxytocin and trust in schizophrenia // *Social Neuroscience*. 2009. № 4 (4). С. 287–293.

201. Kim H. [и др.]. Effects of the Female Estrous Cycle on the Sexual Behaviors and Ultrasonic Vocalizations of Male C57BL/6 and Autistic BTBR T+ tf/J Mice // *Experimental Neurobiology*. 2016. № 4 (25). C. 156.
202. Kim U.-H. Multiple Enzymatic Activities of CD38 for Ca²⁺ Signaling Messengers // *Messenger*. 2014. № 1 (3). C. 6–14.
203. Kiss A., Mikkelsen J.D. Oxytocin--anatomy and functional assignments: a minireview // *Endocrine Regulations*. 2005. № 3 (39). C. 97–105.
204. Kluger M.J. [и др.]. Further evidence that stress hyperthermia is a fever // *Physiology & Behavior*. 1987. № 6 (39). C. 763–766.
205. Knobloch H.S. [и др.]. Evoked Axonal Oxytocin Release in the Central Amygdala Attenuates Fear Response // *Neuron*. 2012. № 3 (73). C. 553–566.
206. Knobloch H.S., Grinevich V. Evolution of oxytocin pathways in the brain of vertebrates // *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2014. (8).
207. Koch S.B.J. [и др.]. Intranasal Oxytocin Normalizes Amygdala Functional Connectivity in Posttraumatic Stress Disorder // *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2016. № 8 (41). C. 2041–2051.
208. Kosaka H. [и др.]. Oxytocin efficacy is modulated by dosage and oxytocin receptor genotype in young adults with high-functioning autism: a 24-week randomized clinical trial // *Translational Psychiatry*. 2016. № 8 (6). C. e872.
209. Kosfeld M. [и др.]. Oxytocin increases trust in humans // *Nature*. 2005. № 7042 (435). C. 673–676.
210. Krause S. [и др.]. Effects of the Adult Attachment Projective Picture System on Oxytocin and Cortisol Blood Levels in Mothers // *Frontiers in Human Neuroscience*. 2016. (10). C. 627.
211. Kritman M., Lahoud N., Maroun M. Oxytocin in the amygdala and not the prefrontal cortex enhances fear and impairs extinction in the juvenile rat // *Neurobiology of Learning and Memory*. 2017. (141). C. 179–188.

212. Krueger F. [и др.]. Oxytocin Receptor Genetic Variation Promotes Human Trust Behavior // *Frontiers in Human Neuroscience*. 2012. (6).
213. Kuhl P.K. Early Language Learning and Literacy: Neuroscience Implications for Education // *Mind, Brain, and Education*. 2011. № 3 (5). C. 128–142.
214. Kühn K. [и др.]. The mouse MPTP model: gene expression changes in dopaminergic neurons: Gene expression after MPTP treatment // *European Journal of Neuroscience*. 2003. № 1 (17). C. 1–12.
215. Kumfor F., Piguet O. Disturbance of emotion processing in frontotemporal dementia: a synthesis of cognitive and neuroimaging findings // *Neuropsychology Review*. 2012. № 3 (22). C. 280–297.
216. Lahvis G.P., Alleva E., Scattoni M.L. Translating mouse vocalizations: prosody and frequency modulation1 // *Genes, Brain and Behavior*. 2011. № 1 (10). C. 4–16.
217. Lambert R.C. [и др.]. A rise in the intracellular Ca^{2+} concentration of isolated rat supraoptic cells in response to oxytocin // *The Journal of Physiology*. 1994. (478 (Pt 2)). C. 275–287.
218. Landgraf R., Neumann I.D. Vasopressin and oxytocin release within the brain: a dynamic concept of multiple and variable modes of neuropeptide communication // *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2004. № 3–4 (25). C. 150–176.
219. Lawson S.K., Gray A.C., Woehrle N.S. Effects of oxytocin on serotonin 1B agonist-induced autism-like behavior in mice // *Behavioural Brain Research*. 2016. (314). C. 52–64.
220. Leckman J.F. [и др.]. Primary parental preoccupation: circuits, genes, and the crucial role of the environment // *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*. 2004. № 7 (111). C. 753–771.
221. Lee H., Jang M., Noh J. Oxytocin attenuates aversive response to nicotine and anxiety-like behavior in adolescent rats // *Neuroscience Research*. 2017. (115). C. 29–36.
222. Lee H.C. Physiological functions of cyclic ADP-ribose and NAADP as calcium messengers // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2001. (41). C. 317–345.

223. Lee H.C. Structure and enzymatic functions of human CD38 // Molecular Medicine (Cambridge, Mass.). 2006. № 11–12 (12). C. 317–323.
224. Lee H.C. Cyclic ADP-ribose and NAADP: fraternal twin messengers for calcium signaling // Science China Life Sciences. 2011. № 8 (54). C. 699–711.
225. Lee H.C. The Cyclic ADP-Ribose/NAADP/CD38-Signaling Pathway: Past and Present // Messenger. 2012. № 1 (1). C. 16–33.
226. Lee H.C. Cyclic ADP-ribose and Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate (NAADP) as Messengers for Calcium Mobilization // Journal of Biological Chemistry. 2012. № 38 (287). C. 31633–31640.
227. LeMay L.G., Vander A.J., Kluger M.J. The effects of psychological stress on plasma interleukin-6 activity in rats // Physiology & Behavior. 1990. № 5 (47). C. 957–961.
228. Leng G. [и др.]. 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The posterior pituitary, from Geoffrey Harris to our present understanding // Journal of Endocrinology. 2015. № 2 (226). C. T173–T185.
229. Lerer E. [и др.]. Low CD38 expression in lymphoblastoid cells and haplotypes are both associated with autism in a family-based study // Autism Research. 2010. № 6 (3). C. 293–302.
230. Lim M.M., Bielsky I.F., Young L.J. Neuropeptides and the social brain: potential rodent models of autism // International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience. 2005. № 2–3 (23). C. 235–243.
231. Lim M.M., Young L.J. Neuropeptidergic regulation of affiliative behavior and social bonding in animals // Hormones and Behavior. 2006. № 4 (50). C. 506–517.
232. Lischke A. [и др.]. Oxytocin increases amygdala reactivity to threatening scenes in females // Psychoneuroendocrinology. 2012. № 9 (37). C. 1431–1438.
233. Lister R. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse // Psychopharmacology. 1987. № 2 (92).
234. Liu H.-X. [и др.]. Locomotor activity, ultrasonic vocalization and oxytocin levels in infant CD38 knockout mice // Neuroscience Letters. 2008. № 1 (448). C. 67–70.

235. Liu H.-X. [и др.]. Displays of paternal mouse pup retrieval following communicative interaction with maternal mates // *Nature Communications*. 2013. (4). C. 1346.
236. Liu J. [и др.]. Analysis of genome-wide association study-linked loci in Parkinson's disease of Mainland China: GWAS-Linked PD Loci in Mainland China // *Movement Disorders*. 2013. № 13 (28). C. 1892–1895.
237. Liu L., Duff K. A Technique for Serial Collection of Cerebrospinal Fluid from the Cisterna Magna in Mouse // *Journal of Visualized Experiments*. 2008. № 21.
238. Lkhagvasuren B. [и др.]. Social defeat stress induces hyperthermia through activation of thermoregulatory sympathetic premotor neurons in the medullary raphe region: Sympathetic premotor neurons for stress hyperthermia // *European Journal of Neuroscience*. 2011. № 9 (34). C. 1442–1452.
239. Lo Buono N. [и др.]. The CD157-Integrin Partnership Controls Transendothelial Migration and Adhesion of Human Monocytes // *Journal of Biological Chemistry*. 2011. № 21 (286). C. 18681–18691.
240. Lo Buono N. CD157 at the intersection between leukocyte trafficking and epithelial ovarian cancer invasion // *Frontiers in Bioscience*. 2014. № 2 (19). C. 366.
241. Long N.C. [и др.]. Antiserum against tumor necrosis factor increases stress hyperthermia in rats // *The American Journal of Physiology*. 1990. № 3 Pt 2 (258). C. R591-595.
242. Lopatina O. [и др.]. Oxytocin-induced elevation of ADP-ribosyl cyclase activity, cyclic ADP-ribose or Ca^{2+} concentrations is involved in autoregulation of oxytocin secretion in the hypothalamus and posterior pituitary in male mice // *Neuropharmacology*. 2010. № 1 (58). C. 50–55.
243. Lopatina O. [и др.]. Reproductive experience affects parental retrieval behaviour associated with increased plasma oxytocin levels in wild-type and CD38-knockout mice // *Journal of Neuroendocrinology*. 2011. № 11 (23). C. 1125–1133.
244. Lopatina O. [и др.]. The Roles of Oxytocin and CD38 in Social or Parental Behaviors // *Frontiers in Neuroscience*. 2013. (6).

245. Ludwig M. [и др.]. Intracellular calcium stores regulate activity-dependent neuropeptide release from dendrites // *Nature*. 2002. № 6893 (418). C. 85–89.
246. Ludwig M. [и др.]. Intranasal Application of Vasopressin Fails to Elicit Changes in Brain Immediate Early Gene Expression, Neural Activity and Behavioural Performance of Rats // *Journal of Neuroendocrinology*. 2013. № 7 (25). C. 655–667.
247. Ludwig M., Leng G. Dendritic peptide release and peptide-dependent behaviours // *Nature Reviews Neuroscience*. 2006. № 2 (7). C. 126–136.
248. Ma Y. [и др.]. Opposing Oxytocin Effects on Intergroup Cooperative Behavior in Intuitive and Reflective Minds // *Neuropsychopharmacology*. 2015. № 10 (40). C. 2379–2387.
249. MacDonald K., Feifel D. Oxytocin's role in anxiety: a critical appraisal // *Brain Research*. 2014. (1580). C. 22–56.
250. Macdonald K., Macdonald T.M. The peptide that binds: a systematic review of oxytocin and its prosocial effects in humans // *Harvard Review of Psychiatry*. 2010. № 1 (18). C. 1–21.
251. Malavasi F. [и др.]. CD38 and CD157 as receptors of the immune system: a bridge between innate and adaptive immunity // *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*. 2006. № 11–12 (12). C. 334–341.
252. Malavasi F. [и др.]. Evolution and Function of the ADP Ribosyl Cyclase/CD38 Gene Family in Physiology and Pathology // *Physiological Reviews*. 2008. № 3 (88). C. 841–886.
253. Maroun M., Wagner S. Oxytocin and Memory of Emotional Stimuli: Some Dance to Remember, Some Dance to Forget // *Biological Psychiatry*. 2016. № 3 (79). C. 203–212.
254. Massey S.H., Backes K.A., Schuette S.A. PLASMA OXYTOCIN CONCENTRATION AND DEPRESSIVE SYMPTOMS: A REVIEW OF CURRENT EVIDENCE AND DIRECTIONS FOR FUTURE RESEARCH: Review: Plasma Oxytocin and Depressive Symptoms // *Depression and Anxiety*. 2016. № 4 (33). C. 316–322.

