

СУСОРОВА МАРИЯ АНДРЕЕВНА

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

1.5.5 – Физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой
степени кандидата биологических
наук

Работа выполнена в группе нейрoхимии высшей нервной деятельности Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской Академии Наук.

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент
Саульская Наталья Борисовна

Официальные оппоненты:

Крупина Наталия Александровна,
доктор биологических наук, главный
научный сотрудник лаборатории общей
патологии нервной системы
ФГБНУ «Научно-исследовательский
институт общей патологии и
патофизиологии»

Абдурасулова Ирина Николаевна,
кандидат биологических наук,
заведующая лабораторией
нейробиологии интегративных функций
мозга ФГБНУ
«Институт экспериментальной
медицины»

Ведущая организация:

Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
«Институт высшей нервной
деятельности и нейрофизиологии
Российской академии наук»

Защита диссертации состоится «___» _____ 2025 года в _____
на заседании Диссертационного совета 24. 1. 137. 01 по защите докторских и кандидатских
диссертаций при ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН (199034, Санкт-Петербург,
наб. Макарова, д.6)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУН Институт физиологии им.
И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург, наб. Макарова, д.6) и на сайте <http://www.infran.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2025 года.

Ученый секретарь Диссертационного совета
кандидат биологических наук

Иванова Галина Тажимовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Изучение новых нейрофизиологических механизмов регуляции страха является актуальной проблемой современной нейрофизиологии, поскольку нарушения такой регуляции характеризует ряд социально значимых заболеваний (Kessler et al. 2005). Новым быстроразвивающимся направлением в рамках этой проблемы является исследование нейромедиаторных и структурных механизмов генерализации страха – феномена, выражающегося в проявлении страха не только в опасных, но и в безопасных обстоятельствах. Умеренная генерализация страха необходима и носит адаптивный характер (Sun et al. 2023), поскольку позволяет использовать ранее полученный негативный опыт в сходных ситуациях, расширяя сферу его применения (Fraunfelter et al. 2022; Webler et al. 2021). Однако чрезмерная и стойкая генерализация страха дисфункциональна и занимает одно из центральных мест в симптоматике различных психиатрических расстройств, таких как посттравматическое стрессовое расстройство, обсессивно-компульсивное расстройство, генерализованное тревожное расстройство, разного рода фобии др. (Fraunfelter et al. 2022). Все это определяет актуальность поиска ранее неизвестных путей влияния на генерализацию страха.

Основной моделью изучения памяти об авersiveных событиях, лежащей в основе страха, является условнорефлекторная реакция страха (УРС), которая вырабатывается в результате сочетания нейтрального условного сигнала и авersiveного стимула – неизбежного электрокожного раздражения (Maren 2001). Сформированная в ходе такого обучения УРС проявляется в запуске ряда врожденных защитных реакций (реакций страха) при предъявлении условного сигнала, ассоциируемого с авersiveным стимулом. В исследованиях на грызунах в качестве показателя страха чаще всего используют реакцию замирания.

За формирование и проявления УРС отвечает сеть взаимосвязанных структур головного мозга, которые вместе образуют внутримозговую систему страха (Tovote et al. 2015). Одной из ключевых областей этой системы является медиальная префронтальная кора (mPFC) (Dixsaute, Gräff 2021; Sung, Kaang 2022). mPFC играет важную роль в формировании некоторых форм УРС (УРС на фоновые обстановочные сигналы, следовые и отсроченные УРС) (Gilmartin et al. 2014; Gilmartin, Helmstetter 2010), в поддержании и угашении УРС (Burgos-Robles et al. 2009; Kim et al. 2013), а также участвует в контроле генерализации УРС (Rozeske et al. 2018; Sangha et al. 2020; Саульская 2018).

На функционирование структур, образующих внутримозговую систему страха, значительное влияние оказывает серотониновая регуляция (Bauer 2015). Литературные и наши данные свидетельствуют об участии серотониновых сигналов в mPFC в формировании и в контроле проявлений УРС (Almada et al. 2015; León et al. 2017; Саульская и др. 2020). Недавние исследования нашей группы продемонстрировали влияние серотониновых сигналов mPFC на генерализацию УРС, показав, что естественное или фармакологическое усиление выброса серотонина в mPFC во время выработки УРС приводит к усилению генерализации УРС через сутки (Саульская, Марчук 2018; Саульская, Марчук 2019).

Еще одной нейромодуляторной системой mPFC, вовлекаемой, по данным моих коллег, в генерализацию УРС, является нитергическая система этой области. А именно, ими было

установлено, что выработка УРС усиливает активность нитрергической системы mPFC, и уровень такой активации влияет на степень первоначальной генерализации УРС (Саульская, Судоргина 2015). В mPFC существует несколько источников NO (Paul et al. 1995; Gartside et al. 2020; Lu et al. 2010). Важнейшими из них являются ГАМК-ергические NO-продуцирующие интернейроны mPFC (Gabbott et al. 2006), а также серотонинергические волокна, приходящие из ядер шва. В последних нейронная NO-синтаза (nNOS) колокализована с маркерами серотониновой нейротрансмиссии – белками Trh (триптофангидроксилаза, фермент синтеза серотонина) и SERT (транспортер серотонина, обеспечивающий его обратный захват) (Gartside et al. 2020; Lu et al. 2010). Эти данные позволяют предполагать существование локального NO-серотонинового взаимодействия в mPFC, возможно, обеспечивающего согласованное участие серотониновой и нитрергической систем этой области в контроле генерализации УРС.

