

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации Федеральное
государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова
Российской академии наук

Сусорова Мария Андреевна

**НАУЧНЫЙ ДОКЛАД ОБ ОСНОВНЫХ РЕЗУЛЬТАТАХ НАУЧНО-КВАЛИФИКАЦИОННОЙ
РАБОТЫ**

**ВЛИЯНИЕ NO НА АКТИВНОСТЬ СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ
МЕДИАЛЬНОЙ ПРЕФРОНТАЛЬНОЙ КОРЫ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ И
ГЕНЕРАЛИЗАЦИИ УСЛОВНОРЕФЛЕКТОРНОЙ РЕАКЦИИ СТРАХА**

Программа подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре по направлению
подготовки кадров высшей квалификации 1.5.5. Биологические науки

Научный руководитель: Саульская Наталья Борисовна, ведущий научный сотрудник, научный
руководитель группы нейрхимии высшей нервной деятельности ИФ РАН,
доктор биологических наук, доцент.

Санкт-Петербург 2023

Оглавление

Актуальность темы исследования.....	3
Цель и задачи исследования.....	5
Научная новизна	6
Теоретическое и практическое значение работы	7
Методы исследования	7
Влияние локальной нитрергической стимуляции мПК на уровень внеклеточного серотонина в этой области коры.....	8
Влияние локальной блокады нитрергической передачи на уровень внеклеточного серотонина в мПК.....	8
Влияние экзогенной активации нитрергической системы мПК в ходе выработки УРС на уровень внеклеточного серотонина в этой области, а также на выработку и генерализацию УРС.....	9
Влияния блокады нитрергической передачи в мПК в ходе выработки УРС на выброс серотонина в этой области и на формирование и генерализацию УРС	10
Результаты и обсуждение.....	12
Влияние локальной нитрергической стимуляции на уровень внеклеточного серотонина в мПК.....	12
Влияние локальной блокады нитрергической передачи на уровень внеклеточного серотонина в мПК.....	15
Влияние экзогенной активации нитрергической системы мПК в ходе выработки УРС на уровень внеклеточного серотонина в этой области, а также на выработку и генерализацию УРС.....	17
Влияния блокады эндогенных нитрергических сигналов в мПК в ходе выработки УРС на выброс серотонина в этой области и на формирование и генерализацию УРС	20
Выводы.....	24
Заключение	25
Список публикаций по результатам работы.....	26

Актуальность темы исследования

Страх является защитным механизмом, обеспечивающим адаптивные поведенческие реакции в ответ на опасные стимулы окружающей среды. Изучение нейрохимических процессов, лежащих в основе функционирования внутримозговой системы страха вызывает большой интерес исследователей, поскольку нарушения в работе этой системы сопровождаются рядом психических заболеваний и расстройств. Таким образом, изучение новых механизмов формирования, выражения и угашения страха является актуальной задачей нейрофизиологии.

Одним из признаков нарушений в функционировании системы страха является неспособность подавлять неоправданный страх. Данный вид страха характеризуется тем, что реакция страха распространяется не только на стимул, представляющий опасность, но и на другие сходные, но безопасные стимулы. Такой феномен называется генерализацией страха и имеет приспособительный характер, однако повышенная генерализация страха дисфункциональна и занимает одно из центральных мест в симптоматике различных психопатологий, таких как посттравматическое стрессовое расстройство, обсессивно-компульсивное расстройство, генерализованное тревожное расстройство, разного рода фобии др. (Fraunfelder и др. 2022) Эти данные определяют важность исследования механизмов генерализации страха.

В основе приобретенного страха лежит ассоциация между нейтральным условным стимулом и аверсивным безусловным стимулом. Основной моделью для изучения страха служит условная реакция страха (УРС), которая вырабатывается в результате сочетания условного сигнала и неизбежного электрокожного раздражения – безусловного сигнала (Maren et al. 2001). У грызунов, сформированная в ходе такого обучения реакция страха, выражается, среди прочего, в замирании, длительность которого отражает выраженность реакции страха.

Проявления реакции страха опосредуются активностью ряда структур головного мозга, которые вместе образуют внутримозговую систему страха (LeDoux. 2000. V; Tovote et al. 2015). Одной из ключевых структур этой системы, наряду с гиппокампальной формацией, амигдалой и околотоводопроводным серым веществом является медиальная префронтальная кора (мПК). Известно, что мПК играет важную роль в процессах, связанных с различными аспектами страха. А именно: данные, полученные с использованием модели УРС показали, что мПК вовлечена в процессы выработки некоторых форм УРС (УРС на фоновые сигналы окружения, не являющиеся основными,

на сигналы с пространственной и временной сложностью) (Gilmartin et al. 2014, Gilmartin et al. 2010), в процессы выражения УРС (Burgos-Robles et al. 2009, Kim et al. 2013), а также мПК участвует в контроле генерализации УРС (см. Rozeske et al. 2015; Саульская Н.Б. 2018; Sangha 2019)

На активность структур, образующих внутримозговую систему страха значительное влияние оказывает серотониновая регуляция. В частности, известно, что мПК плотно иннервирована серотониновыми волокнами, идущими из дорсального и медианного ядер шва (Yan 2022, Puig et al. 2010, Puig et al. 2011), а также содержит значительное количество серотониновых рецепторов, особенно подтипов 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} и 5-HT_{2C} (Weber et al. 2010, Santana et al. 2004, Puig et al. 2004), что подразумевает важную роль серотонина в модуляции активности этой корковой области, в том числе связанной с механизмами страха. Действительно, в нескольких работах подтверждается, что серотонинергическая система ряда мозговых структур, в том числе и мПК, участвует в контроле условнорефлекторного страха (Almada et al. 2015). Кроме того, недавние исследования нашей лаборатории показали, что выработка УРС сопровождается выбросом серотонина в мПК, а величина такого выброса определяет степень последующей генерализации страха, а именно: чем выше подъём уровня серотонина во время выработки УРС, тем сильнее проявляется последующая генерализация страха (Саульская и др. 2018, Саульская и др. 2019).

Еще одной нейромедиаторной системой, оказывающей влияние на работу мПК является нитрергическая система. В мПК источником NO являются ГАМКергические интернейроны (Gabbott et al. 1995), а также серотонинергические волокна, приходящие в мПК из ядер шва, в которых нейронная NO-синтаза (nNOS) колокализована с серотонином и его транспортёрами (Lu et al. 2010, Gartside et al. 2020).

Известно, что на NO-продуцирующих ГАМКергических интернейронах мПК образуют синапсы отростки нейронов из гиппокампа (Gabbott et al. 2002) (области, участвующей в формировании страха на обстановочные стимулы (Zhang et al. 2014)), что указывает на вероятную роль NO-сигналов мПК в регуляции проявлений страха обстановки. Кроме того, ранее моими коллегами было продемонстрировано возможное участие нитрергической системы мПК в контроле генерализации страха: показано, что NO-система этой области активируется во время выработки УРС и уровень такой активации влияет на степень первоначальной генерализации УРС. (Саульская и др. 2015)

Исходя из морфологических данных, а также данных, свидетельствующих о влиянии NO- и серотониновой системы на генерализацию страха, возникает вопрос, во-первых, о существовании взаимодействия между этими двумя нейромодуляторными системами в мПК, а во-вторых, о его роли в процессах генерализации страха. В литературе имеются данные, о влиянии NO-сигналов на серотониновую трансмиссию в разных структурах головного мозга, а также о роли таких влияний в тревожных и депрессивных расстройствах (см. Ghasemi et al. 2019), но при этом неизвестно какие эффекты NO оказывает на активность серотониновой системы в мПК и, самое главное, нет сведений, участвует ли локальное NO-серотониновое взаимодействие в мПК в процессах формирования и генерализации реакции страха.

Цель и задачи исследования Целью работы было исследование участия локальных нитрергических сигналов мПК в регуляции активности серотониновой системы этой области, оцениваемой по уровню внеклеточного серотонина, а также изучение возможного вклада таких локальных NO-серотониновых влияний в мПК в процессы формирования и генерализации условнорефлекторной реакции страха (модель страха).

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить эффекты введений донора NO – диэтиламинноата (DEA, 0.1 – 3мМ) в мПК на уровень внеклеточного серотонина в данной структуре.
2. Изучить эффекты введения в мПК аргинина (0.1, 1 и 5мМ) – субстрата NO-синтазы, на уровень внеклеточного серотонина в этой области коры.
3. Изучить эффекты введений в мПК ингибитора NO-синтазы – N-нитро-L-аргинина (NA, 0.5 мМ) на фоновый уровень внеклеточного серотонина мПК, а также на подъём этого уровня, вызванный введениями в мПК флуоксетина (10мкМ), селективного ингибитора обратного захвата серотонина.
4. Изучить эффекты введений в мПК во время выработки условнорефлекторной реакции страха донора NO (DEA, 1 мМ) на выброс серотонина в мПК, вызываемый формированием УРС, а также на последующую генерализацию этой условнорефлекторной реакции.
5. Изучить эффекты введения в мПК селективного ингибитора нейронной NO-синтазы (nNOS) – N ω -пропил-L-аргинина (NPLA, 2 мМ) УРС на выброс серотонина в

мПК, вызываемый формированием УРС, а также на последующую генерализацию этой условнорефлекторной реакции.

6. Изучить эффекты введения ингибитора NOS – N-нитро-L-аргинина (NA, 0.5 мМ) УРС на выброс серотонина в мПК, вызываемый формированием УРС, а также на ее последующую генерализацию.