255. Matsumoto Y.K., Okanoya K. Phase-Specific Vocalizations of Male Mice at the Initial Encounter during the Courtship Sequence // PLOS ONE. 2016. № 2 (11). C. e0147102.
256. McCall C., Singer T. The animal and human neuroendocrinology of social cognition, motivation and behavior // Nature Neuroscience. 2012. № 5 (15). C. 681–688.
257. McCarthy M.M. [и др.]. An anxiolytic action of oxytocin is enhanced by estrogen in the mouse // Physiology & Behavior. 1996. № 5 (60). C. 1209–1215.
258. McQuaid R.J. [и др.]. A paradoxical association of an oxytocin receptor gene polymorphism: early-life adversity and vulnerability to depression // Frontiers in Neuroscience. 2013. (7).
259. Megremi A.S.F. Is fever a predictive factor in the autism spectrum disorders? // Medical Hypotheses. 2013. № 4 (80). C. 391–398.
260. Mehler M.F., Purpura D.P. Autism, fever, epigenetics and the locus coeruleus // Brain Research Reviews. 2009. № 2 (59). C. 388–392.
261. Mehta D. [и др.]. Genetic Regulation of Maternal Oxytocin Response and Its Influences on Maternal Behavior // Neural Plasticity. 2016. (2016). C. 5740365.
262. Meyer-Lindenberg A. [и др.]. Oxytocin and vasopressin in the human brain: social neuropeptides for translational medicine // Nature Reviews Neuroscience. 2011. № 9 (12). C. 524–538.
263. Miyake Y. [и др.]. Lack of association between BST1 polymorphisms and sporadic Parkinson's disease in a Japanese population // Journal of the Neurological Sciences. 2012. № 1–2 (323). C. 162–166.
264. Modi M.E., Young L.J. The oxytocin system in drug discovery for autism: Animal models and novel therapeutic strategies // Hormones and Behavior. 2012. № 3 (61). C. 340–350.
265. Modney B., Hatton G. Maternal behaviors: evidence that they feed back to alter brain morphology and function // Acta Paediatrica. 1994. № s397 (83). C. 29–32.
266. Moos F. [и др.]. Release of oxytocin and vasopressin by magnocellular nuclei in vitro: specific facilitatory effect of oxytocin on its own release // The Journal of Endocrinology. 1984. № 1 (102). C. 63–72.

267. Moos F. [и др.]. Release of oxytocin within the supraoptic nucleus during the milk ejection reflex in rats // Experimental Brain Research. 1989. № 3 (76). C. 593–602.
268. Morgan A.J., Galione A. NAADP induced Ca^{2+} release: two-pore or not two-pore? // Messenger. 2013. № 2 (2). C. 108–112.
269. Morone S. [и др.]. Overexpression of CD157 Contributes to Epithelial Ovarian Cancer Progression by Promoting Mesenchymal Differentiation // PLoS ONE. 2012. № 8 (7). C. e43649.
270. Morone S. [и др.]. Binding of CD157 Protein to Fibronectin Regulates Cell Adhesion and Spreading // Journal of Biological Chemistry. 2014. № 22 (289). C. 15588–15601.
271. Mosienko V. [и др.]. Reduced isolation-induced pup ultrasonic communication in mouse pups lacking brain serotonin // Molecular Autism. 2015. № 1 (6).
272. Mouchiroud L., Houtkooper R.H., Auwerx J. NAD^+ metabolism: a therapeutic target for age-related metabolic disease // Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. 2013. № 4 (48). C. 397–408.
273. Munesue T. [и др.]. Two genetic variants of CD38 in subjects with autism spectrum disorder and controls // Neuroscience Research. 2010. № 2 (67). C. 181–191.
274. Munesue T. [и др.]. Oxytocin for Male Subjects with Autism Spectrum Disorder and Comorbid Intellectual Disabilities: A Randomized Pilot Study // Frontiers in Psychiatry. 2016. (7).
275. Muraoka O. [и др.]. Genomic structure of human BST-1 // Immunology Letters. 1996. № 1 (54). C. 1–4.
276. Mushtaq M., Nam T.-S., Kim U.-H. Critical Role for CD38-mediated Ca^{2+} Signaling in Thrombin-induced Procoagulant Activity of Mouse Platelets and Hemostasis // Journal of Biological Chemistry. 2011. № 15 (286). C. 12952–12958.
277. Mychasiuk R., Rho J.M. Genetic modifications associated with ketogenic diet treatment in the BTBR $^{\text{T+Tf/J}}$ mouse model of autism spectrum disorder: Genetic modifications associated with ketogenic diet treatment // Autism Research. 2016.

278. Myers A.J. [и др.]. Variation in the oxytocin receptor gene is associated with increased risk for anxiety, stress and depression in individuals with a history of exposure to early life stress // *Journal of Psychiatric Research*. 2014. (59). C. 93–100.
279. Nagamine K. [и др.]. Molecular cloning of a novel putative Ca²⁺ channel protein (TRPC7) highly expressed in brain // *Genomics*. 1998. № 1 (54). C. 124–131.
280. Nagamine K. [и др.]. Molecular cloning of a novel putative Ca²⁺ channel protein (TRPC7) highly expressed in brain // *Genomics*. 1998. № 1 (54). C. 124–131.
281. Naviaux J.C. [и др.]. Reversal of autism-like behaviors and metabolism in adult mice with single-dose antipurinergic therapy // *Translational Psychiatry*. 2014. № 6 (4). C. e400.
282. Naviaux J.C. [и др.]. Antipurinergic therapy corrects the autism-like features in the Fragile X (Fmr1 knockout) mouse model // *Molecular Autism*. 2015. (6). C. 1.
283. Nawijn L. [и др.]. Intranasal oxytocin enhances neural processing of monetary reward and loss in post-traumatic stress disorder and traumatized controls // *Psychoneuroendocrinology*. 2016. (66). C. 228–237.
284. Neumann I. [и др.]. Oxytocin released within the supraoptic nucleus of the rat brain by positive feedback action is involved in parturition-related events // *Journal of Neuroendocrinology*. 1996. № 3 (8). C. 227–233.
285. Neumann I.D. Oxytocin: the neuropeptide of love reveals some of its secrets // *Cell Metabolism*. 2007. № 4 (5). C. 231–233.
286. Neumann I.D. Brain oxytocin: a key regulator of emotional and social behaviours in both females and males // *Journal of Neuroendocrinology*. 2008. № 6 (20). C. 858–865.
287. Neumann I.D. [и др.]. Increased brain and plasma oxytocin after nasal and peripheral administration in rats and mice // *Psychoneuroendocrinology*. 2013. № 10 (38). C. 1985–1993.
288. Neumann I.D., Landgraf R. Balance of brain oxytocin and vasopressin: implications for anxiety, depression, and social behaviors // *Trends in Neurosciences*. 2012. № 11 (35). C. 649–659.

289. Neumann I.D., Slattery D.A. Oxytocin in General Anxiety and Social Fear: A Translational Approach // *Biological Psychiatry*. 2016. № 3 (79). C. 213–221.
290. Neunuebel J.P. [и др.]. Female mice ultrasonically interact with males during courtship displays // *eLife*. 2015. (4).
291. Nirenberg M. [и др.]. Modulation of synapse formation by cyclic adenosine monophosphate // *Science (New York, N.Y.)*. 1983. № 4625 (222). C. 794–799.
292. Nobrega C. [и др.]. T Cells Home to the Thymus and Control Infection // *The Journal of Immunology*. 2013. № 4 (190). C. 1646–1658.
293. Norman G.J. [и др.]. Selective influences of oxytocin on the evaluative processing of social stimuli // *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*. 2011. № 10 (25). C. 1313–1319.
294. Noyce A.J. [и др.]. Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease // *Annals of Neurology*. 2012. № 6 (72). C. 893–901.
295. Numan M., Young L.J. Neural mechanisms of mother–infant bonding and pair bonding: Similarities, differences, and broader implications // *Hormones and Behavior*. 2016. (77). C. 98–112.
296. Oka T. [и др.]. Characteristics of thermoregulatory and febrile responses in mice deficient in prostaglandin EP1 and EP3 receptors // *The Journal of Physiology*. 2003. № 3 (551). C. 945–954.
297. Okabe S. [и др.]. The effects of social experience and gonadal hormones on retrieving behavior of mice and their responses to pup ultrasonic vocalizations // *Zoological Science*. 2010. № 10 (27). C. 790–795.
298. Okamoto H., Takasawa S., Sugawara A. The CD38-Cyclic ADP-Ribose System in Mammals: Historical Background, Pathophysiology and Perspective // *Messenger*. 2014. № 1 (3). C. 27–34.
299. Okamoto Y. [и др.]. The Potential of Nasal Oxytocin Administration for Remediation of Autism Spectrum Disorders // *CNS & neurological disorders drug targets*. 2016. № 5 (15). C. 564–577.