Степень разработанности темы исследования: В литературе нет сведений о локальных влияниях нитрергических сигналов в mPFC на активность ее серотониновой системы и о роли таких влияний в организации функций mPFC. Вместе с тем, для других отделов головного мозга и для мозга в целом такие данные существуют (Ghasemi et al. 2019; Wegener, Joca 2023). Так, эксперименты с системными введениями ингибитора NO-синтазы (NOS) (Karolewicz et al. 1999), а также использование мышей с нокаутом nNOS (Chiavegatto et al. 2001), показали, что такая блокада продукции NO сопровождается повышением тканевого уровня серотонина и снижением его метаболизма в нескольких областях мозга, вовлеченных в регуляцию эмоций, таких как неокортекс, гипоталамус, гиппокамп и миндалина. Интересно, что по данным другого исследования, такие животные (с генным нокаутом nNOS) демонстрируют повышенную генерализацию УРС (Pavesi et al. 2013). Т. е. можно предположить, что влияние недостатка NO в ЦНС на генерализацию УРС может быть отчасти опосредовано изменённой активностью серотониновой системы ЦНС.

Кроме того, прижизненные исследования, показали, что введение донора NO S-нитрозо-N-пенициламина (SNAP) в ядра шва снижает в них высвобождение серотонина, но увеличивает его высвобождение во фронтальной коре (Smith, Whitton 2000). Показано, что локальное введение SNAP вызывает увеличение уровня серотонина в полосатом теле (Trabace, Kendrick 2000). К такому же активационному эффекту приводит стимуляция нитрергической передачи в медиальной преоптической области введением аргинина, усиливающая выброс серотонина в этой области мозга (Ghasemi et al. 2019). Согласно другим данным, системное введение и введение в гиппокамп ингибитора nNOS увеличивает внеклеточный уровень серотонина в этой структуре (Segieth et al. 2001; Wegener et al. 2000). При этом введение предшественника NO L-аргинина приводит к снижению уровня серотонина в гиппокампе (Wegener et al. 2000), но увеличивает его в стриатуме (Strasser et al. 1994). Таким образом, нитрергические сигналы по-разному влияют на выброс серотонина в различных регионах мозга. Но неизвестно, какое действие они оказывают на этот показатель в mPFC.

В ряде исследований показан не только факт взаимодействия нитрергической и серотонинергической систем, но и функциональная роль такого взаимодействия в различных моделях аффективных и стрессовых расстройств. Результаты исследования (Sun et al. 2022)

демонстрируют, что вследствие хронического стресса наблюдается усиленное образование комплексов SERT с nNOS в дорсальном ядре шва (DRN) мышей, что приводит к проявлениям депрессивно-подобного состояния. Причем разрушение таких комплексов в DRN сопровождается снижением проявлений депрессии, как полагают авторы, за счет подавления активности 5HT_{1A}-ауторецепторов и повышения базального уровня серотонина в амигдале и mPFC (Sun et al. 2022). В другой работе этих же авторов показано, что продолжительный стресс приводит к повышенной экспрессии nNOS в ядрах шва и, следовательно, к повышенной продукции NO, что ослабляет активность серотониновых нейронов в DRN. Такие изменения сопровождаются усилением условнорефлекторного страха и его генерализации (Sun et al. 2021). В модели посттравматического стрессового расстройства продемонстрирована эффективность системных введений ингибиторов NOS в подавлении побочных анксиогенных эффектов флуоксетина в первые дни применения этого препарата (Sadeghi et al. 2023). Показаны антидепрессантные эффекты системных введений NOS в тесте на принудительное плавание, которые являлись серотонин-зависимыми, поскольку блокировались введением ингибитора Trp – параклорфенилаланина (Harkin et al. 2003).

Есть данные о возможном вкладе NO-серотонинергического взаимодействия в контроль проявлений агрессии (Chiavegatto et al. 2001). А именно, показано, что чрезмерная агрессивность и импульсивность у мышей с нокаутом nNO-синтазы сопровождается увеличением тканевого уровня серотонина и снижением его метаболизма (Chiavegatto et al. 2001), а во фронтальной коре крыс высокоагрессивной линии выявлено увеличение индекса метаболизма серотонина по сравнению с крысами линии ручных крыс и установлена обратная взаимосвязь между этим индексом и экспрессией nNOS (Правикова и др. 2024).

Таким образом, литературные данные свидетельствуют о влиянии NO на активность серотониновых систем нескольких регионов мозга. Но знак таких локальных NO-серотониновых влияний разнится от структуры к структуре, и это затрудняет экстраполяцию показанных закономерностей на другие отделы мозга. При этом в литературе отсутствуют сведения о том, влияют ли локальные нитрергические сигналы mPFC на выброс серотонина в этой области коры и, если да, то каков знак таких влияний и участвует ли такое локальное NO-серотониновое взаимодействие в обеспечении функций mPFC, связанных с формированием и генерализацией условной реакции страха. Представленная работа посвящена выяснению этих вопросов.

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

Задачи исследования:

1. Охарактеризовать изменения уровня внеклеточного серотонина в mPFC в ходе введений в mPFC субстрата NO-синтазы аргинина (0.1, 1 и 5 mM).
2. Исследовать изменения уровня внеклеточного серотонина в mPFC, вызываемые введениями в mPFC донора NO – диэтиламин моноата (DEA, 0.1 – 3 mM).

3. Изучить влияние введений в mPFC ингибитора NO-синтазы (NOS) – N-нитро-L-аргинина (NA, 0.5 мМ) на фоновый уровень внеклеточного серотонина mPFC, а также на подъем этого уровня, вызванный введениями в mPFC флуоксетина (10 мкМ) – селективного ингибитора обратного захвата серотонина.
4. Оценить влияние введений в mPFC селективного ингибитора нейронной NO-синтазы (nNOS) – Nω-пропил-L-аргинина (NPLA, 2 мМ) на выброс серотонина в mPFC, вызываемый выработкой УРС, а также на последующую генерализацию этой условнорефлекторной реакции.
5. Исследовать влияние введений в mPFC ингибитора NOS – N-нитро-L-аргинина (NA, 0.5 мМ) на выброс серотонина в mPFC, вызываемый формированием УРС, а также на ее последующую генерализацию.
6. Изучить влияние введений в mPFC во время выработки УРС донора NO (DEA, 1 мМ) на выброс серотонина в mPFC, вызываемый выработкой УРС, а также на последующую генерализацию этой условнорефлекторной реакции.