Научная новизна В работе впервые показаны влияния локальных нитрергических сигналов мПК на активность серотониновой системы этой области и продемонстрирован, тоже впервые, возможный вклад таких влияний в регуляцию медиальной префронтальной коры генерализации УРС. А именно, установлено, что активация нитрергической системы мПК локальными введениями донора NO – диэтиламинноата (0.1- 1 мМ) вызывает дозозависимое увеличение уровня внеклеточного серотонина в этой области в начале введения препаратов, длительное введение 1 мМ DEA приводит к постепенному снижению этого показателя, а при введении 3 мМ DEA, первоначальное увеличение уровня серотонина в мПК быстро сменяется спадом этого показателя. Получены ранее неизвестные данные о том, что эндогенная активация нитрергической системы мПК локальными введениями предшественника NO – аргинина (1 мМ – 5 мМ) увеличивает уровень внеклеточного серотонина в мПК. Впервые установлено, что введение в мПК NA (0.5 мМ) задерживают и ослабляют подъем уровня внеклеточного серотонина в мПК, вызываемый локальным введением ингибитора обратного захвата серотонина флуоксетина. Впервые показаны тормозные влияния блокады нитрергической передачи мПК (локальными введениями NA (0.5 мМ) и NPLA (2 мМ)) на базальную и вызванную выработкой УРС активность серотонинергической системы этой области коры, оцениваемую по изменениям уровня внеклеточного серотонина. Получены ранее неизвестные факты о том, что длительная экзогенная нитрергическая стимуляция мПК введениями в эту область донора NO DEA (1 мМ), во-первых, вызывает временное увеличение уровня внеклеточного серотонина в мПК с последующим снижением этого показателя, а, во-вторых, тормозит на фоне такого снижения выброс серотонина в мПК, вызываемый выработкой УРС, и такое воздействие на серотониновую систему приводит через сутки к уменьшению генерализации УРС. Впервые показано, что введение блокаторов nNOS и NOS (NPLA, 2 мМ и NA, 0.5 мМ) во время выработки УРС уменьшает подъём уровня внеклеточного серотонина, сопровождающего выработку УРС, и вызывает снижение генерализации УРС через сутки после введения препаратов.

Теоретическое и практическое значение работы Теоретическая значимость работы заключается в том, что полученные в результате её выполнения данные вносят вклад в понимание функционирования мПК, а именно расширяют уже имеющиеся представления о функционировании серотониновой и нитрергической систем этой области и демонстрируют, что серотониновая нейротрансмиссия в мПК находится под влиянием NO-сигналов. Также полученные в работе результаты дополняют имеющиеся данные, о механизмах, лежащих в основе функциональной роли мПК в контроле генерализации страха, демонстрируя роль влияний, оказываемых NO на серотониновую трансмиссию в генерализации страха. Кроме того, данная работа обладает потенциальной практической ценностью, которая связана с возможностью использования полученных в работе данных при создании методов, направленных на коррекцию проявлений генерализованного страха, характеризующего ряд стрессовых расстройств.

Публикации По теме работы опубликовано 12 научных работ: 2 статьи в журналах списка ВАК и 10 тезисов.

Личный вклад автора Научные результаты, представленные в работе, получены автором самостоятельно или с его личным участием.

Методы исследования Работа выполнена на крысах-самцах линии Спрег-Доули. В работе использовали методы прижизненного внутримозгового микродиализа и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с электрохимической детекцией. Крысам под общим наркозом («Рометар», 1.4мкг/100г, «Золетил», 5мг/100г) в правую мПК имплантировали диализные канюли. Микродиализные эксперименты проводили на второй и третий день после имплантации канюли следующим образом: к входу канюли подключали диализный насос, прокачивающий искусственную спинномозговую жидкость (ИСМЖ) и начинали перфузию мПК. Животное помещали в дневную домашнюю клетку и после стабилизационного периода (60 мин) начинали сбор 5-ти фоновых порций диализата. Затем животных делили на группы. Для введения в мПК фармакологических препаратов к входу канюли подключали другой насос, прокачивающий смесь ИСМЖ и с необходимого препарата, добавленным в ИСМЖ. Порции диализата собирали на протяжении всего эксперимента каждые 15 минут. Диализат анализировали на изменение уровня внеклеточного серотонина с помощью ВЭЖХ («Shimadzu», Германия).

Для статистической обработки использовали пакет SigmaStat (3.0). Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Изменения уровня внеклеточного серотонина по сравнению с собственным фоном оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа с использованием t-критерия Бонферрони для множественного апостериорного сравнения. Для межгруппового сравнения использовали двухфакторный дисперсионный и апостериорный анализ по t-критерию Бонферрони. Коэффициент корреляции вычисляли по методу Пирсона. Парное сравнение поведенческих параметров осуществляли с использованием t-критерия Стьюдента или u-критерия Манна-Уитни.

В экспериментах были использованы следующие вещества:

Натриевая соль диэтиламин ноаноата (DEA, 0.1, 0.5, 1, 2.5 и 3 мМ, «Sigma», США) – донор NO, N ω -пропил-L-аргинин (NPLA, «Tocris», США, 2 мМ) – селективный ингибитор нейронной NO-синтазы (nNOS), N-нитро-L-аргинин (NA, «MP Biomedicals», США 0.5 мМ) – ингибитор NO-синтазы, флуоксетин (FLU, 10 мкМ, «Sigma», США) – селективный ингибитор обратного захвата серотонина, L-аргинин (R, 0.1, 1 и 5 мМ) – субстрат NO-синтазы.

Влияние локальной нитрергической стимуляции мПК на уровень внеклеточного серотонина в этой области коры Животных разделили на 6 групп. Крысам групп «0.1 мМ R» (n=6), «1 мМ R» (n=6) и «5 мМ R» (n=5) в ИСМЖ добавляли субстрат NO-синтазы L-аргинин (R) в концентрациях 0.1, 1 и 5 мМ, соответственно. Животным группы «0.1 мМ DEA» (n=8) в ИСМЖ добавляли донор NO DEA (0.1 мМ). Крысам группы «1 мМ DEA» (n=6) в ИСМЖ для перфузии мПК добавляли DEA в концентрации 1 мМ, а крысам группы «3 мМ DEA» (n=6) в ИСМЖ для перфузии мПК добавляли DEA в концентрации 3 мМ. Затем для животных групп «0.1 мМ R», «1 мМ R», «5 мМ R», «1 мМ DEA» и «3 мМ DEA» эксперимент заканчивали, а животным группы «0.1 мМ DEA» продолжили введение DEA, увеличивая его концентрацию: сначала до 0.5 мМ, затем до 2.5 мМ (по 1ч каждая концентрация). В ходе введения каждого препарата/отдельной концентрации данного препарата собирали по 4 порции диализата.

Влияние локальной блокады нитрергической передачи на уровень внеклеточного серотонина в мПК Животных разделили на 2 группы. Животным группы FLU (n = 9) в ИСМЖ для перфузии мПК добавляли селективный ингибитор обратного захвата

серотонина флуоксетин (FLU, 10 мкМ) и собирали 5 порций диализата. Крысам группы NA+FLU (n = 6) после сбора фоновых порций диализата в ИСМЖ добавляли сначала ингибитор NO- синтазы N-нитро-L-аргинин (NA, 0.5 мМ) и собирали 5 порций диализата. Затем заменяли этот раствор на смесь 0.5 мМ NA и 10 мкМ FLU и так же собирали 5 порций диализата.

Влияние экзогенной активации нитрергической системы мПК в ходе выработки УРС на уровень внеклеточного серотонина в этой области, а также на выработку и генерализацию УРС

На следующий день после имплантации канюли (экспериментальный день 1) животное тестировали на двигательную активность в установке «Открытое поле» (10 мин), после чего крысу пересаживали в дневную домашнюю камеру и начинали микродиализные эксперименты, как описано выше. После сбора фоновых порций диализата крыс делили на 2 группы «DEA NONO» (n=9) и «Без введения» (n=10). Крысам группы «DEA NONO» в ИСМЖ для перфузии мПК добавляли донор NO – диэтиламин ноноат (DEA, “Sigma”, США, 1 мМ) и собирали 4 порции диализата. Затем животным обеих групп проводили выработку УРС с дискриминационным компонентом. Сначала крысу на 5 минут помещали в условнорефлекторную камеру и предъявляли условный сигнал (CS+, непрерывный тон, 1000 Гц, 10сек) в сочетании с электрокожным раздражением лап (1,5 мА, 1сек) – 5 сочетаний с интервалом 1 минута. Затем через 70 минут проводили дифференцировочную сессию (дифференцировка 1): крысу помещали в дифференцировочную камеру и предъявляли звуковой дифференцировочный сигнал (CS-, прерывистый тон, 1000 Гц 1 сек) – 5 раз с интервалом 1 минута. Крысам группы «Без введения» данные процедуры проводили сразу после сбора фоновых порций диализата. В ходе тестов регистрировали время замиранья на CS+ и CS- (показатель страха). После этого через 55 минут осуществляли промывку мПК ИСМЖ и пересаживали крысу в ночную домашнюю клетку. На этом первый экспериментальный день заканчивали.

Во второй экспериментальный день крыс обеих групп тестировали в установке «Приподнятый крестообразный лабиринт», регистрируя время нахождения животного в открытых и закрытых рукавах, а также горизонтальную (пересечения секторов) и вертикальную (стойки/свешивания) двигательную активность в открытых и закрытых рукавах. После этого крысу пересаживали в дневную домашнюю клетку и начинали диализную перфузию мПК. Целью второго дня было тестирование на выработанность реакции страха и на его генерализацию. После сбора фоновых порций диализата

проводили дифференцировочную сессию (дифференцировка 2) и предъявляли CS- так же, как в первый экспериментальный день. Затем через 70 минут животных тестировали на выработанность УРС: крыс помещали в условную камеру и предъявляли CS+ без электрокожного раздражения лап, после чего собирали 5 порций диализата. Во время тестов регистрировали время замирания животных. Коэффициент генерализации рассчитывали как отношение времени замирания на дифференцировочный сигнал (CS-) к времени замирания на условный сигнал (CS+).