300. Okuyama Y. [и др.]. Human BST-1 Expressed on Myeloid Cells Functions as a Receptor Molecule // Biochemical and Biophysical Research Communications. 1996. № 3 (228). C. 838–845.
301. Olazábal D.E., Young L.J. Oxytocin receptors in the nucleus accumbens facilitate «spontaneous» maternal behavior in adult female prairie voles // Neuroscience. 2006. № 2 (141). C. 559–568.
302. Ortolan E. [и др.]. CD157, the Janus of CD38 but with a unique personality // Cell Biochemistry and Function. 2002. № 4 (20). C. 309–322.
303. Parker K.J. [и др.]. Preliminary evidence that plasma oxytocin levels are elevated in major depression // Psychiatry Research. 2010. № 2 (178). C. 359–362.
304. Pawluski J.L., Walker S.K., Galea L.A.M. Reproductive experience differentially affects spatial reference and working memory performance in the mother // Hormones and Behavior. 2006. № 2 (49). C. 143–149.
305. Pedersen C.A. [и др.]. Oxytocin induces maternal behavior in virgin female rats // Science (New York, N.Y.). 1982. № 4546 (216). C. 648–650.
306. Pedersen C.A., Boccia M.L. Oxytocin antagonism alters rat dams' oral grooming and upright posturing over pups // Physiology & Behavior. 2003. № 2–3 (80). C. 233–241.
307. Penagarikano O. [и др.]. Exogenous and evoked oxytocin restores social behavior in the Cntnap2 mouse model of autism // Science Translational Medicine. 2015. № 271 (7). C. 271ra8-271ra8.
308. Perraud A.L. [и др.]. ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology // Nature. 2001. № 6837 (411). C. 595–599.
309. Podesta M. [и др.]. Concentrative Uptake of Cyclic ADP-ribose Generated by BST-1+ Stroma Stimulates Proliferation of Human Hematopoietic Progenitors // Journal of Biological Chemistry. 2005. № 7 (280). C. 5343–5349.
310. Porsolt R.D., Bertin A., Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants // Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Therapie. 1977. № 2 (229). C. 327–336.

311. Prediger R.D.S. [и др.]. Anxiety in Parkinson's disease: A critical review of experimental and clinical studies // *Neuropharmacology*. 2012. № 1 (62). C. 115–124.
312. Quarona V. [и др.]. CD38 and CD157: A long journey from activation markers to multifunctional molecules: CD38 and CD157 // *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. 2013. № 4 (84B). C. 207–217.
313. Quirin M., Kuhl J., Düsing R. Oxytocin buffers cortisol responses to stress in individuals with impaired emotion regulation abilities // *Psychoneuroendocrinology*. 2011. № 6 (36). C. 898–904.
314. Rah S.-Y. [и др.]. Activation of CD38 by interleukin-8 signaling regulates intracellular Ca²⁺ level and motility of lymphokine-activated killer cells // *The Journal of Biological Chemistry*. 2005. № 4 (280). C. 2888–2895.
315. Rah S.-Y. [и др.]. Generation of cyclic ADP-ribose and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate by CD38 for Ca²⁺ signaling in interleukin-8-treated lymphokine-activated killer cells // *The Journal of Biological Chemistry*. 2010. № 28 (285). C. 21877–21887.
316. Rane P. [и др.]. The histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, alleviates cognitive deficits in pre-motor stage PD // *Neuropharmacology*. 2012. № 7 (62). C. 2409–2412.
317. Rasmussen S. [и др.]. Cage change influences serum corticosterone and anxiety-like behaviors in the mouse // *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*. 2011. № 4 (50). C. 479–483.
318. Reis B.L. [и др.]. Longitudinal changes in the mineral composition of mouse milk and the relationship to zinc metabolism of the suckling neonate // *The Journal of Nutrition*. 1991. № 5 (121). C. 687–699.
319. Richard I.H. Anxiety disorders in Parkinson's disease // *Advances in Neurology*. 2005. (96). C. 42–55.
320. Richard P., Moos F., Freund-Mercier M.J. Central effects of oxytocin // *Physiological Reviews*. 1991. № 2 (71). C. 331–370.

321. Riebold M. [и др.]. All-trans retinoic acid upregulates reduced CD38 transcription in lymphoblastoid cell lines from Autism spectrum disorder // *Molecular Medicine* (Cambridge, Mass.). 2011. № 7–8 (17). C. 799–806.
322. Rilling J.K., Young L.J. The biology of mammalian parenting and its effect on offspring social development // *Science*. 2014. № 6198 (345). C. 771–776.
323. Rimoldi V. [и др.]. Oxytocin receptor elicits different EGFR/MAPK activation patterns depending on its localization in caveolin-1 enriched domains // *Oncogene*. 2003. № 38 (22). C. 6054–6060.
324. Ring R.H. [и др.]. Anxiolytic-like activity of oxytocin in male mice: behavioral and autonomic evidence, therapeutic implications // *Psychopharmacology*. 2006. № 2 (185). C. 218–225.
325. Romano E. [и др.]. Characterization of Neonatal Vocal and Motor Repertoire of Reelin Mutant Mice // *PLoS ONE*. 2013. № 5 (8). C. e64407.
326. Ross H.E. [и др.]. Characterization of the oxytocin system regulating affiliative behavior in female prairie voles // *Neuroscience*. 2009. № 4 (162). C. 892–903.
327. Roy S., Watkins N., Heck D. Comprehensive Analysis of Ultrasonic Vocalizations in a Mouse Model of Fragile X Syndrome Reveals Limited, Call Type Specific Deficits // *PLoS ONE*. 2012. № 9 (7). C. e44816.
328. Saad M. [и др.]. Genome-wide association study confirms BST1 and suggests a locus on 12q24 as the risk loci for Parkinson’s disease in the European population // *Human Molecular Genetics*. 2011. № 3 (20). C. 615–627.
329. Salio C. [и др.]. Neuropeptides as synaptic transmitters // *Cell and Tissue Research*. 2006. № 2 (326). C. 583–598.
330. Salmina A.B. [и др.]. CD38/Cyclic ADP-ribose System: A New Player for Oxytocin Secretion and Regulation of Social Behaviour // *Journal of Neuroendocrinology*. 2010. № 5 (22). C. 380–392.
331. Sano Y. [и др.]. Immunocyte Ca²⁺ influx system mediated by LTRPC2 // *Science* (New York, N.Y.). 2001. № 5533 (293). C. 1327–1330.

332. Satake W. [и др.]. Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease // *Nature Genetics*. 2009. № 12 (41). C. 1303–1307.
333. Savaskan E. [и др.]. Post-learning intranasal oxytocin modulates human memory for facial identity // *Psychoneuroendocrinology*. 2008. № 3 (33). C. 368–374.
334. Scattoni M.L. [и др.]. Unusual Repertoire of Vocalizations in the BTBR T+tf/J Mouse Model of Autism // *PLoS ONE*. 2008. № 8 (3). C. e3067.
335. Scattoni M.L., Crawley J., Ricceri L. Ultrasonic vocalizations: A tool for behavioural phenotyping of mouse models of neurodevelopmental disorders // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2009. № 4 (33). C. 508–515.
336. Schmid F. [и др.]. CD38: A NAADP degrading enzyme // *FEBS Letters*. 2011. № 22 (585). C. 3544–3548.
337. Schrag A., Leentjens A.F. Parkinson disease: Scales to detect depression in Parkinson disease // *Nature Reviews Neurology*. 2012. № 7 (8). C. 359–360.
338. Shamay-Tsoory S.G. [и др.]. Intranasal administration of oxytocin increases envy and schadenfreude (gloating) // *Biological Psychiatry*. 2009. № 9 (66). C. 864–870.
339. Sharma M. [и др.]. Large-scale replication and heterogeneity in Parkinson disease genetic loci // *Neurology*. 2012. № 7 (79). C. 659–667.
340. Shawl A.I. [и др.]. Involvement of actin filament in the generation of Ca^{2+} mobilizing messengers in glucose-induced Ca^{2+} signaling in pancreatic β -cells // *Islets*. 2012. № 2 (4). C. 145–151.
341. Shen M.D. [и др.]. Functional Connectivity of the Amygdala Is Disrupted in Preschool-Aged Children With Autism Spectrum Disorder // *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*. 2016. № 9 (55). C. 817–824.
342. Shepard K.N., Liu R.C. Experience restores innate female preference for male ultrasonic vocalizations // *Genes, Brain and Behavior*. 2011. № 1 (10). C. 28–34.
343. Shimaoka Y. [и др.]. Nurse-like cells from bone marrow and synovium of patients with rheumatoid arthritis promote survival and enhance function of human B cells. // *Journal of Clinical Investigation*. 1998. № 3 (102). C. 606–618.

344. Shu W. [и др.]. Altered ultrasonic vocalization in mice with a disruption in the Foxp2 gene // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2005. № 27 (102). C. 9643–9648.
345. Silverman J.L. [и др.]. Influence of stimulant-induced hyperactivity on social approach in the BTBR mouse model of autism // Neuropharmacology. 2013. (68). C. 210–222.
346. Simón-Sánchez J. [и др.]. Genome-wide association study confirms extant PD risk loci among the Dutch // European Journal of Human Genetics. 2011. № 6 (19). C. 655–661.
347. Singer R. [и др.]. Hyperthermia induced by open-field stress is blocked by salicylate // Physiology & Behavior. 1986. № 6 (36). C. 1179–1182.
348. Skuse D.H., Gallagher L. Genetic influences on social cognition // Pediatric Research. 2011. № 5 Pt 2 (69). C. 85R–91R.
349. Smearman E.L. [и др.]. Oxytocin Receptor Genetic and Epigenetic Variations: Association With Child Abuse and Adult Psychiatric Symptoms // Child Development. 2016. № 1 (87). C. 122–134.
350. Stamatakis A. [и др.]. Rat dams exposed repeatedly to a daily brief separation from the pups exhibit increased maternal behavior, decreased anxiety and altered levels of receptors for estrogens (ER α , ER β), oxytocin and serotonin (5-HT1A) in their brain // Psychoneuroendocrinology. 2015. (52). C. 212–228.
351. Starkstein S.E. [и др.]. Anxiety Has Specific Syndromal Profiles in Parkinson Disease: A Data-Driven Approach // The American Journal of Geriatric Psychiatry. 2014. № 12 (22). C. 1410–1417.
352. Steele A.D. [и др.]. The power of automated high-resolution behavior analysis revealed by its application to mouse models of Huntington's and prion diseases // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007. № 6 (104). C. 1983–1988.
353. Sternfeld L. [и др.]. Hormonal control of ADP-ribosyl cyclase activity in pancreatic acinar cells from rats // The Journal of Biological Chemistry. 2003. № 36 (278). C. 33629–33636.