Положения, выносимые на защиту:

1. Эндогенный NO модулирует активность серотониновой системы mPFC, оказывая активационные влияния на базальный выброс серотонина в этой области. Такие влияния выражаются в снижении уровня внеклеточного серотонина в mPFC в ответ на локальные введения ингибиторов NO-синтазы, а также в дозозависимом увеличении этого показателя при введении в mPFC аргинина – субстрата NO-синтазы. Локальная экзогенная нитрергическая стимуляция mPFC введением в эту область донора NO – DEA воспроизводит эффекты эндогенной нитрергической стимуляции этой области в начале введения препарата, оказывая дозозависимое активационное влияние на выброс серотонина в mPFC.
2. В ходе выработки УРС эндогенный NO нейронного происхождения оказывает активационные влияния на функциональный выброс серотонина в mPFC, вызываемый выработкой УРС, и усиливает через сутки генерализацию этой условнорефлекторной реакции, возможно, за счет активации серотониновой нейротрансмиссии в mPFC.

Научная новизна работы. В работе впервые показаны влияния локальных эндогенных и экзогенных нитрергических сигналов mPFC на активность серотониновой системы этой области и впервые продемонстрирован возможный вклад таких влияний в регуляцию генерализации УРС. А именно, получены ранее неизвестные данные, демонстрирующие, что эндогенная активация нитрергической системы mPFC локальными введениями предшественника NO аргинина (0.1мМ, 1 мМ, 5 мМ) увеличивает уровень внеклеточного серотонина в mPFC, и этот эффект характеризуется дозозависимостью в диапазоне концентраций аргинина 0.1мМ –1 мМ. Впервые установлено, что введения в mPFC NA (0.5 мМ) задерживают и ослабляют подъем уровня внеклеточного серотонина в mPFC, вызываемый локальным введением ингибитора обратного захвата серотонина флуоксетина. Впервые показаны тормозные влияния блокады нитрергической передачи mPFC (локальными введениями NA (0.5 мМ) и NPLA (2 мМ)) на базальный выброс серотонина в этой области коры, оцениваемый по изменениям уровня внеклеточного серотонина.

Получены новые данные, что активация нитрергической системы mPFC локальными введениями донора NO – диэтиламин моноата (DEA) в концентрациях 0,1, 0,5 и 1 мМ приводит к дозозависимому повышению уровня внеклеточного серотонина в mPFC в первые 15 мин введения препарата с последующим постепенным снижением этого показателя при введении 1 мМ DEA, а введение 3 мМ DEA вызывает лишь кратковременную активацию выброса серотонина в mPFC с быстрым падением этого показателя ниже фоновых значений уже через 15 мин после начала введения. Впервые установлено, что введение блокаторов nNOS и NOS (NPLA, 2 мМ и NA, 0,5 мМ) во время выработки УРС снижает выброс серотонина в mPFC, вызываемый выработкой УРС, и уменьшает генерализацию УРС через сутки после введений препаратов, т.е. способствует быстрому угасанию генерализованных проявлений страха. Получены ранее неизвестные факты, что длительная экзогенная нитрергическая стимуляция mPFC введениями в эту область донора NO DEA (1 мМ) приводит через 60 мин после начала введения к торможению функционального выброса серотонина в mPFC, вызываемого выработкой УРС и уменьшает через сутки генерализацию УРС.

Теоретическое и практическое значение работы. Представленная работа выполнена в русле одной из фундаментальных проблем современной нейрофизиологии, связанной с исследованием нейрoхимического обеспечения и структурных механизмов формирования и генерализации негативных эмоциональных состояний. Впервые полученные в ней данные об активационных влияниях эндогенного NO в mPFC на выброс серотонина в этой области расширяют имеющиеся представления о процессах локальной регуляции серотониновой нейротрансмиссии в mPFC, демонстрируя новый путь такой регуляции, основанный на локальном NO-серотониновом взаимодействии. Данные, свидетельствующие, что этот механизм контролирует согласованные изменения активностей серотониновой и нитрергической систем этой области при формировании УРС и может вносить вклад в ее генерализацию, важны для понимания процессов, лежащих в основе генерализации реакций страха в норме, и могут быть полезны при разработке подходов коррекции генерализованного страха при психопатологии. Результаты, демонстрирующие, что введения ингибиторов NOS и nNOS в mPFC способствуют быстрому угасанию генерализованных проявлений УРС необходимо учитывать при фармакологическом использовании этих препаратов.

Апробация работы. Основные результаты работы были доложены на XXIV съезде физиологического общества им. И. П. Павлова (Санкт-Петербург 2023), всероссийской конференции с международным участием «Интегративная физиология» (Санкт-Петербург 2019, 2021, 2022, 2023) XXVIII, XXIX, XXXI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва 2021, 2022, 2024), XXVII, XXIX, XXX Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины» (Санкт-Петербург 2021, 2023, 2024), XXV, XXVI, XXVII научной школе-конференции молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии (Москва 2021, 2022, 2023), XXVI, XXVII Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург 2023, 2024).

Публикации. По теме работы опубликовано 20 научных работ: 3 статьи в журналах списка ВАК, 1 статья в журнале, индексируемом в РИНЦ и 16 тезисов.

Личный вклад автора. Научные результаты, представленные в работе, получены автором самостоятельно или с его личным участием. Автор самостоятельно проводил операции по имплантации диализной канюли и хроматографический анализ диализата на содержание серотонина, участвовал в проведении поведенческих экспериментов, сочетавшихся с микродиализом, в морфологических исследованиях по определению положения канюли, в статистической обработке данных, обсуждении результатов и написании статей.