Влияния блокады нитрергической передачи в мПК в ходе выработки УРС на выброс серотонина в этой области и на формирование и генерализацию УРС На следующий день после имплантации канюли (экспериментальный день 1) животное тестировали на двигательную активность в установке «Открытое поле» (10 мин), после чего крысу пересаживали в дневную домашнюю камеру и начинали микродиализ мПК. Собирали 5 фоновых порций диализата, а затем крыс разделяли на 2 группы: «NA» (n=10) и «NPLA» (n=7). Крысам группы «NA» в ИСМЖ для перфузии мПК добавляли ингибитор NO-синтазы N-омега-нитро-L-аргинин (NA, 0.5 мМ, «MP Biomedicals», США) а крысам группы «NPLA» – селективный ингибитор нейронной NO синтазы N-омега-пропил-L-аргинин (NPLA, 2 мМ, «Tocris», Великобритания) и собирали по 5 образцов диализата. Затем животным всех групп проводили выработку УРС и дифференцировочную сессию 1 как описано выше для групп «1 мМ DEA» и «Без введения». На следующий день животных сначала тестировали в приподнятом крестообразном лабиринте, подключали к диализному насосу и проводили дифференцировочную сессию 2 и реализацию УРС (с интервалом 70 мин) как описано выше.

Исследование влияния активации и блокады NO-системы на уровень внеклеточного серотонина в мПК

Группы	Этапы эксперимента						
	0.1 мМ DEA (n=8)	фон, 75 мин	Смена р-ра на DEA 0.1 мМ	сбор, 60 мин	Смена раствора на DEA 0,5 мМ	сбор, 60 мин	Смена раствора на DEA 2,5 мМ
1 мМ DEA (n=8)	фон, 75 мин	Смена р-ра на DEA 1 мМ	сбор, 60 мин				
3 мМ DEA (n=8)	фон, 75 мин	Смена р-ра на DEA 3 мМ	сбор, 60 мин				
FLU (n=9)	фон, 75 мин	Смена р-ра на FLU	сбор, 60 мин				
NA+FLU (n=6)	фон, 75 мин	Смена р-ра на NA	сбор, 60 мин	Смена раствора на NA+FLU	сбор, 60 мин		
0.1 мМ R (n=6)	фон, 75 мин	Смена р-ра на R 0.1 мМ	сбор, 60 мин				
1 мМ R (n=6)	фон, 75 мин	Смена р-ра на R 1 мМ	сбор, 60 мин				
5 мМ R (n=5)	фон, 75 мин	Смена р-ра на R 5 мМ	сбор, 60 мин				

Таблица 1. Схема экспериментов. «Фон» – сбор фоновых порций диализата, «Сбор» – сбор диализата. Серым цветом выделен период сбора диализата.

Исследование влияния активации и блокады NO-системы мПК во время выработки УРС на уровень генерализации страха

	Группы	Этапы эксперимента							
		День 1	DEA NONO (n=9)	Открытое поле, 10 мин	фон, 75 мин	смена р-ра на DEA	сбор, 60 мин	Выработка УРС	сбор, 75 мин
NA (n=10)	Открытое поле, 10 мин		фон, 75 мин	смена р-ра на NA	сбор, 60 мин	Выработка УРС	сбор, 75 мин	Дифференцировка	сбор 60 мин
NPLA (n=7)	Открытое поле, 10 мин		фон, 75 мин	смена р-ра на NPLA	сбор, 60 мин	Выработка УРС	сбор, 75 мин	Дифференцировка	сбор 60 мин
Без введения (n=10)	Открытое поле, 10 мин		фон, 75 мин			Выработка УРС	сбор, 75 мин	Дифференцировка	сбор 60 мин
День 2	DEA NONO (n=9)	Крестообразный лабиринт	75 мин	Дифференцировка	75 мин	Реализация УРС	75 мин		
	NA (n=10)	Крестообразный лабиринт	75 мин	Дифференцировка	75 мин	Реализация УРС	75 мин		
	NPLA (n=7)	Крестообразный лабиринт	75 мин	Дифференцировка	75 мин	Реализация УРС	75 мин		
	Без введения (n=10)	Крестообразный лабиринт	75 мин	Дифференцировка	75 мин	Реализация УРС	75 мин		

Таблица 2. Схема экспериментов. «Открытое поле» – тест «Открытое поле», «Крестообразный лабиринт» – тест «Приподнятый крестообразный лабиринт», «Фон» – сбор фоновых порций диализата, «Сбор» – сбор диализата. Серым цветом выделен период сбора диализата.

Результаты и обсуждение

Влияние локальной нитрергической стимуляции на уровень внеклеточного серотонина в мПК Введение в мПК животных группы «0.1 мМ DEA» 0.1 мМ DEA вызывало подъем уровня внеклеточного серотонина в мПК по отношению к фону перед введением (рис. 1, $F_{(8, 56)} = 15.2$, $p < 0.001$) с максимумом $126 \pm 5\%$ через 45 мин после начала введения. Увеличение концентрации DEA до 0.5 мМ у животных этой группы также приводило к росту уровня серотонина в мПК (рис 1; $F_{(8, 56)} = 8.9$, $p < 0.001$). Причем максимальный подъем ($135 \pm 8\%$) имел место через 30 мин после начала введения этой дозы DEA. Дальнейшее увеличение концентрации DEA до 2.5 мМ, напротив, снижало уровень внеклеточного серотонина в мПК (рис 1; $F_{(8, 56)} = 5.1$, $p < 0.001$). Однофакторный дисперсионный анализ выявил значимое влияние концентрации DEA ($F_{(3, 124)} = 51.4$, $p < 0.001$) на уровень внеклеточного серотонина в мПК крыс группы «0.1 мМ DEA» (рис. 1).

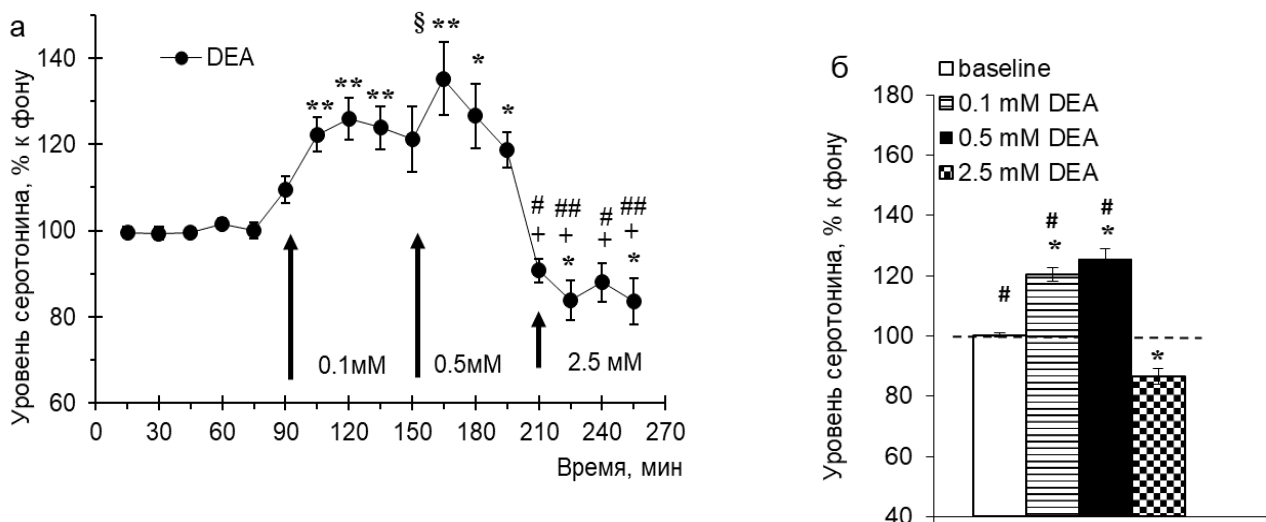


Рис. 1. (а) – изменения уровня внеклеточного серотонина в мПК при введении в эту область диэтиламин ноноата (DEA) в концентрациях 0.1, 0.5 и 2.5 мМ; По оси X – время, мин; по оси Y – уровень серотонина, % к фону; черные стрелки – начало введения разных концентраций DEA. (а) * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.001$ – при сравнении с фоном; + – $p < 0.001$ – при сравнении с введением 0.1 мМ DEA; # – $p < 0.01$, ## – $p < 0.001$ – при сравнении с введением 0.5 мМ DEA. (б) * – $p < 0.001$; # – $p < 0.001$ – при сравнении с введением 2.5 мМ DEA. (б) – средний (за весь период введения) уровень внеклеточного серотонина в мПК при введении каждой концентрации DEA; разброс на графике и диаграмме – ошибка среднего.

Введение в мПК крыс группы «1 мМ DEA» 1 мМ DEA приводило к росту уровня внеклеточного серотонина в этой области ($F_{(8, 56)} = 13.6$, $p < 0.001$) с максимальным подъемом $139 \pm 8\%$ в первые 15 мин введения (рис. 2). После этого наблюдалось постепенное возвращение уровня серотонина мПК к фоновым показателям. Введение DEA в концентрации 3 мМ крысам группы «3 мМ DEA» также приводило к подъёму уровня внеклеточного серотонина в мПК ($F_{(8, 54)} = 19.9$, $p < 0.001$) с максимальным подъёмом

126±5% в первые 15 минут введения (рис. 2). Затем наблюдалось падение уровня серотонина ниже фоновых значений. Двухфакторный дисперсионный анализ выявил значимые различия между изменениями уровня внеклеточного серотонина в мПК, вызываемыми введениями DEA в концентрациях 0.1, 1 и 3 мМ (группы «0.1 мМ DEA», «1 мМ DEA» и «3мМ DEA», соответственно; рис 2; $F_{(16, 187)} = 12.6$, $p < 0.001$). При этом дозозависимое повышение уровня внеклеточного серотонина в первые 15 минут введений наблюдалось только при введении DEA в концентрациях от 0.1 мМ до 1 мМ.