354. Steru L. [и др.]. The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice // *Psychopharmacology*. 1985. № 3 (85). C. 367–370.
355. Storch A. [и др.]. Nonmotor fluctuations in Parkinson disease: Severity and correlation with motor complications // *Neurology*. 2013. № 9 (80). C. 800–809.
356. Strauss G.P. [и др.]. Plasma oxytocin levels predict social cue recognition in individuals with schizophrenia // *Schizophrenia Research*. 2015. № 1–3 (162). C. 47–51.
357. Striepens N. [и др.]. Prosocial effects of oxytocin and clinical evidence for its therapeutic potential // *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2011. № 4 (32). C. 426–450.
358. Sue Carter C. NEUROENDOCRINE PERSPECTIVES ON SOCIAL ATTACHMENT AND LOVE // *Psychoneuroendocrinology*. 1998. № 8 (23). C. 779–818.
359. Sumoza-Toledo A., Penner R. TRPM2: a multifunctional ion channel for calcium signalling: The TRPM2 ion channel for calcium signalling // *The Journal of Physiology*. 2011. № 7 (589). C. 1515–1525.
360. Sungur A.Ö., Schwarting R.K.W., Wöhr M. Early communication deficits in the *Shank1* knockout mouse model for autism spectrum disorder: Developmental aspects and effects of social context: Communication deficits in mice lacking *Shank1* // *Autism Research*. 2016. № 6 (9). C. 696–709.
361. Surdhar I. [и др.]. Intact limbic-prefrontal connections and reduced amygdala volumes in Parkinson's disease with mild depressive symptoms // *Parkinsonism & Related Disorders*. 2012. № 7 (18). C. 809–813.
362. Tachibana M. [и др.]. Long-Term Administration of Intranasal Oxytocin Is a Safe and Promising Therapy for Early Adolescent Boys with Autism Spectrum Disorders // *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology*. 2013. № 2 (23). C. 123–127.
363. Tadaiesky M.T. [и др.]. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease // *Neuroscience*. 2008. № 4 (156). C. 830–840.
364. Takano K. [и др.]. Methoxyflavones protect cells against endoplasmic reticulum stress and neurotoxin // *AJP: Cell Physiology*. 2006. № 1 (292). C. C353–C361.

365. Takayanagi Y. [и др.]. Pervasive social deficits, but normal parturition, in oxytocin receptor-deficient mice // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005. № 44 (102). C. 16096–16101.
366. Tan E.-K. [и др.]. Analysis of GWAS-linked loci in Parkinson disease reaffirms PARK16 as a susceptibility locus // Neurology. 2010. № 6 (75). C. 508–512.
367. Tao R. [и др.]. Cyclic ADP ribose is a novel regulator of intracellular Ca²⁺ oscillations in human bone marrow mesenchymal stem cells // Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2011. № 12 (15). C. 2684–2696.
368. Taylor S.E. [и др.]. Relation of oxytocin to psychological stress responses and hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis activity in older women // Psychosomatic Medicine. 2006. № 2 (68). C. 238–245.
369. Teng B.L. [и др.]. Reversal of social deficits by subchronic oxytocin in two autism mouse models // Neuropharmacology. 2016. (105). C. 61–71.
370. Togashi K. [и др.]. TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion // The EMBO journal. 2006. № 9 (25). C. 1804–1815.
371. Togashi K., Inada H., Tominaga M. Inhibition of the transient receptor potential cation channel TRPM2 by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) // British Journal of Pharmacology. 2008. № 6 (153). C. 1324–1330.
372. Tominaga M., Caterina M.J. Thermosensation and pain // Journal of Neurobiology. 2004. № 1 (61). C. 3–12.
373. Uchida K. [и др.]. Lack of TRPM2 Impaired Insulin Secretion and Glucose Metabolisms in Mice // Diabetes. 2011. № 1 (60). C. 119–126.
374. Uemura T. [и др.]. Characterization of human and mouse TRPM2 genes: identification of a novel N-terminal truncated protein specifically expressed in human striatum // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2005. № 4 (328). C. 1232–1243.
375. Veenema A.H., Neumann I.D. Central vasopressin and oxytocin release: regulation of complex social behaviours // Progress in Brain Research. 2008. (170). C. 261–276.

376. Verderio C. [и др.]. Evidence of a role for cyclic ADP-ribose in calcium signalling and neurotransmitter release in cultured astrocytes // *Journal of Neurochemistry*. 2001. № 3 (78). C. 646–657.
377. Viero C. [и др.]. REVIEW: Oxytocin: Crossing the Bridge between Basic Science and Pharmacotherapy: From Neuropeptide to Happiness Chemical // *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 2010. № 5 (16). C. e138–e156.
378. Vinkers C.H. [и др.]. Translational aspects of pharmacological research into anxiety disorders: The stress-induced hyperthermia (SIH) paradigm // *European Journal of Pharmacology*. 2008. № 2–3 (585). C. 407–425.
379. Viviani D. [и др.]. Oxytocin selectively gates fear responses through distinct outputs from the central amygdala // *Science (New York, N.Y.)*. 2011. № 6038 (333). C. 104–107.
380. Walseth T.F., Lee H.C. Synthesis and characterization of antagonists of cyclic-ADP-ribose-induced Ca^{2+} release // *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1993. № 3 (1178). C. 235–242.
381. Wang C. [и др.]. Penetrance of LRRK2 G2385R and R1628P is modified by common PD-associated genetic variants // *Parkinsonism & Related Disorders*. 2012. № 8 (18). C. 958–963.
382. Wang F., Kessels H.W., Hu H. The mouse that roared: neural mechanisms of social hierarchy // *Trends in Neurosciences*. 2014. № 11 (37). C. 674–682.
383. Watanabe N. [и др.]. Mirtazapine versus other antidepressive agents for depression под ред. The Cochrane Collaboration, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2011.
384. Watanabe T. [и др.]. Mitigation of Sociocommunicational Deficits of Autism Through Oxytocin-Induced Recovery of Medial Prefrontal Activity: A Randomized Trial // *JAMA Psychiatry*. 2014. № 2 (71). C. 166.
385. Watanabe T. [и др.]. Clinical and neural effects of six-week administration of oxytocin on core symptoms of autism // *Brain*. 2015. № 11 (138). C. 3400–3412.
386. Wattendorf E. [и др.]. Olfactory Impairment Predicts Brain Atrophy in Parkinson's Disease // *Journal of Neuroscience*. 2009. № 49 (29). C. 15410–15413.

387. Wei H. [и др.]. Reduced Glutamate Release in Adult BTBR Mouse Model of Autism Spectrum Disorder // *Neurochemical Research*. 2016.
388. Westberg L. [и др.]. Variation in the Oxytocin Receptor Gene Is Associated with Face Recognition and its Neural Correlates // *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2016. (10). C. 178.
389. Whalen P.J. [и др.]. Human amygdala responsivity to masked fearful eye whites // *Science (New York, N.Y.)*. 2004. № 5704 (306). C. 2061.
390. Whyte A. [и др.]. Serotonin transporter and integrin beta 3 genes interact to modulate serotonin uptake in mouse brain // *Neurochemistry International*. 2014. (73). C. 122–126.
391. Wilkinson J.A. [и др.]. H₂O 2-stimulated Ca²⁺ influx via TRPM2 is not the sole determinant of subsequent cell death // *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*. 2008. № 6 (455). C. 1141–1151.
392. Williams J.R. [и др.]. Oxytocin administered centrally facilitates formation of a partner preference in female prairie voles (*Microtus ochrogaster*) // *Journal of Neuroendocrinology*. 1994. № 3 (6). C. 247–250.
393. Winslow J.T. [и др.]. Infant Vocalization, Adult Aggression, and Fear Behavior of an Oxytocin Null Mutant Mouse // *Hormones and Behavior*. 2000. № 2 (37). C. 145–155.
394. Winslow J.T., Insel T.R. The social deficits of the oxytocin knockout mouse // *Neuropeptides*. 2002. № 2–3 (36). C. 221–229.
395. Winslow J.T., Insel T.R. Neuroendocrine basis of social recognition // *Current Opinion in Neurobiology*. 2004. № 2 (14). C. 248–253.
396. Wöhr M. [и др.]. Communication Impairments in Mice Lacking Shank1: Reduced Levels of Ultrasonic Vocalizations and Scent Marking Behavior // *PLoS ONE*. 2011. № 6 (6). C. e20631.
397. Wöhr M. Ultrasonic vocalizations in Shank mouse models for autism spectrum disorders: Detailed spectrographic analyses and developmental profiles // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2014. (43). C. 199–212.

398. Wöhr M. Effect of social odor context on the emission of isolation-induced ultrasonic vocalizations in the BTBR T+tf/J mouse model for autism // *Frontiers in Neuroscience*. 2015. (9).
399. Wöhr M., Schwarting R.K.W. Ultrasonic Communication in Rats: Can Playback of 50-kHz Calls Induce Approach Behavior? // *PLoS ONE*. 2007. № 12 (2). C. e1365.
400. Wu N., Li Z., Su Y. The association between oxytocin receptor gene polymorphism (OXTR) and trait empathy // *Journal of Affective Disorders*. 2012. № 3 (138). C. 468–472.
401. Wu T.-J. [и др.]. Tracking the engraftment and regenerative capabilities of transplanted lung stem cells using fluorescent nanodiamonds // *Nature Nanotechnology*. 2013. № 9 (8). C. 682–689.
402. Yamamoto-Katayama S. [и др.]. Crystallographic studies on human BST-1/CD157 with ADP-ribosyl cyclase and NAD glycohydrolase activities // *Journal of Molecular Biology*. 2002. № 3 (316). C. 711–723.
403. Yamasue H. Promising evidence and remaining issues regarding the clinical application of oxytocin in autism spectrum disorders: Oxytocin in treatment of autism // *Psychiatry and Clinical Neurosciences*. 2016. № 2 (70). C. 89–99.
404. Yatawara C.J. [и др.]. The effect of oxytocin nasal spray on social interaction deficits observed in young children with autism: a randomized clinical crossover trial // *Molecular Psychiatry*. 2016. № 9 (21). C. 1225–1231.
405. Yilmaz Ö.H. [и др.]. mTORC1 in the Paneth cell niche couples intestinal stem-cell function to calorie intake // *Nature*. 2012.
406. Yirmiya R. Effects of Antidepressant Drugs on the Behavioral and Physiological Responses to Lipopolysaccharide (LPS) in Rodents // *Neuropsychopharmacology*. 2001. № 5 (24). C. 531–544.
407. Yirmiya R. [и др.]. Effects of antidepressant drugs on the behavioral and physiological responses to lipopolysaccharide (LPS) in rodents // *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2001. № 5 (24). C. 531–544.