Структура и объём диссертации. Диссертация содержит разделы введения, обзора литературы, описания использовавшихся в ходе исследования методов, результатов работы, а также их обсуждения, и завершается перечислением выводов и списком литературы. Диссертация изложена на 111 страницах печатного текста, включает 28 рисунков, 1 таблицу и 1 схему. Список литературы содержит 378 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на крысах-самцах линии Спрег-Дули массой 270 – 420 гр. (возраст 3–4 месяца) с использованием методов прижизненного внутримозгового микродиализа и ВЭЖХ с электрохимической детекцией. Крысам под общим наркозом (Рометар, 1,4 мг/100 г и золетил, 5 мг/100 г, внутримышечно) унилатерально в правую mPFC имплантировали диализные канюли. Микродиализные эксперименты начинали на второй день после имплантации канюли и проводили следующим образом. Животное помещали в дневную домашнюю клетку и к входу канюли подключали диализный насос, прокачивающий искусственную спинномозговую жидкость (ИСМЖ). После стабилизационного периода (60 мин) начинали сбор нескольких фоновых порций диализата. Затем животных разделяли на группы. Для введения в mPFC фармакологических препаратов к входу канюли подключали другой насос, прокачивающий смесь ИСМЖ и необходимого препарата. Порции диализата собирали на протяжении всего эксперимента каждые 15 мин и анализировали на уровень внеклеточного серотонина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (Саульская, Марчук 2019).

В экспериментах были использованы следующие вещества: Натриевая соль диэтиламина ноноата (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 NOS, флуоксетин (FLU, 10 мкМ, «Sigma», США) – селективный ингибитор обратного захвата серотонина, L-аргинин (R, 0.1, 1 и 5 мМ) – субстрат NO-синтазы.

Изучение влияния локальной нитергической стимуляции mPFC на уровень внеклеточного серотонина в этой области

После сбора фоновых порций диализата 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=8) в ИСМЖ для перфузии mPFC добавляли DEA в концентрации 1 мМ, а крысам группы «3 мМ DEA» (n=8) в ИСМЖ добавляли DEA в концентрации 3 мМ. Затем у животных каждой из этих групп собирали по 4 порции диализа. После этого с животным групп «0.1 мМ R», «1мМ R», «5 мМ R», «1мМ 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 1 ч каждая концентрация). В ходе введения каждой концентрации препарата собирали по 4 порции диализата.

Изучение влияния локальной блокады нитергической передачи на уровень внеклеточного серотонина в mPFC

После сбора фоновых порций диализата животных разделили на 2 группы. Животным группы FLU (n = 9) в ИСМЖ 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 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.

Изучение влияния активации и блокады нитергической системы mPFC 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 в установке «Открытое поле» (10 мин) для определения исходного уровня исследовательской активности (горизонтальные перемещения, стойки). Затем начинали микродиализные эксперименты. После сбора фоновых порций диализата крыс разделяли на 4 группы: «DEA NONO» (n=9), «NA» (n=10), «NPLA» (n=7) и «Без введения» (n=10). Крысам группы «DEA NONO» в ИСМЖ для перфузии mPFC добавляли донор NO DEA (1 мМ) и собирали 3 порции диализата. Крысам группы «NA» в ИСМЖ для перфузии mPFC добавляли ингибитор NO-синтазы NA (0.5 мМ) а крысам группы «NPLA» – селективный ингибитор нейронной NO синтазы (NPLA (2 мМ) и собирали по 5 образцов диализата. Затем у животных всех групп вырабатывали УРС с дискриминационным компонентом. Сначала крысу на 5 мин помещали в условнорефлекторную камеру и предъявляли условный сигнал (CS+, непрерывный тон, 1000 Гц, 10 сек) в сочетании с электрокожным раздражением лап (0.5 мА, 1сек, 5 сочетаний с интервалом 1 мин). Через 70 мин проводили дифференцировочную сессию 1 (дифференцировка 1): крысу помещали в дифференцировочную камеру на 5 мин и предъявляли звуковой дифференцировочный сигнал (CS-, прерывистый тон, 1000 Гц, 10 сек) – 5 раз с интервалом 1 мин. С крысами группы «Без введения» проводили такие же процедуры, но без фармакологического воздействия. В ходе тестов регистрировали время замирания (сек) на CS+ и CS- (показатель страха).

Во второй экспериментальный день крыс всех групп тестировали в установке «Приподнятый крестообразный лабиринт» для определения показателей тревожности и двигательной активности. После этого начинали диализную перфузию mPFC. Целью второго дня было тестирование на выработанность УРС и на генерализацию УРС. После сбора фоновых

порций диализата проводили дифференцировочную сессию 2 (дифференцировка 2) так же, как дифференцировочную сессию 1. Через 70 мин животных тестировали на выработанность УРС: крыс помещали в условную камеру на 5 мин и предъявляли CS+ так же как во время выработки УРС, но без электрокожного раздражения, после чего собирали 5 порций диализата. Во время тестов регистрировали время замирания животных (сек) на CS+ и CS-.

В отдельных экспериментах исследовали влияние введений в mPFC DEA, NA и NPLA на чувствительность крыс к электрокожному раздражению, как ранее описано (Саульская, Марчук 2019).

Морфологический контроль. По завершении экспериментов животным внутрибрюшинно вводили летальную дозу уретана (1мг/кг), мозг извлекали и помещали в 10% раствор формалина для фиксации. После этого определяли положение диализных канюль на фронтальных срезах мозга. В статистическую обработку включали крыс с локализацией канюль в mPFC.

Статистическая обработка данных. Для статистической обработки использовали пакет SigmaStat (3.0). Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Выборки проверяли на нормальность распределения по методу Колмогорова-Смирнова. Изменения уровня внеклеточного серотонина по сравнению с собственным фоном оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (F-критерий) и t-критерия Бонферрони для апостериорного сравнения, если данные соответствовали нормальному распределению. Если данные не соответствовали нормальному распределению, использовали непараметрический дисперсионный анализ для повторяющихся замеров Фридмана (Хи-квадрат) и критерий Ньюмана-Килса для апостериорного анализа. Для межгруппового сравнения использовали двухфакторный дисперсионный анализ (F-критерий) и апостериорный анализ по t-критерию Бонферрони. Для межгруппового сравнения средних уровней внеклеточного серотонина за весь период введения разных концентраций препарата использовали непараметрический однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллеса (H-критерий) и q-критерий Данна для апостериорного сравнения. Парное сравнение поведенческих параметров осуществляли с использованием t-критерия Стьюдента – для нормальных распределений и с помощью U-критерия Манна–Уитни – для распределений, не соответствующих критериям нормальности. Коэффициент корреляции вычисляли по методу Пирсона.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние локальной нитрергической стимуляции на уровень внеклеточного серотонина в mPFC