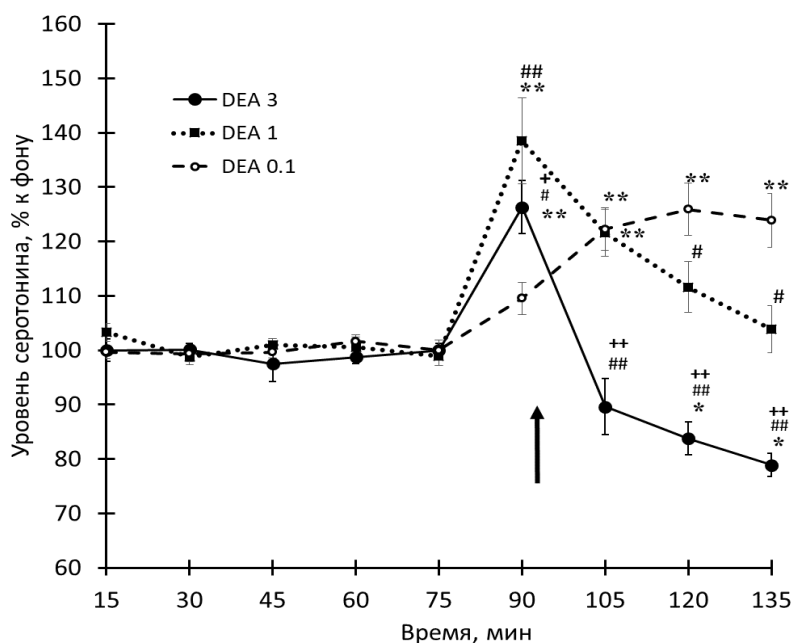


Рис. 2. Изменения уровня внеклеточного серотонина в мПК крыс с введениями в мПК 0.1, 1 и 3 мМ DEA (группы «0.1 мМ DEA», «1 мМ DEA» и «3мМ DEA», соответственно). Черная стрелка – начало введения DEA. * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.001$ – при сравнении с фоном; # – $p < 0.05$; ## – $p < 0.001$ – при сравнении введением 0.1 мМ DEA; ; + – $p < 0.05$; ++ – $p < 0.001$ – при сравнении введением 1 мМ DEA. разброс на графике и диаграмме – ошибка среднего.

Сводный анализ (по группам «0.1 мМ DEA» и «1 мМ DEA») изменений уровня внеклеточного серотонина в мПК в первые 15 мин введений DEA в концентрациях 0.1, 0.5, 1, 2.5 мМ показал, что в этом временном интервале концентрация DEA значимо влияет на уровень серотонина в мПК с максимальным подъемом при введениях 1 мМ DEA (рис. 3а; $F_{(4, 35)} = 11.2$, $p < 0.001$). Корреляционный анализ продемонстрировал, что в первые 15 мин введения DEA в концентрациях 0.1, 0.5 и 1 этот препарат дозозависимо увеличивал уровень внеклеточного серотонина в мПК (рис. 3б; $r = 0.68$, $p < 0.001$, $n = 32$).

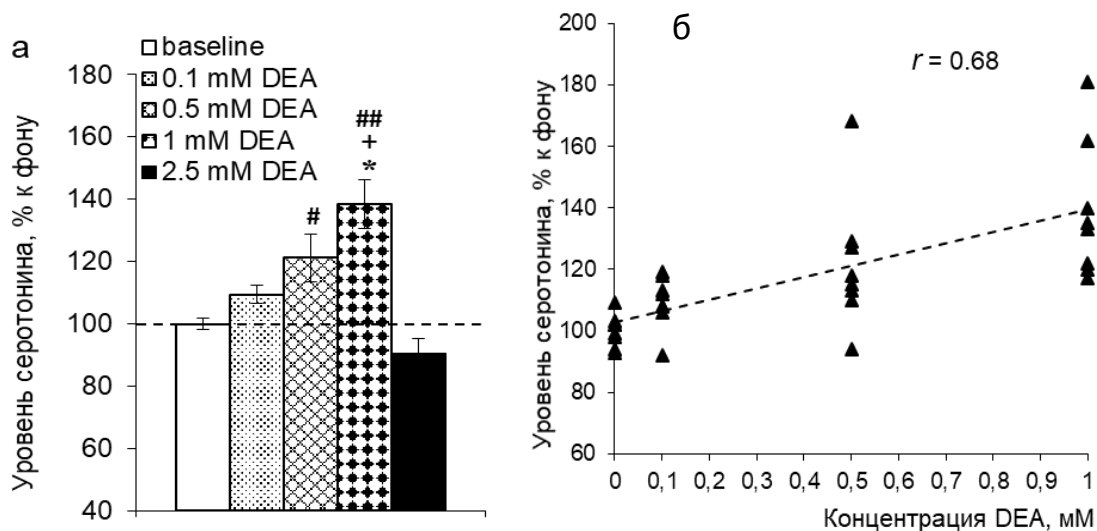


Рис. 3. (а) – уровень внеклеточного серотонина в мПК крыс в первые 15 мин введения каждой концентрации DEA. * – $p < 0.001$ – при сравнении с фоном; + – $p < 0.01$ – при сравнении с введением 0.1 мМ DEA; # – $p < 0.01$, ## – $p < 0.001$ – при сравнении с введением 2.5 мМ DEA; (б) – корреляция уровня внеклеточного серотонина в мПК и концентрации вводимого DEA (0.1–1 мМ). По оси Y – концентрация вводимого DEA. r – коэффициент корреляции. Остальные обозначения, как на рис. 1а.

Введение аргинина в концентрации 0.1 мМ в мПК животным группы «0.1 мМ R» не вызывало значимых изменений уровня внеклеточного серотонина в мПК (рис. 4; $F_{(9,44)} = 0.86$, $p < 0.567$). Введение 1 мМ аргинина животным группы «1 мМ R» приводило к повышению уровня внеклеточного серотонина в мПК (рис. 4; $F_{(9,45)} = 10.16$, $p < 0.001$) с максимальным подъёмом $137 \pm 8\%$ в первые 15 минут введения. Введение 5 мМ аргинина крысам группы «5 мМ R» также приводило к росту уровня внеклеточного серотонина (рис. 4; $F_{(9,36)} = 6.3$, $p < 0.001$) с максимальным подъёмом $125 \pm 6\%$ в первые 15 минут введения. При этом межгрупповое сравнение при помощи двухфакторного дисперсионного анализа не выявило значимых различий между изменениями уровня внеклеточного серотонина в мПК, вызываемых введениями 1 и 5 мМ аргинина крысам групп «1 мМ R» и «5 мМ R», соответственно (рис. 4; $F_{(9,90)} = 1.07$, $p < 0.394$).

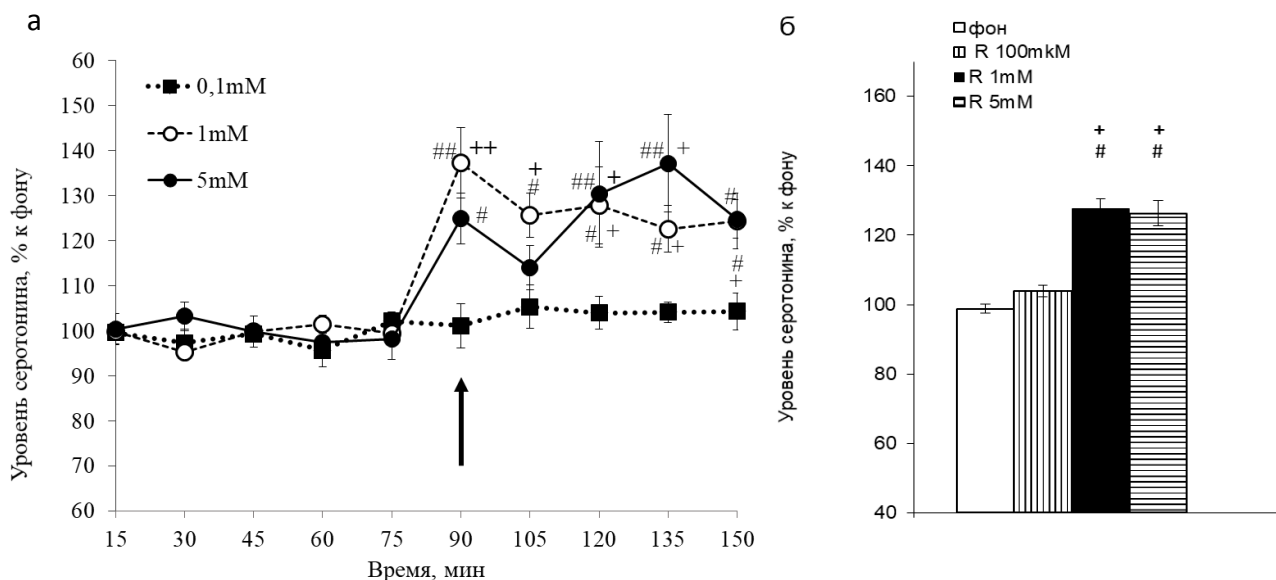


Рис. 4 (а) – Изменения уровня внеклеточного серотонина в мПК крыс с введениями в мПК аргинина в концентрациях 0.1 мМ, 1 мМ и 5 мМ (группы «R 0.1», «R 1» и «R 5», соответственно). По оси X – время, мин; по оси Y – уровень серотонина, % к фону; черная стрелка – начало введения аргинина. # – $p < 0.05$; ## – $p < 0.001$ – при сравнении с фоном; + – $p < 0.05$; ++ – $p < 0.001$ – при сравнении с введением 0.1 мМ аргинина. (б) – средний (за весь период введения) уровень внеклеточного серотонина в мПК при введении каждой концентрации R; # – $p < 0.001$ – при сравнении с фоном; + – $p < 0.001$ – при сравнении с введением 0.1 мМ аргинина. Разброс на графике и диаграмме – ошибка среднего.