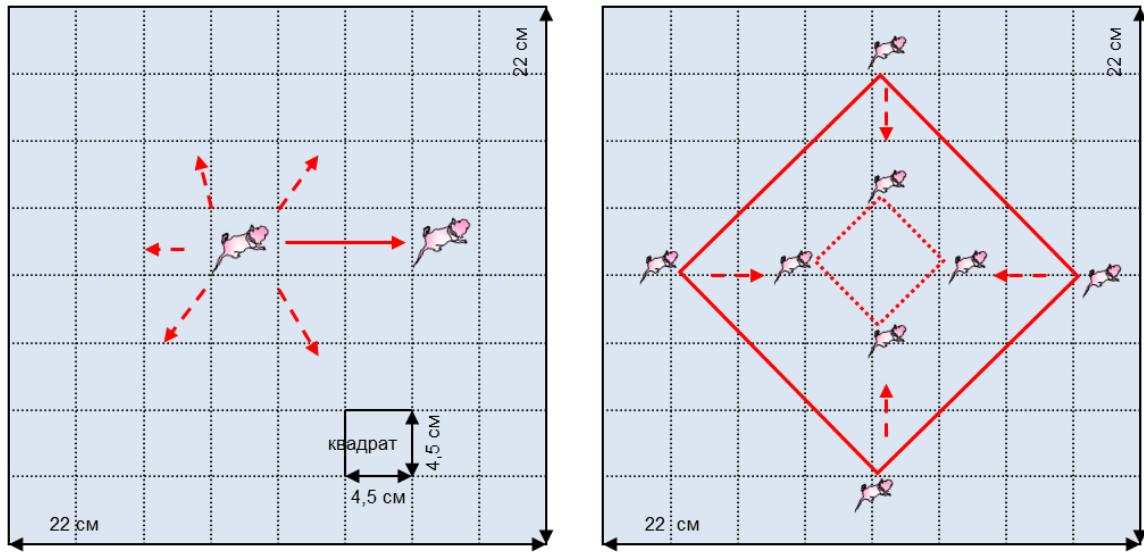
408. Yokoyama S. [и др.]. Association Study between the CD157/BST1 Gene and Autism Spectrum Disorders in a Japanese Population // *Brain Sciences*. 2015. № 2 (5). C. 188–200.
409. Yoshihara T. [и др.]. Learning/Memory Impairment and Reduced Expression of the HNK-1 Carbohydrate in 4-Galactosyltransferase-II-deficient Mice // *Journal of Biological Chemistry*. 2009. № 18 (284). C. 12550–12561.
410. Young L.J. [и др.]. Cellular mechanisms of social attachment // *Hormones and Behavior*. 2001. № 2 (40). C. 133–138.
411. Young L.J., Barrett C.E. Can oxytocin treat autism? // *Science*. 2015. № 6224 (347). C. 825–826.
412. Young W.S., Gainer H. Transgenesis and the study of expression, cellular targeting and function of oxytocin, vasopressin and their receptors // *Neuroendocrinology*. 2003. № 4 (78). C. 185–203.
413. Zak P.J., Stanton A.A., Ahmadi S. Oxytocin Increases Generosity in Humans // *PLoS ONE*. 2007. № 11 (2). C. e1128.
414. Zampieri B.L. [и др.]. Ultrasonic vocalizations during male–female interaction in the mouse model of Down syndrome Ts65Dn // *Physiology & Behavior*. 2014. (128). C. 119–125.
415. Zhang J.-B. [и др.]. Oxytocin is implicated in social memory deficits induced by early sensory deprivation in mice // *Molecular Brain*. 2016. № 1 (9). C. 98.
416. Zhang R. [и др.]. Transcutaneous electrical acupoint stimulation in children with autism and its impact on plasma levels of arginine-vasopressin and oxytocin: A prospective single-blinded controlled study // *Research in Developmental Disabilities*. 2012. № 4 (33). C. 1136–1146.
417. Zheng Z. [и др.]. Brief Report: Evaluation of an Intelligent Learning Environment for Young Children with Autism Spectrum Disorder // *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 2016.
418. Zhong J. [и др.]. Cyclic ADP-Ribose and Heat Regulate Oxytocin Release via CD38 and TRPM2 in the Hypothalamus during Social or Psychological Stress in Mice // *Frontiers in Neuroscience*. 2016. (10). C. 304.

419. Zhu L. [и др.]. Lack of association between three single nucleotide polymorphisms in the PARK9, PARK15, and BST1 genes and Parkinson's disease in the northern Han Chinese population // Chinese Medical Journal. 2012. № 4 (125). C. 588–592.
420. Zik J.B., Roberts D.L. The many faces of oxytocin: Implications for psychiatry // Psychiatry Research. 2015. № 1 (226). C. 31–37.
421. Zimprich A. Genetics of Parkinson's disease and essential tremor: // Current Opinion in Neurology. 2011. № 4 (24). C. 318–323.
422. Zinchuk V., Zinchuk O., Okada T. Quantitative Colocalization Analysis of Multicolor Confocal Immunofluorescence Microscopy Images: Pushing Pixels to Explore Biological Phenomena // ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA. 2007. № 4 (40). C. 101–111.
423. Zippelius H.-M., Schleidt W.M. Ultraschall-Laute bei jungen Musen // Die Naturwissenschaften. 1956. № 21 (43). C. 502–502.

ПРИЛОЖЕНИЯ

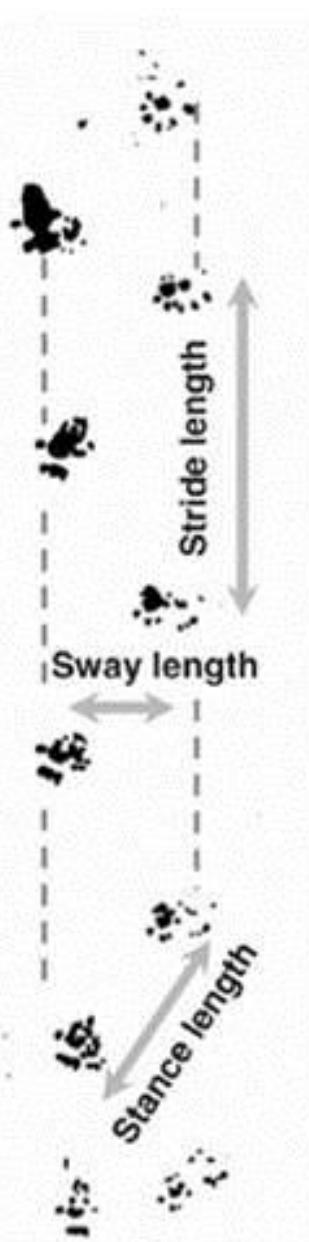
Приложение А.....	265
Приложение Б.....	266
Приложение В.....	267
Приложение Г.....	268
Приложение Д.....	269
Приложение Е.....	270
Приложение Ж.....	271
Приложение З.....	272
Приложение И.....	273
Приложение К.....	274
Приложение Л.....	275
Приложение М.....	276
Приложение Н.....	277

Приложение А



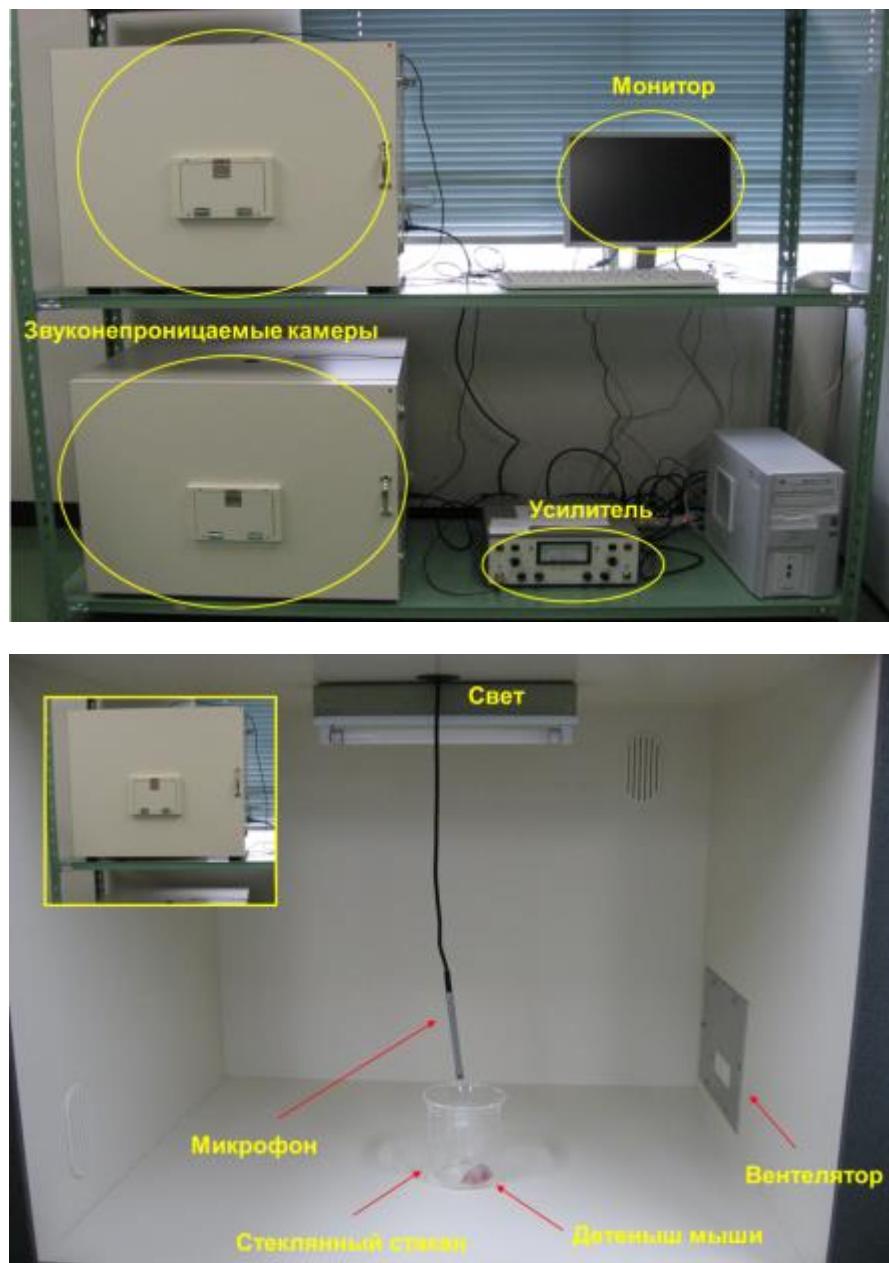
Схемы экспериментов для определения индивидуальной и групповой активности для детенышней мышей. Левая панель - схема эксперимента по определению индивидуальной локомоторной активности. Размер арены – 22x22 см. Размер регистрируемых пересеченных квадратов 4,5x4,5 см. **Правая панель** - схема эксперимента по определению групповой локомоторной активности. Размер арены – 22x22 см.