Введение субстрата NO-синтазы L-аргинина в концентрации 0,1 мМ в mPFC животным группы «0,1 мМ R» не вызывало значимых изменений уровня внеклеточного серотонина в mPFC в отдельных временных точках относительно фонового уровня ($F_{(9,44)} = 0.8$, $p = 0.6$) (рис. 1). Однако средний уровень внеклеточного серотонина за весь период введения препарата у крыс группы «0,1 мМ R» был достоверно выше собственных фоновых значений ($t = 2.49$, $p = 0.016$). Введение 1 мМ аргинина животным группы «1 мМ R» повышало уровень внеклеточного

серотонина в mPFC (рис. 1; $\chi^2 = 41.96$, $p < 0.001$) с максимальным подъемом $137 \pm 8\%$ в первые 15 мин введения относительно фона. Введение 5 мМ аргинина крысам группы «5 мМ R» повышало уровень внеклеточного серотонина в mPFC ($F_{(9,45)} = 8.8$, $p < 0.001$, рис. 1) с максимальным подъемом $125 \pm 6\%$ в первые 15 мин введения.

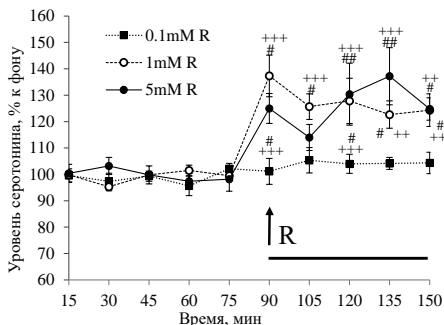


Рисунок 1. Изменения уровня внеклеточного серотонина в mPFC крыс с введениями в mPFC 0,1 мМ, 1 мМ и 5 мМ аргинина (группы «0.1 мМ R», «1 мМ R» и «5 мМ R»). Черная стрелка — начало введения R. Разброс на графиках – ошибка среднего. # – $p < 0.05$; ## – $p < 0.001$ – при сравнении с фоном; ++ – $p < 0.01$; +++ – $p < 0.001$ – при сравнении с введением 0.1 мМ R.

Двухфакторный дисперсионный анализ показал, что крысы групп «5 мМ R» и «1 мМ R» отличались от крыс группы «0.1 мМ R» по динамике изменений уровня внеклеточного серотонина в mPFC в ходе введения аргинина (рис. 1; $F_{(9,100)} = 5.1$, $p < 0.001$ — при сравнении групп «1 мМ R» и «0.1 мМ R»; $F_{(9,100)} = 4.3$, $p < 0.001$ – при сравнении групп «5 мМ R» и «0.1 мМ R»).

Межгрупповое сравнение средних значений (за весь период введения аргинина) уровня серотонина, а также их сравнение с фоновыми значениями в ходе однофакторного дисперсионного анализа подтвердило влияние концентрации аргинина на уровень серотонина ($H = 105.1$, $p < 0.001$). По данным апостериорного анализа, средние уровни серотонина при введениях 1 мМ и 5 мМ аргинина были выше фоновых значений и выше среднего уровня серотонина при введении 0.1 мМ аргинина ($p < 0.05$ во всех случаях). При этом животные групп «1 мМ R» и «5 мМ R» не различались между собой по этому показателю.

Экзогенная нитрергическая стимуляция mPFC введением 0.1 мМ DEA крысам группы «0.1 мМ DEA» вызывала подъем уровня внеклеточного серотонина в mPFC по отношению к фону перед введением (рис. 2; $F_{(8,56)} = 15.2$, $p < 0.001$) с максимумом $126 \pm 5\%$ через 45 мин после начала введения. Введение 1 мМ DEA в mPFC крыс группы «1 мМ DEA» приводило к росту уровня внеклеточного серотонина в этой области ($\chi^2 = 38.1$, $p < 0.001$) с максимальным подъемом $139 \pm 8\%$ в первые 15 мин введения (рис. 2). После этого наблюдалось постепенное возвращение уровня серотонина mPFC к фоновым показателям. Введение 3 мМ DEA животным группы «3 мМ DEA» также приводило к подъёму уровня внеклеточного серотонина в mPFC ($\chi^2 = 63.5$, $p < 0.001$) с максимальным подъёмом $126 \pm 5\%$ в первые 15 мин введения (рис. 2). Затем наблюдалось падение уровня серотонина ниже фоновых значений. Двухфакторный дисперсионный анализ выявил различия между изменениями уровня внеклеточного серотонина в mPFC, вызываемыми введениями DEA у крыс групп «0.1 мМ DEA», «1 мМ DEA» и «3 мМ DEA»; (рис. 2; $F_{(16,187)} = 12.6$, $p < 0.001$). При этом, дозозависимое повышение уровня внеклеточного серотонина в первые 15 мин введений наблюдалось только при введении DEA в диапазоне концентраций 0.1 – 1 мМ.

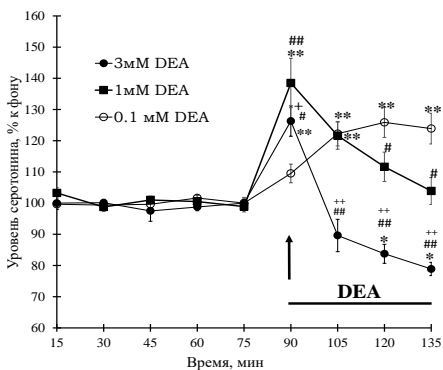


Рисунок 2. Изменения уровня внеклеточного серотонина в mPFC крыс с введениями в mPFC 0.1, 1 и 3 мМ DEA (0.1 мМ DEA, 1 мМ DEA и 3 мМ DEA). Черная стрелка – введения DEA. * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.001$ – при сравнении с фоном; # – $p < 0.05$; ## – $p < 0.001$ – при сравнении введением 0.1 мМ DEA; + – $p < 0.05$; ++ – $p < 0.001$ – при сравнении введением 1 мМ DEA. Разброс на графике – ошибка среднего.