Таким образом, результаты этой части работы свидетельствуют, что эндогенная нитрергическая стимуляция мПК введениями субстрата NO-синтазы R (0.1 мМ, 1 мМ, 5 мМ) приводит к увеличению уровня внеклеточного серотонина в этой области при концентрациях R 1 мМ и 5 мМ. Кроме того, они показывают, что экзогенная нитрергическая стимуляция мПК локальными введениями донора NO DEA 0.1–1 мМ, оказывает похожее действие в первые 15 мин введения DEA, а именно, вызывает дозозависимый подъем уровня внеклеточного серотонина в мПК. Однако введение в мПК DEA в больших концентрациях (2.5 и 3 мМ) приводит к снижению уровня внеклеточного серотонина в мПК, что, возможно, связано с десенситизацией гуанилатциклазы (Sayed et al. 2007) – мишени NO под действием высоких доз препарата или его длительного введения.

Влияние локальной блокады нитрергической передачи на уровень внеклеточного серотонина в мПК Введение в мПК крыс группы «FLU» ингибитора обратного захвата серотонина флуоксетина (FLU, 10 мкМ) сопровождалось ростом уровня внеклеточного серотонина в мПК относительно собственного фона, который становился достоверным через 45 мин введения, с максимумом $157 \pm 11\%$ (рис. 5; $F_{(9, 72)} = 13.4$, $p < 0.001$). Введение в мПК животных группы «NA+FLU» ингибитора NO-синтазы N-нитро-L-аргинина (NA, 0.5 мМ), напротив, снижало уровень внеклеточного серотонина в этой области относительно фона перед введением (Рис 5; $F_{(9, 45)} = 8.8$, $p < 0.001$). Введение в мПК животным группы

«NA+FLU» FLU (10 мкМ) на фоне предварительного введения NA (0.5 мМ) вызывало подъем уровня внеклеточного серотонина в мПК (максимум $127 \pm 4\%$), наблюдаемый с 60-й мин введения FLU (рис. 5; $F_{(14, 70)} = 17.7, p < 0.001$). По результатам двухфакторного дисперсионного анализа животные с введением FLU на фоне введения NA (группа «NA+FLU») демонстрировали меньший по амплитуде и запаздывающий по времени подъем уровня внеклеточного серотонина мПК по сравнению с крысами группы «FLU», подвергавшимся изолированному введению FLU (Рис 5; $F_{(9, 130)} = 2.4, p = 0.02$).

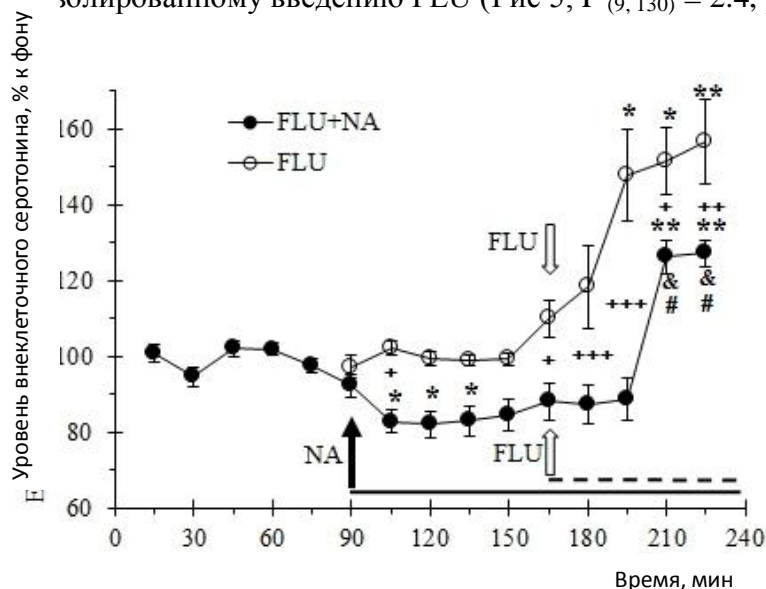


Рис 5. Влияние введения в мПК 0.5 мМ NA на фоновый уровень внеклеточного серотонина, а также на его изменения, вызываемые введением в мПК 10 мкМ FLU. Сплошная горизонтальная линия – период введения NA крысам группы FLU + NA, пунктирная горизонтальная линия – период введения FLU изолированно крысам группы FLU или на фоне введения NA крысам группы FLU + NA. * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.001$ – при сравнении с фоном; +- $p < 0.05$; ++ – $p < 0.01$; +++ – $p < 0.001$ – при межгрупповом сравнении. & – $p < 0.001$ – при сравнении с уровнем серотонина перед введением FLU + NA. # – $p < 0.001$ – при сравнении с уровнем серотонина в первые 45 мин после начала введения FLU+NA.

Таким образом, полученные в этом разделе результаты свидетельствуют, что серотониновая система мПК находится под тоническими активационными влияниями эндогенного NO, поскольку устранение таких влияний локальным введением ингибитора NOS NA (0.5 мМ) снижает базальный уровень внеклеточного серотонина в этой области. Кроме того, они показывают, что ингибирование NOS ослабляет и задерживает рост уровня внеклеточного серотонина в мПК, вызываемый введением блокатора обратного захвата серотонина FLU (10 мМ), снижая нейрохимическую эффективность этого препарата. Этот результат перекликается с последними данными литературы (Sadeghi et al. 2023), о том, что системные введения селективных ингибиторов nNOS уменьшают анксиогенные эффекты флуоксетина, наблюдаемые в первые дни введения этого препарата в модели посттравматического стрессового расстройства.

Влияние экзогенной активации нитрергической системы мПК в ходе выработки УРС на уровень внеклеточного серотонина в этой области, а также на выработку и генерализацию УРС Животные экспериментальных групп не различались перед началом экспериментов по активности в тесте “Открытое поле”. Выработка УРС с дискриминационным компонентом (этап обучения) у животных группы “Без введения” сопровождалась подъемом уровня внеклеточного серотонина в мПК относительно фонового уровня перед тестированием ($F_{(13,117)} = 8.2, p < 0.001$) в ходе обоих тестов – выработки УРС (рис. 6) и дифференцировочной сессии 1 (рис 6), что соответствует ранее полученным в лаборатории данным (Саульская и др. 2018). Введение в мПК перед выработкой УРС 1 мМ DEA NONO вызывало временный (30 мин) подъем уровня внеклеточного серотонина в мПК (рис 6; максимум $136 \pm 10\%$) относительно фона перед ведением ($F_{(7,56)} = 10.7, p < 0.001$). Затем уровень внеклеточного серотонина мПК постепенно снижался (рис 6; $F_{(11,88)} = 9.2, p < 0.001$) и в конце первого дня экспериментов становился ниже фоновых значений ($80 \pm 6\%; t = 3.9; p < 0.01$).

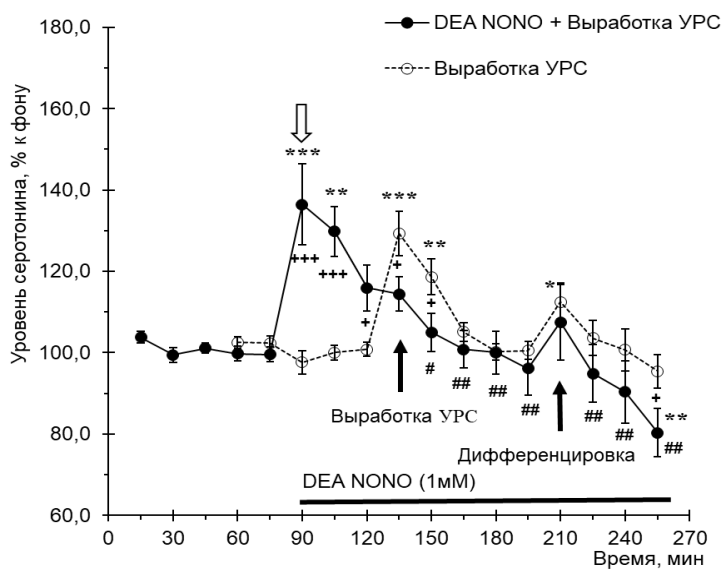


Рис. 6. Изменения уровня внеклеточного серотонина в мПК в ходе выработки УРС и дифференцировочной сессии 1 (этап обучения) у животных с введением в мПК 1 мМ DEA NONO (“DEA NONO + Выработка УРС”) и у крыс без введения этого препарата (“Выработка УРС”). Разброс на графиках – ошибка среднего; белая стрелка – начало введения DEA NONO; черные стрелки – начало тестов; горизонтальная линия – период введения DEA NONO. * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.05$; *** – $p < 0.001$ – при сравнении с фоном; + – $p < 0.05$; ++ – $p < 0.001$ – при межгрупповом сравнении. # – $p < 0.05$; ## – $p < 0.001$ – при сравнении с уровнем серотонина непосредственно перед тестом “Выработка УРС” у животных группы “DEA NONO”.

Корреляционный анализ, охватывающий весь период введения препарата, подтвердил отрицательную корреляционную зависимость между уровнем внеклеточного серотонина в мПК и временем от начала введения DEA NONO в эту область ($r = -0.58; p < 0.001$).

Выработка УРС у животных группы “DEA NONO”, осуществляемая на фоне введения в мПК 1 мМ DEA NONO, не вызвала изменений уровня внеклеточного серотонина в мПК относительно этого показателя непосредственно перед тестом (рис. 6; $t = 0.19$; $p = 1.00$, t -критерий Бонферрони), а также по сравнению с фоновым уровнем серотонина перед введением препарата ($t = 2.1$; $p = 1.00$). Дифференцировочная сессия 1 у животных с введениями 1 мМ DEA NONO также не приводила к достоверным изменениям уровня серотонина в мПК относительно этого показателя перед тестом (рис. 6; $t = 2.0$; $p = 1.00$) и перед введением DEA NONO ($t = 1.7$; $p = 1.00$). По данным двухфакторного дисперсионного анализа, изменения уровня внеклеточного серотонина во время выработки УРС у животных группы “DEA NONO” были ниже, чем этот показатель крыс группы “Без введения” ($F_{13,238} = 5.8$, $p < 0.001$).