Приложение Б



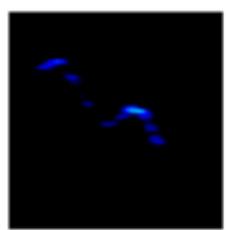
Параметры, измеряемые в тесте «отпечатки лап», с обозначением пунктирными линиями, представляющими направление прогрессирования ходьбы. Stride length – длина шага, stance length – длина фазы опоры, sway length – длина раскачивания шага.

Приложение В

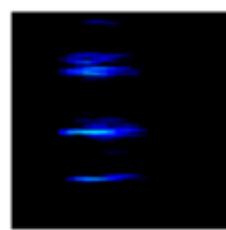


Прибор для регистрации ультразвуковой вокализации у грызунов.
Верхняя панель – комплектация прибора: две звуконепроницаемые камеры, усилитель и монитор. **Нижняя панель** - вид звуконепроницаемой камеры изнутри в процессе регистрации ультразвуковой вокализации у детенышей мыши в условиях социальной изоляции (изоляции от матери).

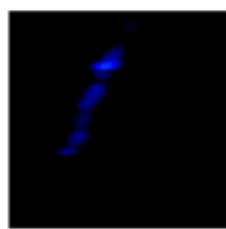
Приложение Г



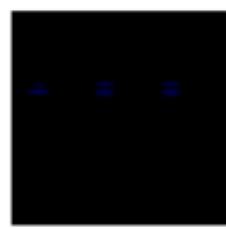
Complex



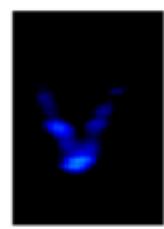
Harmonic



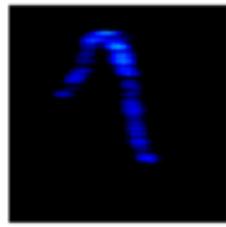
Upward



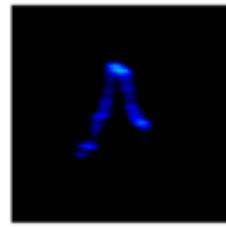
Plate



"V"-call



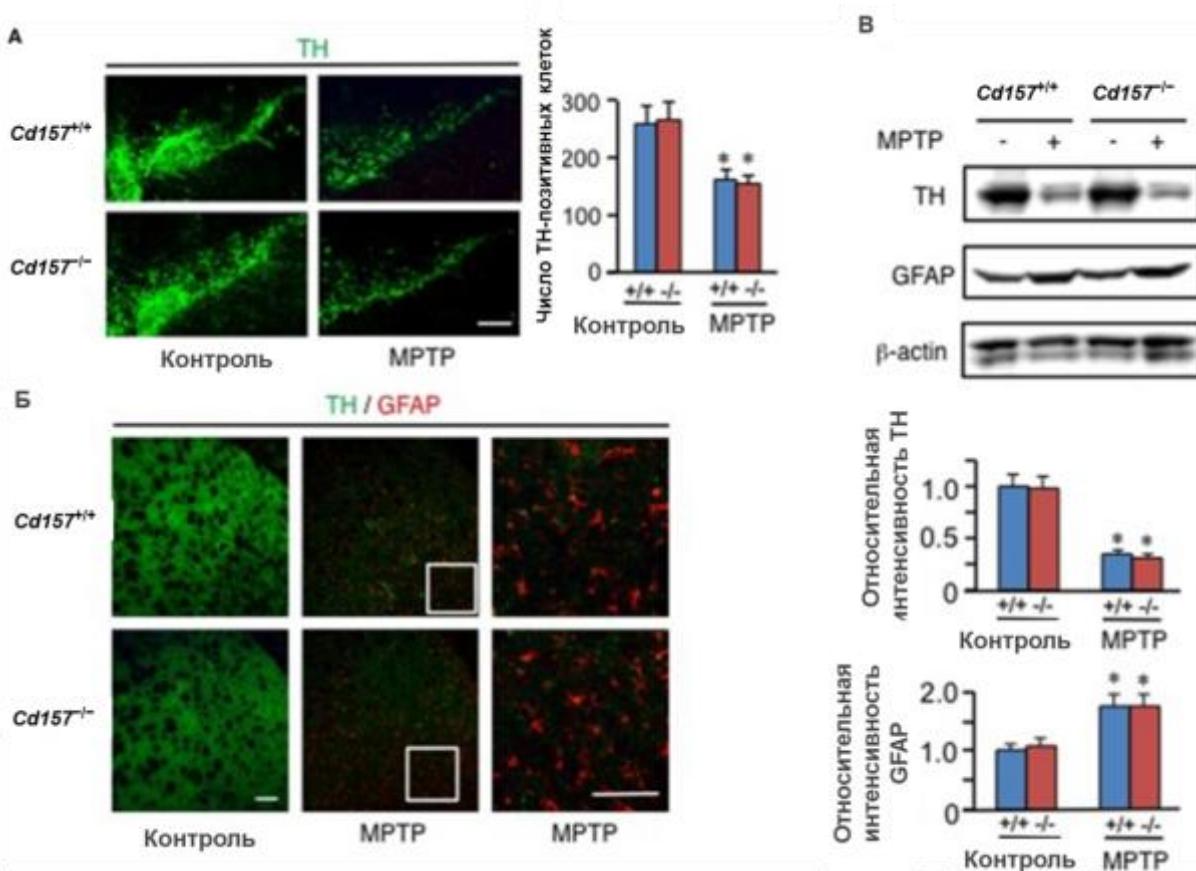
Downward



Chevron

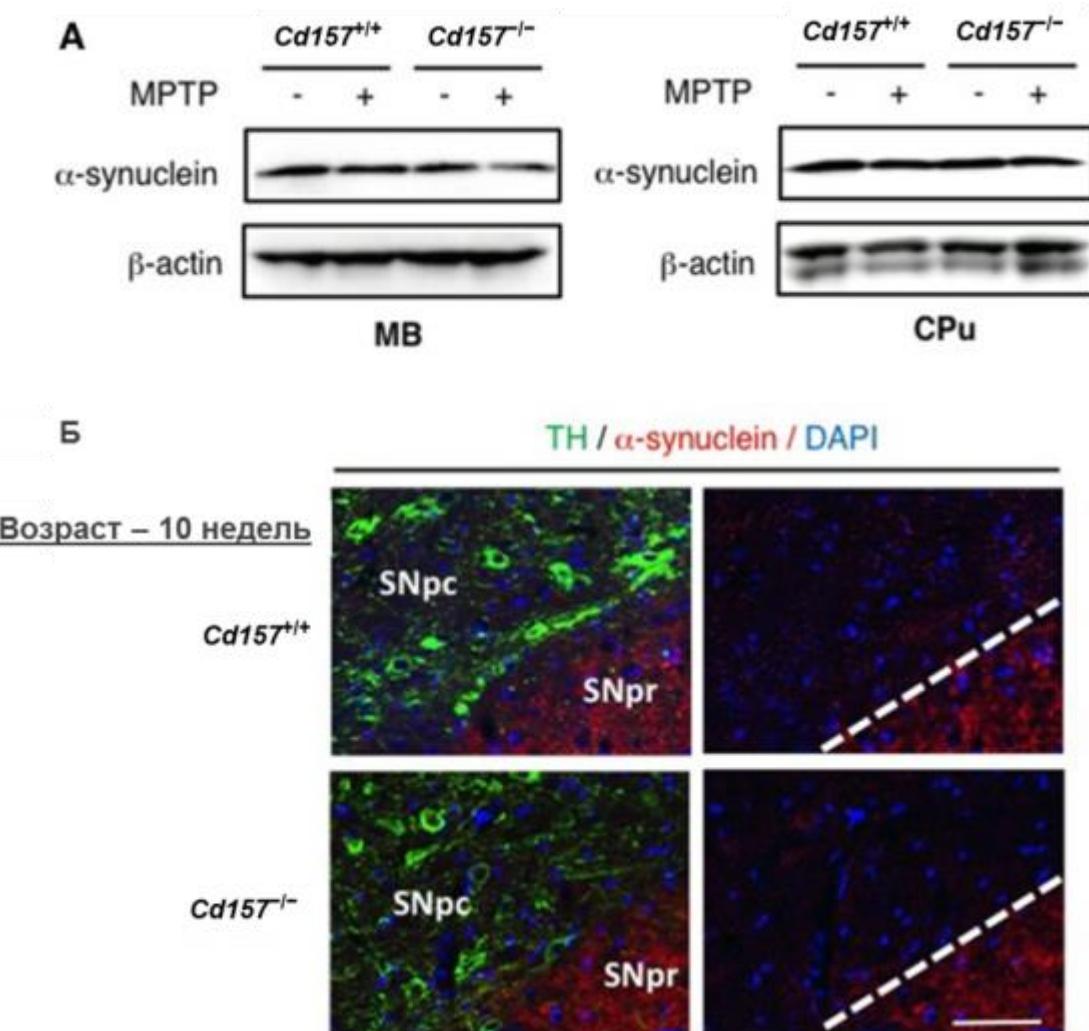
Категории ультразвуков вокализации мышей.