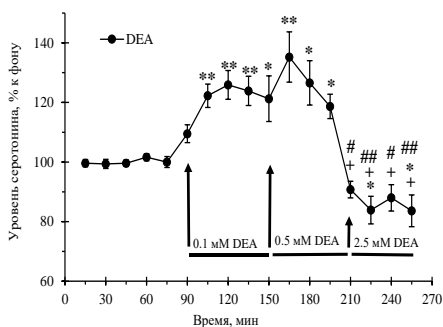


Рисунок 3. Изменения уровня внеклеточного серотонина в mPFC при последовательном введении в эту область DEA в концентрациях 0.1, 0.5 и 2.5 мМ (группа «0.1 мМ DEA»); черные стрелки – начало введения разных концентраций DEA. (а) * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.001$ – при сравнении с фоном; + – $p < 0.001$ – при сравнении с введением 0.1 мМ DEA; # – $p < 0.01$, ## – $p < 0.001$ – при сравнении с введением 0.5 мМ DEA. Разброс на графике – ошибка среднего.

Последовательное увеличение концентрации DEA у животных группы «0.1 мМ DEA» с 0.1 мМ до 0.5 мМ, а затем до 2.5 мМ тоже сопровождалось изменениями уровня серотонина в mPFC относительно фона (рис. 3; $F_{(16, 109)} = 14.2$, $p < 0.001$). А именно, введение 0.5 мМ DEA приводило к росту этого показателя с максимумом ($135 \pm 8\%$), наблюдавшимся через 30 мин после начала введения данной дозы DEA. Дальнейшее увеличение концентрации DEA до 2.5 мМ, напротив, снижало уровень внеклеточного серотонина в mPFC относительно фона и относительно уровня серотонина при введении 0.1 мМ DEA и 0.5 мМ DEA (рис. 3). Однофакторный дисперсионный анализ выявил влияние концентрации DEA (рис. 11; $H=88.4$, $p < 0.001$) на уровень внеклеточного серотонина в mPFC крыс группы «0.1 мМ DEA» (рис. 3).

Сводный анализ изменений уровня внеклеточного серотонина в mPFC у крыс групп «0.1 мМ DEA» и «1 мМ DEA» показал, что в первые 15 мин введений DEA в концентрациях 0.1, 0.5, 1, 2.5 мМ концентрация DEA значимо влияет на уровень серотонина в mPFC с максимальным подъемом при введениях 1 мМ DEA (рис. 4; $H=38.6$ $p < 0.001$). 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 mPFC ($r = 0.68$, $p < 0.001$, $n = 32$).

Эти результаты свидетельствуют, что уровень серотонина в mPFC при экзогенной стимуляции этой области DEA в значительной степени зависит от концентрации вводимого NO-донора. А именно, чем выше концентрация DEA, тем выше первоначальный подъем уровня серотонина в mPFC (рис. 4; 0.1 – 1 мМ DEA) и тем быстрее ослабевает активационное действие препарата (рис. 2; 1 и 3 мМ DEA). К таким же тормозным эффектам приводит и длительное

введение DEA (рис. 3). Т. е. продолжительность введения DEA также является важным фактором, влияющим на направленность действия экзогенного NO на высвобождение серотонина в mPFC.

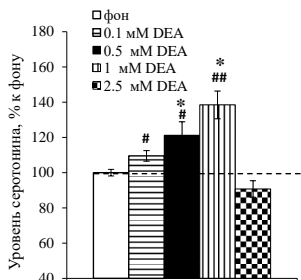


Рисунок 4. Уровень внеклеточного серотонина в mPFC крыс в первые 15 мин введения каждой концентрации DEA. * – $p < 0.001$ – при сравнении с фоном; # – $p < 0.01$, ## – $p < 0.001$ – при сравнении с введением 2.5 mM DEA.

Влияние локальной блокады нитергической передачи на уровень внеклеточного серотонина в mPFC

Введение в mPFC крыс группы «FLU» 10 мкМ FLU, ингибитора обратного захвата серотонина, вызывало рост уровня внеклеточного серотонина в mPFC относительно собственного фона через 45 мин введения с максимумом $157 \pm 11\%$ (рис. 5; Хи квадрат= 51.7, $p < 0.001$). Введение в mPFC животных группы «NA+FLU» NA (0.5 мМ), напротив, снижало уровень внеклеточного серотонина в этой области относительно фона (рис. 5; $F_{(9, 45)} = 8.8$, $p < 0.001$). Введение в mPFC животным группы «NA+FLU» FLU (10 мкМ) на фоне предварительного введения NA (0.5 мМ) вызывало подъем уровня внеклеточного серотонина в mPFC (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 mPFC по сравнению с крысами группы «FLU», подвергавшимися изолированному введению FLU (рис 5; $F_{(9, 130)} = 2.4$, $p = 0.02$).

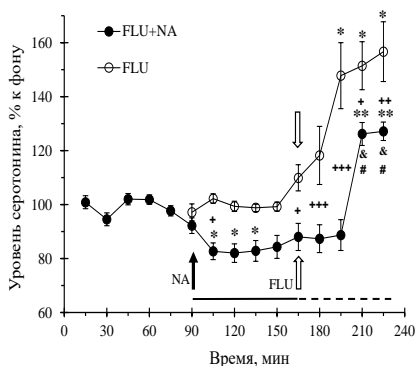


Рисунок 5. Влияние введений в mPFC 10 мкМ флуоксетина (FLU), а также введений в mPFC 10 мкМ флуоксетина на фоне введения 0.5 мМ NA (FLU+NA) на фоновый уровень внеклеточного серотонина. Сплошная горизонтальная линия – период введения NA крысам группы FLU + NA, пунктирная линия – период введения FLU изолированно 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.