В целом, эти данные показывают, что длительное введение 1 мМ DEA NONO в мПК в ходе выработки УРС с дискриминационным компонентом уменьшают подъем уровня внеклеточного серотонина в этой области, вызываемый выработкой УРС.

Тестирование животных обеих групп в крестообразном лабиринте, проводимое на следующий день после выработки УРС показало, что крысы группы “DEA NONO”, подвергавшиеся накануне введению в мПК 1 мМ DEA NONO, не отличаются от крыс группы “Без введения” по времени пребывания в закрытых и открытых рукавах лабиринта, а также по амбуляции и вертикальной активности в закрытых рукавах. Однако крысы группы “DEA NONO” демонстрировали большую горизонтальную и вертикальную исследовательскую активность в открытых рукавах лабиринта.

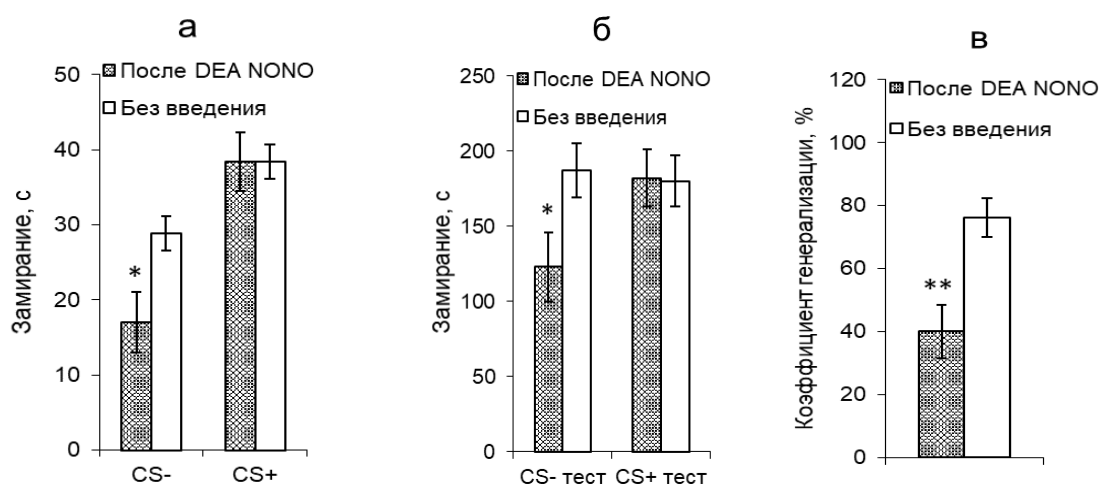


Рис. 9. а – время замирания на дифференцировочный (CS-) и условный (CS+) сигналы, б – время неподвижности (с) в межсигнальных интервалах во время дифференцировочной сессии (CS- тест) и реализации УРС (CS+ тест), в – коэффициент генерализации УРС (%) у животных, подвергавшихся (“После DEA NONO”) и не подвергавшихся (“Без введения”) во время выработки УРС введению в мПК 1 мМ DEA NONO. * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$ – при сравнении с этим показателем крыс группы “Без введения”.

Анализ поведения животных на этапе тестирования (экспериментальный день 2), что крысы группы “DEA NONO” характеризуются меньшей длительностью замирания на безопасный дифференцировочный сигнал (CS–) (рис. 9а; $t = 2.6$; $p = 0.02$), меньшим временем неподвижности в межсигнальных интервалах (рис. 9б; $t = 2.2$; $p = 0.04$) в ходе дифференцировочной сессии 2, а также меньшим коэффициентом генерализации УРС (рис. 9в; $t = 3.4$; $p = 0.003$) по сравнению с крысами группы “Без введения”. Однако животные групп “DEA NONO” и “Без введения” не различались по уровню замирания на потенциально опасный условный сигнал (CS+) ($t = 0.008$; $p = 0.99$) и по уровню неподвижности в межсигнальных интервалах ($t = 0.078$; $p = 0.94$) в ходе реализации УРС.

Полученные в этой части работы данные показывают, что длительная (210 мин) экзогенная нитрергическая стимуляция мПК локальным введением донора NO DEA (1 мМ) оказывает двухфазный эффект на активность серотониновой системы этой области, который проявляется в первоначальном увеличении уровня внеклеточного серотонина в мПК в ответ на введение DEA с последующим постепенным снижением этого показателя. Полученный результат согласуется с эффектами длительного введения DEA в мПК в нарастающих концентрациях (см. рис. 1), о чем написано выше. Сопоставление этих данных показывает, что важным фактором, влияющим на направленность действия экзогенной нитрергической стимуляции мПК в отношении активности серотониновой системы этой области является длительность такой стимуляции, в ходе которой активационные эффекты NO на уровень внеклеточного серотонина могут трансформироваться в тормозные.

Одним из проявлений тормозного действия NO на серотониновую нейротрансмиссию в мПК в этих экспериментах является показанное в работе NO-зависимое торможение функциональной активности серотониновой системы мПК, поскольку введение в эту область 1 мМ DEA NONO существенно снижает подъем уровня внеклеточного серотонина в мПК, вызываемый выработкой УРС. В работе продемонстрировано, что такие нейрохимические изменения, вызываемые введением DEA во время выработки УРС, уменьшают замирания животных на безопасный CS– в ходе дифференцировки 2, проводимой спустя сутки после введения DEA, но не влияют на замирание на потенциально опасный CS+. То есть снижение активности серотониновой системы под действием длительного введения DEA сопровождается впоследствии уменьшением генерализации УРС.

Следует подчеркнуть, что все эти результаты получены в условиях длительной экзогенной нитрергической стимуляции мПК. Вместе с тем, неизвестно, насколько такие закономерности длительного действия донора NO являются физиологически релевантными, и может ли эндогенный NO оказывать похожие влияния.

Влияния блокады эндогенных нитроергических сигналов в мПК в ходе выработки УРС на выброс серотонина в этой области и на формирование и генерализацию УРС

Животные экспериментальных групп не различались перед началом экспериментов по активности в тесте «Открытое поле». Введение в мПК животных группы «NPLA» ингибитора нейронной NO-синтазы NPLA (2 мМ) приводило к падению уровня внеклеточного серотонина в мПК относительно собственного фонового уровня (рис. 10; $F_{(9, 54)}=6.4$, $p<0.001$) и снижало подъемы уровня серотонина, вызываемые выработкой УРС и дифференцировкой 1 (рис. 10; $F_{(13, 210)}=1.8$, $p=0.04$, при сравнении с группой «Без введения»).

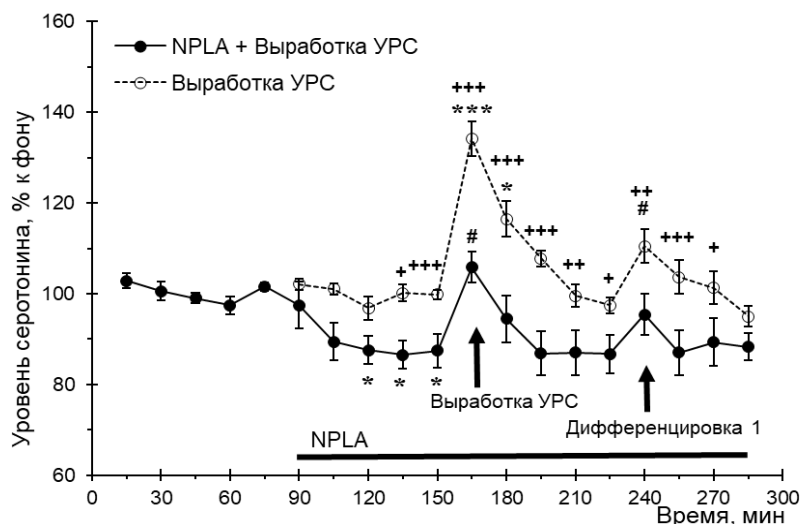


Рис. 10. Изменения уровня внеклеточного серотонина в мПК в ходе выработки УРС (CFR Training) и дифференцировки 1 (Differentiation 1) у крыс с введением (NPLA+CFR Training) и без введения (CFR Training) в мПК 2 мМ NPLA, ингибитора nNOS. По оси X – время, мин; по оси Y – уровень внеклеточного серотонина, % к фону; разброс на графике – стандартная ошибка среднего; черные стрелки – поведенческие тесты; горизонтальная линия – период введения NPLA. * – $p<0.05$; *** – $p<0.001$ – при сравнении с фоном; + – $p<0.05$; ++ – $p<0.01$; +++ – $p<0.001$ – при межгрупповом сравнении; # – $p<0.05$ – при сравнении с уровнем серотонина перед тестом

Введение крысам группы «NA» ингибитора NO-синтазы NA (0.5 мМ) в мПК также приводило к снижению базального уровня внеклеточного серотонина в мПК (рис. 11; $F_{(9, 81)}=17.2$, $p<0.001$). Во время выработки УРС и дифференцировки 1 уровень серотонина в мПК животных группы «NA» не отличался от фона перед введением NA ($t=2.2$, $p=1.00$); ($t=2.6$, $p=1.00$, соответственно), но повышался относительно уровня серотонина перед тестами ($t=7.0$, $p<0.001$; $t=7.0$, $p<0.001$), однако такой подъем был меньше по сравнению с крысами группы «Без введения» (рис. 11; $F_{(13, 252)}=3.6$, $p<0.001$). Крысы групп «NPLA» и «NA» не отличались друг от друга по динамике изменений уровня внеклеточного серотонина в ходе выработки УРС и дифференцировки 1 ($F_{(18, 285)}=1.2$, $p=0.3$).