Приложение Д

**Вырождение нейронов черного вещества -striata после введения МРТР.**

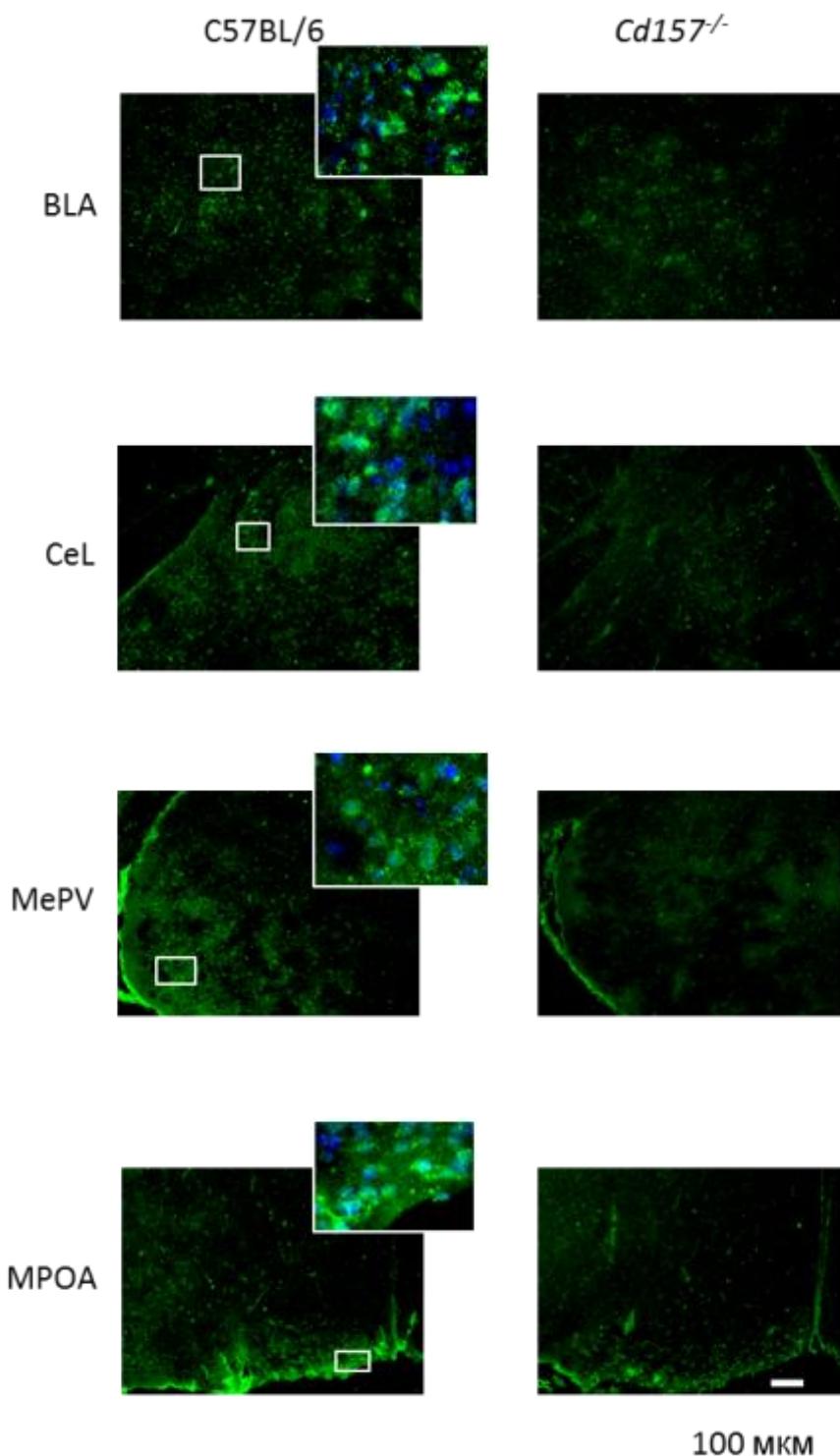
(А, Б). Срезы мозга, включающие черное вещество (А) или стриатум (Б) у мышей линии *Cd157*^{+/+} (+/+) или *Cd157*^{-/-} (-/-), инъецированных МРТР или наполнителем, были окрашены анти-тирозингидроксилаза (ТН) и анти-GFAP-антителами. Количество ТН-позитивных клеток в компактной части черного вещества сравнивали и отображали на графике (А). Показанные значения представляют собой средние значения \pm стандартная ошибка среднего. n=4, *P<0,05 по сравнению с мышами контрольной группы. Масштабная линейка = 50 мкм. **(Б).** Протеиновые экстракты из стриатума мышей линии *Cd157*^{+/+} или *Cd157*^{-/-}, которым инъецировали МРТР или носитель, подвергали вестерн-блоттингу с указанными антителами. Относительные интенсивности показаны на графиках (Б). Интенсивность сигналов, полученных от мышей с введённым носителем, была взята за единицу. Показанные значения представляют собой средние значения \pm стандартная ошибка среднего. n=4, *P<0,05 по сравнению с контролем.

Приложение E



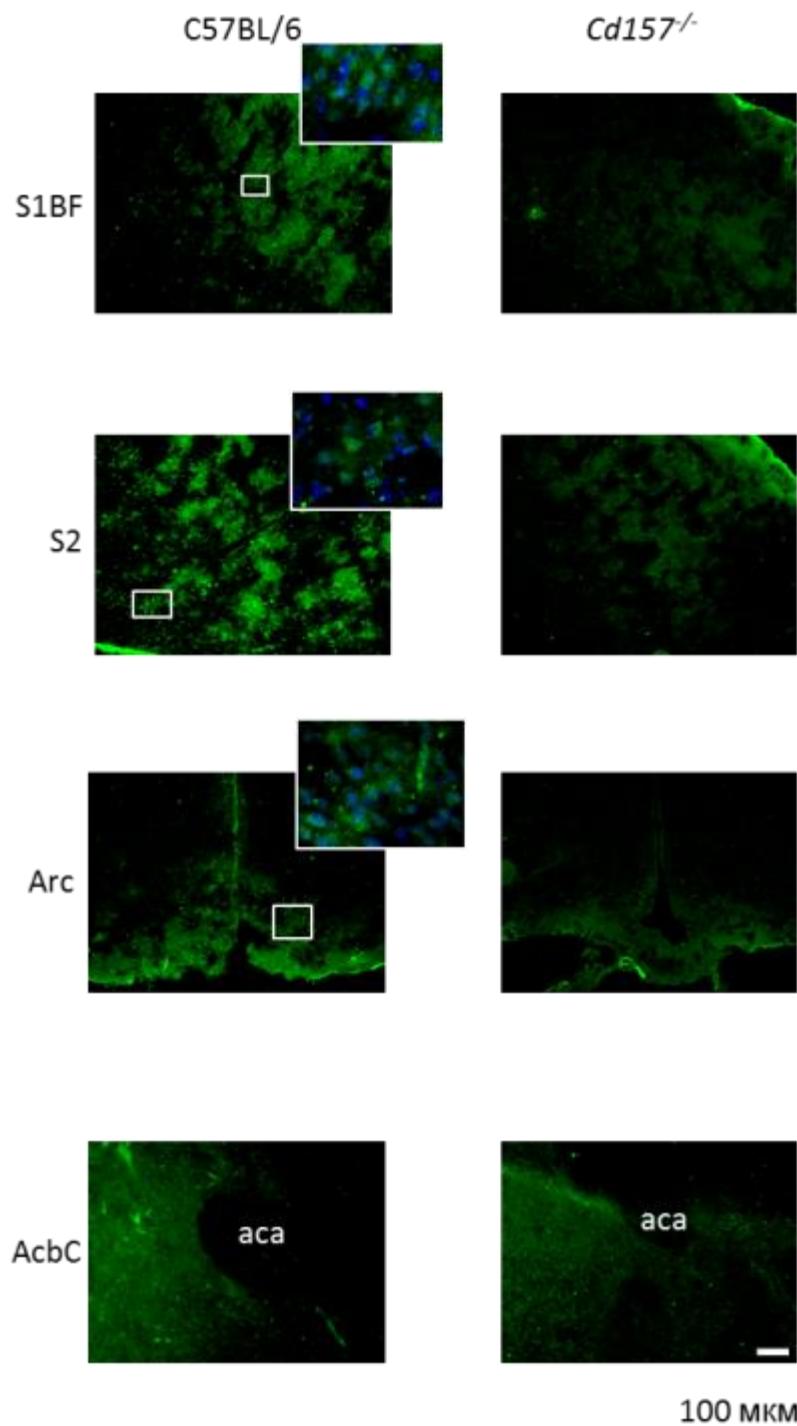
Экспрессия α -синуклеина. (А) Протеиновые экстракты из центрального среднего мозга или хвостатого пуламена мышей линии *CD157^{+/+}* или *CD157^{-/-}*, которые были инъецированы МРТР или носителем, были подвергнуты вестерн-блоттингу с антителами против α -синуклеина и β -актина. (Б) Срезы головного мозга, включая компактную (SNpc) и сетчатую (SNPr) часть черного вещества 10-недельных мышей линии *CD157^{+/+}* или *CD157^{-/-}*, которые были инъецированы МРТР или носителем, были окрашены с помощью антител против TH и α -синуклеина. мышей. Масштабная линейка = 50 мкм.