Результаты показывают, что серотониновая система mPFC находится под тоническими активационными влияниями эндогенного NO, поскольку устранение таких влияний локальным

введением ингибитора NOS NA (0.5 мМ), во-первых, снижает базальный уровень внеклеточного серотонина в этой области и, во-вторых, ослабляет и задерживает рост уровня внеклеточного серотонина в mPFC, вызываемый введением ингибитора обратного захвата серотонина FLU (10 мМ).

Эффекты нитрергической стимуляции mPFC введениями субстрата NO-синтазы R (0.1 мМ, 1 мМ, 5 мМ) подтверждают вывод об активационном действии эндогенного NO на серотониновую трансмиссию в mPFC, о чем свидетельствует увеличение уровня внеклеточного серотонина в mPFC при введении в эту область R в концентрациях 1 мМ и 5 мМ. Экзогенная нитрергическая стимуляция mPFC 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 mPFC. Однако в целом эффекты экзогенной нитрергической стимуляции mPFC на выброс серотонина в этой области являются более сложными, поскольку их знак зависит от концентрации вводимого NO-донора (что соответствует литературным данным, полученным для других областей мозга (Ghasemi et al. 2019)), а также от длительности воздействия DEA.

Влияние блокады нитрергической системы mPFC в ходе выработки УРС на уровень внеклеточного серотонина в этой области, а также на выработку и генерализацию УРС

В тесте «Открытое поле» крысы групп «Без введения», «NA» и «NPLA» не различались между собой по уровню горизонтальной ($H=0.6$, $p=0.7$) и вертикальной ($F_{(2, 24)}=0.9$, $p=0.4$) двигательной активности. Выработка УРС с дискриминационным компонентом, включающая тесты «выработка УРС» и «дифференцировка 1», вызывала у животных группы «Без введения» подъемы уровня внеклеточного серотонина в mPFC в ходе обоих тестов относительно фона (рис. 6; $F_{(13, 117)}=17.3$, $p<0.001$), что соответствует ранее полученным данным (Саульская, Марчук, 2018).

Введение в mPFC животных группы «NPLA» ингибитора нейронной NO-синтазы NPLA (2мМ) снижало уровень внеклеточного серотонина в mPFC относительно фона перед введением (рис. 6; $F_{(9, 54)}=6.4$, $p<0.001$) и уменьшало подъемы уровня серотонина, вызываемые выработкой УРС и дифференцировкой 1 (рис. 6; $F_{(13, 210)}=1.8$, $p=0.04$ – при сравнении с группой «Без введения» и $F_{(18, 108)}=4.7$, $p<0.001$ – при сравнении с собственным фоновым уровнем).

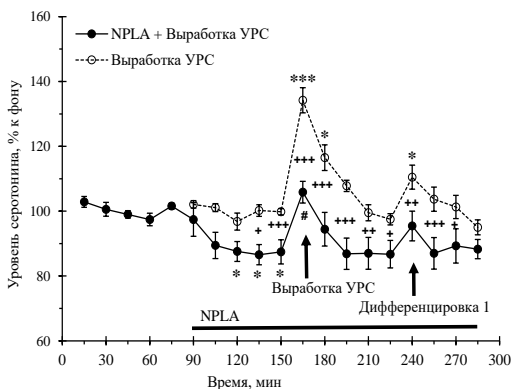


Рисунок 6. Изменения уровня внеклеточного серотонина в mPFC у крыс с введением (NPLA+ Выработка УРС) и без введения (Выработка УРС) в mPFC 2мМ NPLA. По оси X – время, мин; по оси Y – уровень внеклеточного серотонина, % к фону; разброс на графике – стандартная ошибка среднего; горизонтальная линия – введение 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 mM) в mPFC во время выработки УРС оказывало похожее действие, уменьшая базальный уровень внеклеточного серотонина в этой области и снижая подъем уровня серотонина в mPFC, вызываемый выработкой УРС (рис.7; $F_{(9, 81)}=17.2, p<0.001$). Двухфакторный дисперсионный анализ показал, что уровень внеклеточного серотонина в mPFC животных группы «NA» был ниже относительно этого показателя крыс группы «Без введения» во время и после выработки УРС, но не во время дифференцировки 1 (рис. 7; $F_{(13, 252)}=3.6, p<0.001$).

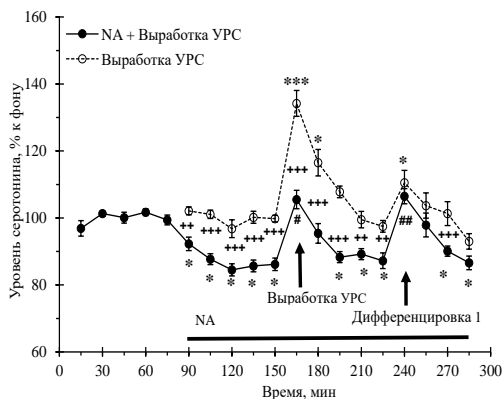


Рисунок 7. Изменения уровня внеклеточного серотонина в mPFC в ходе выработки УРС и дифференцировки 1 у крыс с введением (NA+ Выработка УРС) и без введения (Выработка УРС) в mPFC 0.5 mM NA. ## – $p < 0.001$ – при сравнении с уровнем серотонина перед тестом. Остальные обозначения как на рис. 5.

Крысы групп «NPLA» и «NA» не различались по динамике изменений уровней внеклеточного серотонина в mPFC в ходе выработки УРС и дифференцировки 1 ($F_{(18, 285)}=1.2, p=0.3$).

Анализ замирания животных на CS+ во время выработки УРС (параметр, отражающий ожидание болевого раздражения) продемонстрировал, что крысы групп «NA» и «NPLA» не различались между собой ($t=0.4, p=0.7$) и не отличались от крыс группы «Без введения» (соответственно, $t=0.9, p=0.4$ и $t=0.3, p=0.7$) по этому показателю. Во время дифференцировки 1 (тест на первоначальную генерализацию УРС) крысы групп «NA» и «NPLA» больше замирали на CS- по сравнению с животными группы «Без введения» (соответственно, $U=77.0, p=0.045$ и $U=11.0, p=0.02$), но не различались между собой по этому показателю.