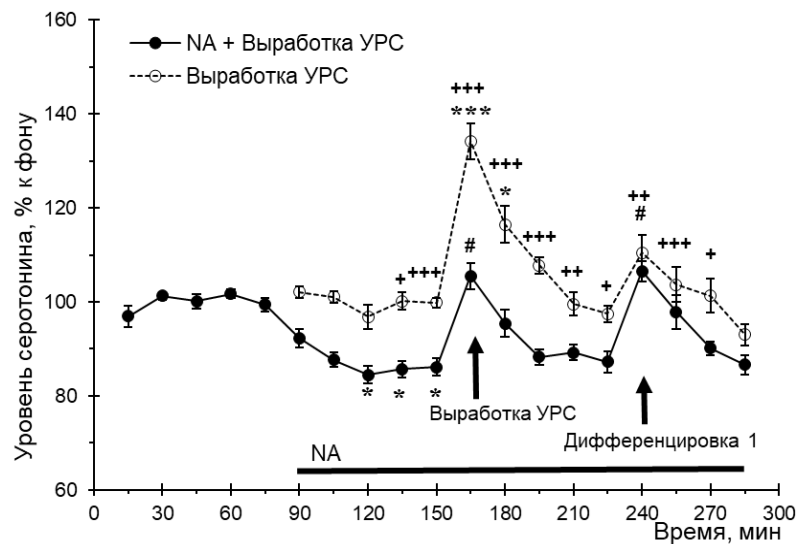


Рис. 11. Изменения уровня внеклеточного серотонина в мПК в ходе выработки УРС и дифференцировки 1 у крыс с введением и без введения в мПК 0.5 мМ NA, ингибитора NOS. ## – $p < 0.001$ – при сравнении с уровнем серотонина перед тестом. Остальные обозначения, как на рис. 10

Сравнение замиранья животных групп «NA», «NPLA» и «Без введения» во время выработки УРС показало, что крысы групп «NA» и «NPLA» не различались между собой по этому показателю (рис. 12; $t=0.4$, $p=0.7$), а также не отличались от крыс группы «Без введения» (рис. 12; соответственно, $t=0.9$, $p=0.4$ и $t=0.3$, $p=0.7$)

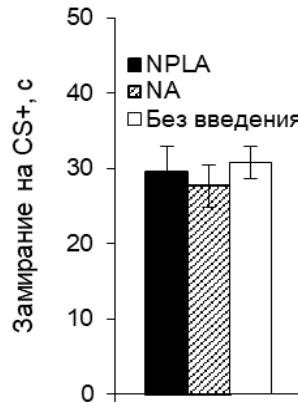


Рис. 12. Длительность замиранья на CS+, с во время выработки УРС у крыс с введениями в мПК 2мМ NPLA (группа «NPLA»), 0.5 мМ NA (группа «NA») и у животных, не подвергавшихся введениям препаратов («Без введения»)

У крыс групп «NA» и «NPLA» был зарегистрирован больший уровень замиранья на CS- (рис.13а) во время теста дифференцировка 1 по сравнению с животными группы «Без введения» (соответственно, $U=77.0$, $p=0.045$ и $U=11.0$, $p=0.02$), но животные групп «NA» и «NPLA» не различались между собой по величине этого параметра ($t = 0.7$, $p = 0.5$). В ходе дифференцировки 2 (тест на проявления генерализованного страха) крысы групп «NA» и «NPLA» больше замирали на CS- по сравнению с крысами группы «Без введения» (рис.13б;

$t=2.1$, $p=0.049$ и $t=4.8$, $p<0.001$), но не отличались между собой по этому показателю ($t = 1.9$, $p = 0.07$).

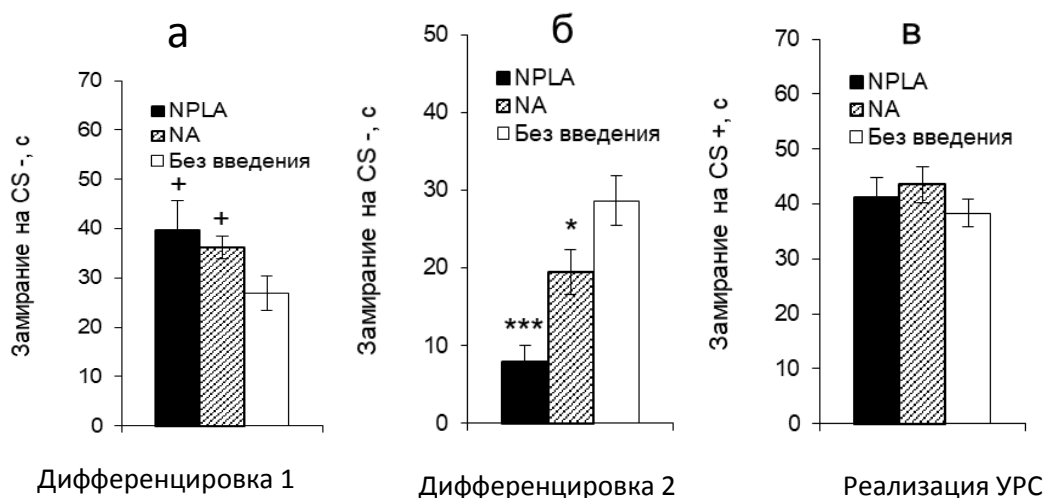


Рис. 13. Длительность замирания на CS- (а) во время дифференцировки 1 и (б) во время дифференцировки 2, а также (с) длительность замирания на CS+ в ходе реализации УРС у крыс, подвергавшихся в первый день экспериментов введениям в мПК 2 мМ NPLA (NPLA), 0.5 мМ NA (NA) и у животных без введения препаратов. (а, б) + – $p<0.05$; +++ – $p<0.001$ – при сравнении с животными без введения препаратов.

В ходе теста реализация УРС между тремя группами животных не было выявлено различий по длительности замирания на CS+ ($U=43.0$, $p = 0.5$ – при сравнении групп «NA» и «NPLA») $t=1.2$, $p=0.2$ и $t=0.7$, $p=0.5$ – при сравнении «NA» и «NPLA» с группой «Без введения»).

Сравнение поведения животных групп «NA», «NPLA» и «Без введения» по времени пребывания в открытых ($F_{(2, 24)}=0.81$, $p=0.45$) и закрытых ($F_{(2, 24)}=0.82$, $p=0.46$) рукавах лабиринта (рис.14а), а также по горизонтальной двигательной активности (рис.14б) в открытых ($F_{(2, 24)}=2.5$, $p=0.1$) и закрытых ($F_{(2, 24)}=2.9$, $p=0.08$) рукавах лабиринта не выявило различий по этим параметрам.

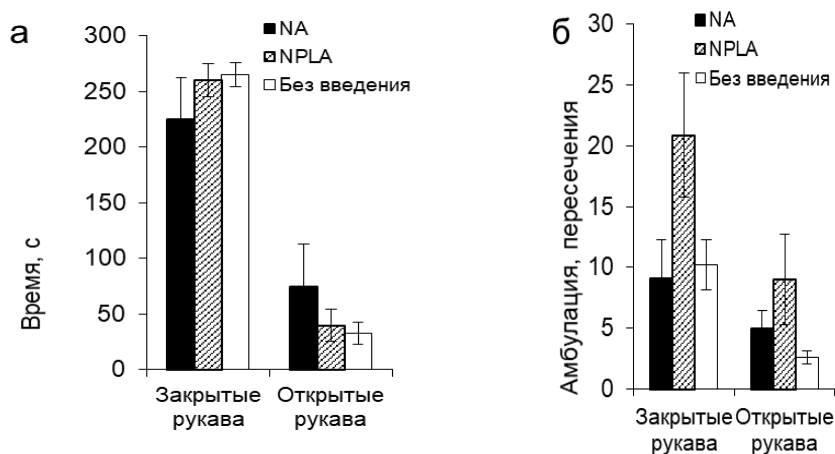


Рис. 14 (а) Время пребывания в открытых и закрытых рукавах с, (б) амбуляция, пересечения, в закрытых и открытых рукавах крестообразного лабиринта.

Результаты этого этапа работы демонстрируют, что в мПК эндогенный NO оказывает активационные влияния на базальную и вызванную выработкой УРС активность серотониновой системы этой области, отражающуюся в уровне внеклеточного серотонина. Об этом свидетельствует тот факт, что блокада нитрергической системы мПК локальными введениями NA снижает оба эти показателя. Такие эндогенные нитрергические влияния в основном, обусловлены активностью nNOS, поскольку введения в мПК ингибитора nNOS оказывает аналогичные эффекты на уровень внеклеточного серотонина в мПК.

Блокада NO-сигналов мПК введениями NA и NPLA приводит к увеличению времени замирания животных тесте дифференцировка 1, то есть усиливает первоначальную генерализацию УРС. Эти результаты согласуются с данными, полученными ранее моими коллегами, которые продемонстрировали тормозное влияние нитрергической активации на первоначальную генерализацию реакции страха (Саульская и др. 2016).

Через сутки после выработки УРС животные, накануне подвергавшиеся введениям NA и NPLA, напротив, демонстрировали снижение генерализации УРС. При этом животные с введениями и без введений NA и NPLA в мПК не отличались по показателям тревожности и двигательной активности в приподнятом крестообразном лабиринте. Эти данные позволяют предположить, что введения NA и NPLA способствуют более быстрому угасанию проявлений генерализованного страха, что возможно, связано с нарушением консолидации памяти о генерализованном страхе.

В предыдущих работах моих коллег было показано, что степень активации серотониновой системы мПК, оцениваемая по увеличению уровня внеклеточного серотонина в этой области во время выработки УРС, коррелирует с уровнем последующей генерализации страха: чем выше подъём уровня серотонина, тем сильнее проявления генерализованного страха. Таким образом, опираясь на эти результаты и на результаты, полученные в данных экспериментах, можно предположить, что такие эффекты блокады нитрергической передачи в мПК на уровень генерализации страха опосредованы снижением выброса серотонина в мПК во время выработки УРС, вызванным введениями NA и NPLA.