Приложение Ж



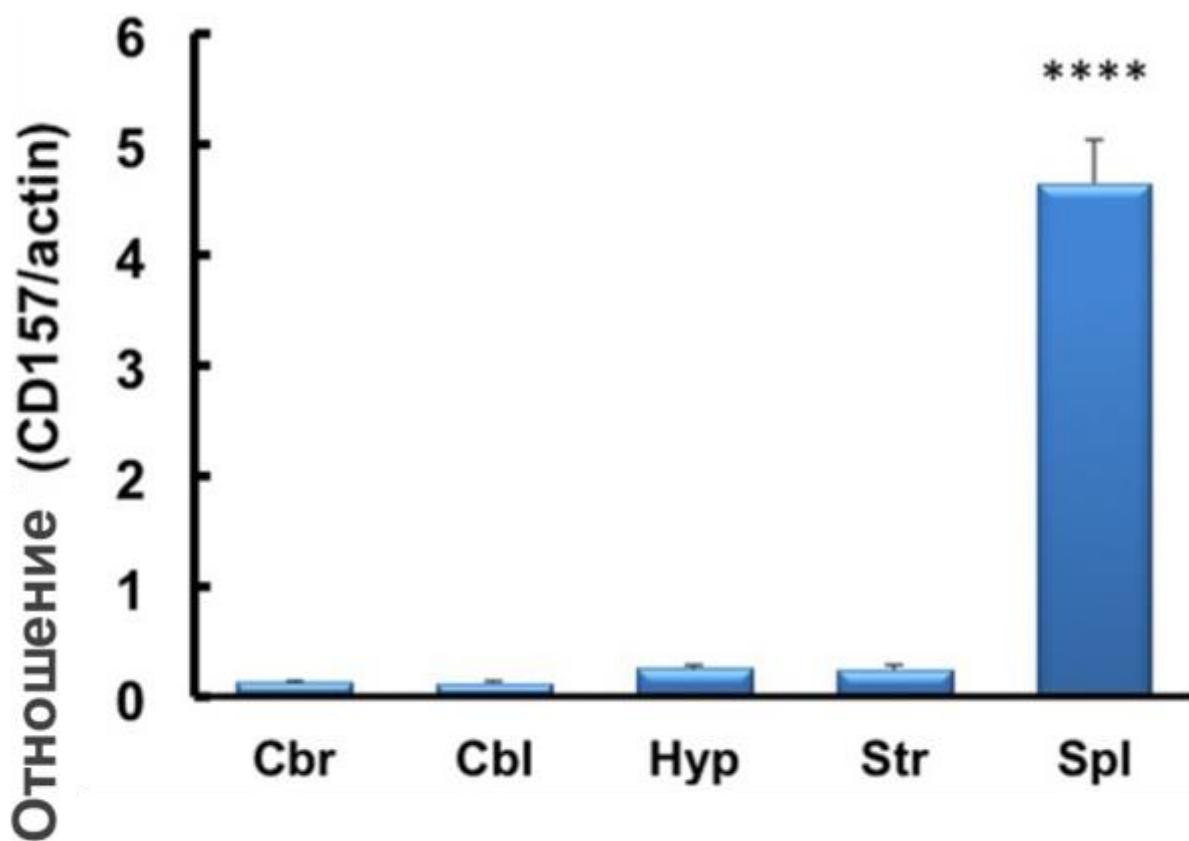
Иммунореактивность CD157 (зеленая флуоресценция, синяя - DAPI – ядра клеток) в базолатеральном комплексе миндалины (BLA), центральном амигдалоидном ядре (CeL), медиальном амигдалоидном ядре, задневисочнной части (MePV), медиальной преоптической области (MPOA) головного мозга *Cd157^{+/+}* и *Cd157^{-/-}* мыши.

Приложение 3



Иммунореактивность CD157 (зеленая флуоресценция, синяя - DAPI – ядра клеток) в соматосенсорной коре (первичная соматосенсорная кора, бочковом поле, S1BF), вторичной соматосенсорной коре (S2), дугообразном гипоталамическом ядре (Arc), ядре прилежащего ядра (AcbC) головного мозга *Cd157^{+/+}* и *Cd157^{-/-}* мыши..

Приложение И



ОТ-ПЦР анализ уровней экспрессии мРНК CD157 в четырех областях мозга и селезенке мышей с использованием β -актиновой мРНК в качестве внутреннего контроля. Количественные данные выражаются в виде средних величин \pm S.E.M. (независимых экспериментов CD157/актина $n=5$). *** $P<0,001$ по сравнению со стриатумом. Используемые сокращения: Cbr, головной мозг; Cbl, мозжечок; Hyp, гипоталамус; Str, полосатое тело или стриатум; Spl селезенка

Приложение К

Уровни синтезируемых цАДФ-рибозы и NAADP при трансфекции НЕК-клеток векторами генов *Cd157/BST-1* или *Cd38* мыши.

Уровень сАДФ-рибозы			Уровень НААДФ		
Вектор	mBST-1	mCD38	Вектор	mBST-1	mCD38
0,087044	0,966383	3,584731	0,031112	0,03296	1,976722
0,029937	0,654507	3,491845	0,028379	0,034818	2,045855
0,021914	0,505914	3,971855	0,033266	0,035159	1,985207
0,120962	0,609379	4,015683	0,029256	0,034438	2,077566
Mean	0,064964	0,684045	3,766028	Mean	0,030503
SD	0,04727	0,198236	0,266294	SD	0,002166
					0,000968
					0,048507

Примечание: Mean – среднее значение, SD – стандартное отклонение среднегозначения..

Приложение Л

Тип и количество ультразвуков, испускаемых мышами-самцами линии C57BL/6, Cd157^{-/-}, Cd157^{+/+} в 3,7,10 день постнатального развития.

	Типы ультразвукового репертуара и количество продуцируемых ультразвуков							Общее число звуков	
	upward	downward	chevron	complex	plate	harmonic	"V"-call		
PND3									
C57BL/6 (n=13)									
Mean	1	4	0	0	0	0	0	5	
S.E.M.	1	1	0	0	0	0	0	1	
Cd157^{-/-} (n=15)									
Mean	0	4	1	12	0	0	0	17	
S.E.M.	0	2	1	3	0	0	0	2	
Cd157^{+/+} (n=10)									
Mean	0	10	10	0	0	0	0	20	
S.E.M.	0	3	1	0	0	0	0	3	
PND7									
C57BL/6 (n=15)									
Mean	1	5	3	2	1	0	1	12	
S.E.M.	1	2	1	1	1	0	1	3	
Cd157^{-/-} (n=15)									
Mean	0	2	2	0	0	0	0	4	
S.E.M.	0	1	1	0	0	0	0	2	
Cd157^{+/+} (n=10)									
Mean	0	3	2	4	1	0	0	10	
S.E.M.	0	2	1	2	1	0	0	3	
PND10									
C57BL/6 (n=15)									
Mean	1	5	3	2	1	0	1	12	
S.E.M.	1	2	1	1	1	0	1	3	
Cd157^{-/-} (n=15)									
Mean	0	2	2	0	0	0	0	4	
S.E.M.	0	1	1	0	0	0	0	2	
Cd157^{+/+} (n=10)									
Mean	0	4	0	4	0	0	0	8	
S.E.M.	0	2	0	3	0	0	0	2	

Примечание: Mean – среднее значение, S.E.M. – стандартная ошибка среднего значения.

Приложение М

Тип и количество испускаемых ультразвуков *Cd157*^{+/−} мышами-самцами на 7 день постнатального развития через 30, 60, 120 минут после введения PBS или OXT.

	Типы ультразвукового репертуара и количество продуцируемых ультразвуков							Общее число звуков
	upward	downward	chevron	complex	plate	harmonic	"V"-call	
<i>Cd157</i>^{+/−} (n=15)								
Mean	0	2	2	0	0	0	0	4
S.E.M.	0	1	1	0	0	0	0	2
<i>Cd157</i>^{−/−} (n=10) + PBS (30')								
Mean	0	2	3	0	0	0	0	5
S.E.M.	0	1	2	0	0	0	0	2
<i>Cd157</i>^{−/−} (n=10) + PBS (60')								
Mean	0	2	2	0	0	0	0	4
S.E.M.	0	1	1	0	0	0	0	2
<i>Cd157</i>^{−/−} (n=10) + PBS (120')								
Mean	0	2	3	0	0	0	0	5
S.E.M.	0	1	1	0	0	0	0	2
<i>C57BL/6</i> (n=15) + OXT (30')								
Mean	0	3	2	6	1	1	1	14
S.E.M.	0	1	1	2	1	1	1	2
<i>Cd157</i>^{−/−} (n=15) + OXT (60')								
Mean	0	4	2	5	0	0	0	11
S.E.M.	0	1	1	1	0	0	0	3
<i>Cd157</i>^{−/−} (n=15) + OXT (120')								
Mean	0	3	3	0	0	0	0	6
S.E.M.	0	1	2	0	0	0	0	2

Примечание: Mean – среднее значение, S.E.M. – стандартная ошибка среднего значения.

Приложение Н

Тип и количество испускаемых ультразвуков *Cd157*^{+/−} мышами-самцами на 10 день постнатального развития через 30, 60, 120 минут после введения PBS или OXT.

	Типы ультразвукового репертуара и количество продуцируемых ультразвуков							Общее число звуков
	upward	downward	chevron	complex	plate	harmonic	"V"-call	
<i>Cd157</i> ^{+/−} (n=10)								
Mean	0	2	2	0	0	0	0	4
S.E.M.	0	1	1	0	0	0	0	2
<i>Cd157</i> ^{+/−} (n=10) + PBS (30')								
Mean	0	2	3	0	0	0	0	5
S.E.M.	0	1	1	0	0	0	0	2
<i>Cd157</i> ^{+/−} (n=10) + PBS (60')								
Mean	0	3	2	0	0	0	0	5
S.E.M.	0	1	1	0	0	0	0	2
<i>Cd157</i> ^{+/−} (n=10) + PBS (120')								
Mean	0	2	2	0	0	0	0	4
S.E.M.	0	1	1	0	0	0	0	2
<i>Cd157</i> ^{+/−} (n=15) + OXT (30')								
Mean	0	3	2	6	1	1	1	14
S.E.M.	0	1	1	2	1	1	1	2
<i>Cd157</i> ^{+/−} (n=15) + OXT (60')								
Mean	0	4	2	5	0	0	0	11
S.E.M.	0	1	1	1	0	0	0	3
<i>Cd157</i> ^{+/−} (n=15) + OXT (120')								
Mean	0	3	3	0	0	0	0	6
S.E.M.	0	1	2	0	0	0	0	2

Примечание: Mean – среднее значение, S.E.M. – стандартная ошибка среднего значения.