Сопоставление результатов этого и предыдущего разделов показывает, что направленность эффектов экзогенной нитрергической стимуляции мПК введением донора NO DEA (1мМ) лишь частично совпадает с активационным действием эндогенного NO на выброс серотонина в мПК. Сходство наблюдается только в самом начале введения DEA. Но на фоне длительного введения DEA активационные эффекты на выброс серотонина перерастают в тормозные, и в результате происходят противоположные по направленности

изменения серотонин-зависимого поведения. Все это свидетельствует, что длительная экзогенная нитрергическая стимуляция мПК высокими концентрациями донора NO, видимо, не всегда может быть использована в качестве адекватной модели нитрергической активации, отражающей NO-серотониновое взаимодействие в мПК в непатологических условиях, характеризующихся кратковременной и умеренной активацией нитрергической нейротрансмиссии. Вместе с тем, эти результаты показывают, что именно реакция серотониновой системы мПК на нитрергические сигналы определяет знак их влияний на генерализацию реакции страха.

Выводы

1. Введения в мПК донора NO (DEA) в концентрациях 0.1, 0.5 и 1 мМ приводят к дозозависимому повышению уровня внеклеточного серотонина в мПК в первые 15 мин введения препарата, а введение DEA в концентрации 2.5 мМ (после длительного введения более низких концентраций) и в концентрации 3 мМ приводит к быстрому снижению этого показателя. То есть эффект экзогенной нитрергической активации введениями донора NO в мПК зависит от дозы донора NO и длительности его введения.
2. Введение в мПК аргинина (1 мМ, 5 мМ), субстрата NOS, сопровождается увеличением уровня внеклеточного серотонина в мПК, что свидетельствует об активационном влиянии эндогенного NO мПК на серотониновую систему мПК.
3. Блокада синтеза NO в мПК введениями NA (0.5 мМ), ингибитора NOS, приводит к снижению уровня внеклеточного серотонина в этой области, а также к уменьшению подъёма этого показателя, вызванного введением флуоксетина, ингибитора обратного захвата серотонина. Эти результаты, совместно с данными, приведенными в выводе 2 свидетельствуют, что серотониновая система мПК находится под тоническими активационными влияниями эндогенного NO, которые, в частности, могут усиливать эффективность локального фармакологического действия флуоксетина.
4. Длительное введение в мПК донора NO – DEA (1 мМ) вызывает кратковременное увеличение уровня внеклеточного серотонина в мПК в начале введения препарата с последующим постепенным снижением этого показателя, и на фоне такого снижения уменьшает функциональный подъём уровня внеклеточного серотонина в мПК, вызываемый выработкой УРС, а также снижает через сутки генерализацию УРС (замирание на безопасный CS-). Эти данные свидетельствуют, что длительная экзогенная нитрергическая стимуляция мПК тормозит функциональную активность серотониновой системы этой области коры во время выработки УРС и может оказывать

тормозное влияние на степень последующей генерализации этой условнорефлекторной реакции.

5. Введения в мПК селективного ингибитора нейронной NO-синтазы – NPLA (2 мМ) и ингибитора NO-синтазы – NA (0.5 мМ) в ходе выработки УРС приводят: к уменьшению базального уровня внеклеточного серотонина в мПК; к снижению функционального подъема этого показателя, вызываемого выработкой УРС; и к селективному уменьшению через сутки после введений проявлений генерализованного страха (замирание на безопасный CS-, но не потенциально опасный CS+). То есть блокада NO-синтазы и селективная блокада нейронной NO-синтазы действуют однонаправленно в отношении активности серотониновой системы мПК и поведенческих эффектов, отражающих степень генерализации условнорефлекторной реакции страха. Это означает, что основным источником нитрергической регуляции базального и функционального высвобождения серотонина в мПК является эндогенный NO нейронного происхождения.

Заключение

Участие NO-серотонинового взаимодействия в ЦНС в обеспечении реакции на стресс и в формировании страха, тревожности и депрессивно-подобных состояний привлекает в настоящее время большое внимание исследователей (Eshaghi et al. 2019, Narkin et al 2003). В частности, показана важная роль долгосрочной активации pNOS ядер шва в регуляции активности серотониновой системы этой области в модели посттравматического стрессового расстройства, сопровождающейся усилением условнорефлекторного страха и его генерализации (Sun et al. 2021), продемонстрирована роль физического связывания pNOS и транспортеров серотонина в ядрах шва в развитии депрессивно-подобных состояний (Sun et al. 2022), продемонстрирована эффективность системных введений ингибиторов NOS в подавлении побочных анксиогенных эффектов флуоксетина в модели посттравматического стрессового расстройства (Sadeghi et al. 2023), о чем было сказано выше. Однако существование локального NO-серотонинового взаимодействия в мПК и его участие в генерализации реакции страха ранее не подвергались исследованиям. Результаты этой работы впервые демонстрируют, что в мПК эндогенный NO оказывает активационные влияния на серотониновую нейротрансмиссию в этой области. Об этом свидетельствует подъем базального уровня внеклеточного серотонина в мПК в ответ на введения в мПК субстрата NO-

синтазы аргинина (0.1 – 5 мМ) и падение этого показателя при введении в мПК селективного ингибитора nNOS NPLA (2 мМ) или ингибитора NO-синтазы – NA (0.5 мМ).

Еще одним важным результатом работы являются полученные данные, демонстрирующие, что эндогенный NO нейронного происхождения играет роль в регуляции функционального выброса серотонина в мПК, вызываемого выработкой УРС, поскольку блокада NO-системы мПК введениями ингибиторов nNOS приводит к снижению этого показателя, а также снижает через сутки генерализацию этой условнорефлекторной реакции. Ранее упоминалось, что выработка УРС сопровождается подъёмом уровня внеклеточного серотонина в мПК, и такой подъём положительно коррелирует со степенью будущей генерализации страха. Эти результаты, рассмотренные вместе с данными, полученными в настоящем исследовании свидетельствуют, что одним из механизмов NO-зависимого контроля генерализации страха могут быть активационные влияния эндогенной нитререгической активации мПК на серотониновую систему мПК в ходе выработки УРС.

Полученные в работе новые данные о локальных активационных влияниях эндогенного NO нейронного происхождения на вызываемую выработкой условной реакции страха активность серотониновой системы мПК и на генерализацию этой условнорефлекторной реакции вносят вклад в понимание нейрхимических и структурных механизмов формирования генерализованного страха. Результаты работы могут быть полезны при разработке подходов коррекции поведенческих расстройств, связанных с последствиями стресса и страха.

Список публикаций по результатам работы

Список ВАК

1. Саульская Н.Б., **Бурмакина (Сусорова) М.А.**, Трофимова Н.А. 2021. Оксид азота тормозит функциональную активацию серотониновой системы медиальной префронтальной коры при формировании страха и уменьшает его генерализацию// Нейрхимия. – 2021.– Т. 38, № 3.– С.249 – 256.
2. Саульская Н.Б., **Бурмакина (Сусорова) М.А.**, Трофимова Н.А. 2022. Влияние активации и блокады нитрергической нейротрансмиссии на активность серотониновой

системы медиальной префронтальной коры мозга крыс. Российский физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2022. – Т. 108, № 3. – С. 369 – 378.

Иные издания

3. **Пузанова (Сусорова) М.А.**, Трофимова Н.А., Саульская Н.Б. Влияние оксида азота на серотониновую нейротрансмиссию в префронтальной коре// Тезисы докладов Всероссийской конференции с международным участием «Интегративная физиология», посвященной 170-летию со дня рождения И.П. Павлова, институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, 2019. – С. 206 – 207.
4. **Пузанова (Сусорова) М.А.** «Влияние блокады синтеза NO на активность серотонинергической системы медиальной префронтальной коры». Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2020», МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, 2020.
5. **Бурмакина (Сусорова) М. А.**, Трофимова Н. А, «Влияние активации NO-системы на серотониновую трансмиссию в медиальной префронтальной коре при выработке и генерализации условнорефлекторной реакции страха», материалы XXVII всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины-2021», Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, 2021. – С. 155 – 156.
6. **Бурмакина (Сусорова) М. А.**, «NO-серотониновое взаимодействие в медиальной префронтальной коре при формировании генерализованного страха», материалы международного молодёжного научного форума «Ломоносов-2021», МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, 2021.
7. **Бурмакина (Сусорова) М. А.**, «Активность серотониновой системы медиальной префронтальной коры и проявления генерализованного страха в условиях введения донора NO», материалы XXIV международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек

- и его здоровье», Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 2021.
8. **Бурмакина (Сусорова) М. А.**, Трофимова Н. А., Саульская Н. Б. «Стимуляция нитрергической системы медиальной префронтальной коры: влияние на серотониновую трансмиссию и генерализацию условнорефлекторного страха», сборник трудов XXV научной школы-конференции молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии, Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, 2021. – С. 52 – 56.
 9. **Саульская Н.Б., Бурмакина (Сусорова) М.А.**, Трофимова Н.А. «NO -серотониновое взаимодействие в медиальной префронтальной коре при формировании генерализованного страха», Тезисы докладов Всероссийской конференции с международным участием «Интегративная физиология-2021», Институт Физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, 2021. – С. 136.
 10. **Бурмакина (Сусорова) М. А.** «NO регулирует выброс серотонина в медиальной префронтальной коре», материалы международного молодёжного научного форума «Ломоносов-2022», МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, 2022.
 11. **Бурмакина (Сусорова) М. А.**, Трофимова Н. А., Саульская Н. Б. «Активность серотониновой системы медиальной префронтальной коры в условиях стимуляции и блокады NO-сигналов», тезисы участников XXV научной школы-конференции молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии, часть II, Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, 2022. – С.15 – 17
 12. **Бурмакина (Сусорова) М. А.**, «Влияние эндогенных и экзогенных NO-сигналов на серотониновую трансмиссию в медиальной префронтальной коре», материалы XXIX всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины-2023», Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, 2023. – С. 145.