В ходе дифференцировки 2 (тест на проявления генерализованного страха) крысы групп «NA» и «NPLA» меньше замирали на безопасный CS- по сравнению с крысами группы «Без введения» (рис. 8a; $t=2.1, p=0.049$ и $t=4.8, p<0.001$, соответственно), что свидетельствует о быстром угасании у них проявлений генерализации УРС. Животные групп «NA», «NPLA» не различались между собой по этому показателю. В ходе реализации УРС через сутки после ее выработки между крысами групп «NA», «NPLA» и «Без введения» не было различий по длительности замирания на потенциально опасный CS+ (рис. 8б).

Сравнение поведения животных в приподнятом крестообразном лабиринте через сутки после выработки УРС (экспериментальный день 2, перед началом тестирования на генерализацию и реализацию УРС) тоже не выявило достоверных различий между крысами групп «NA», «NPLA» и «Без введения» по времени пребывания (рис.19a) в открытых ($H= 0.01, p=0.99$) и закрытых

($H=0.004$, $p=0.99$) рукавах лабиринта, а также по горизонтальной двигательной активности (рис.19б) в открытых ($F_{(2, 24)}=2.5$, $p=0.1$) и закрытых ($F_{(2, 24)}=2.9$, $p=0.08$) рукавах лабиринта.

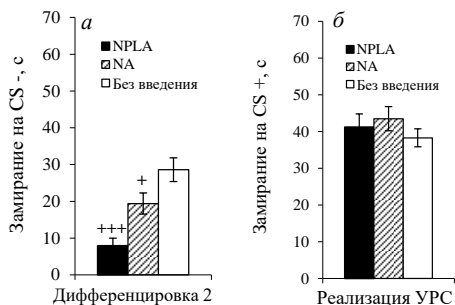


Рисунок 8. Длительность замирания на CS- (а) и на CS+ (б) у крыс, подвергавшихся в первый день экспериментов введением в mPFC 2мМ NPLA (NPLA), 0.5 мМ NA (NA) и у животных без введений препаратов (Без введения). (а, б) + – $p < 0.05$; +++ – $p < 0.001$ – при сравнении с животными без введения препаратов.

Влияние активации нитергической системы mPFC в ходе выработки УРС на уровень внеклеточного серотонина в этой области, а также на выработку и генерализацию УРС

Животные групп «Без введения» и «DEA NONO» не различались по горизонтальной и вертикальной двигательной активности в тесте «Открытое поле» перед выработкой УРС. Данные для группы «Без введения», описывающие изменение уровня внеклеточного серотонина в ходе выработки УРС, приведены ранее (стр. 14). Введение в mPFC крыс группы «DEA NONO» перед выработкой УРС 1 мМ DEA вызвало временный (30 мин) подъем уровня внеклеточного серотонина в mPFC (максимум $136 \pm 10\%$ относительно фона (рис. 9; $F_{(7,56)} = 10.7$, $p < 0.001$). Затем уровень внеклеточного серотонина mPFC постепенно снижался (рис. 9; $F_{(11,88)} = 9.2$, $p < 0.001$) и в конце дня становился ниже фоновых значений.

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

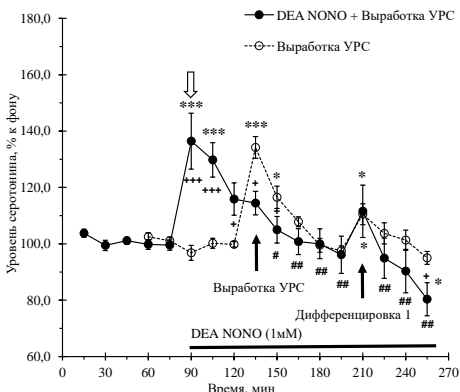


Рисунок 9. Изменения уровня внеклеточного серотонина в mPFC в ходе выработки УРС и дифференцировки 1 у животных с введением в mPFC 1 мМ DEA (DEA NONO + Выработка УРС) и у крыс без введения препарата (Выработка УРС). Разброс на графиках – ошибка среднего; горизонтальная линия – введение DEA. * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.05$; *** – $p < 0.001$ – при сравнении с фоном; + – $p < 0.05$; +++ – $p < 0.001$ – при межгрупповом сравнении. # – $p < 0.05$; ## – $p < 0.001$ – при сравнении с уровнем серотонина перед выработкой УРС. у животных группы «DEA NONO».

Выработка УРС и дифференцировка 1 у животных группы «DEA NONO» не вызывали изменений уровня внеклеточного серотонина в mPFC относительно этого показателя перед тестом (рис. 9, $t=0.19$; $p=1.00$), а также по сравнению с фоновым уровнем серотонина перед

введением препарата ($t=2.1$; $p=1.00$). По данным двухфакторного дисперсионного анализа, уровень внеклеточного серотонина во время теста по выработке УРС у животных группы «DEA NONO» был ниже, чем у крыс группы «Без введения» (рис. 9; $F_{(13,238)} = 5.8$, $p < 0.001$).

Во время выработки УРС крысы группы «DEA NONO» меньше замирали на CS+ ($t = 2.8$; $p = 0.013$) по сравнению с крысами группы «Без введения». При этом в ходе дифференцировки 1 (тест на первоначальную генерализацию) не было выявлено различий между группами «DEA NONO» и «Без введения» по времени замирания на CS-.

В ходе дифференцировки 2 крысы группы «DEA NONO» меньше замирали на безопасный дифференцировочный сигнал (CS-) по сравнению с крысами группы «Без введения» (рис. 10а; $U=74$; $p = 0.02$) Во время реализации УРС животные групп «DEA NONO» и «Без введения» не различались по уровню замирания на потенциально опасный условный сигнал (CS+) (рис 10б; $t = 0.008$; $p = 0.99$).

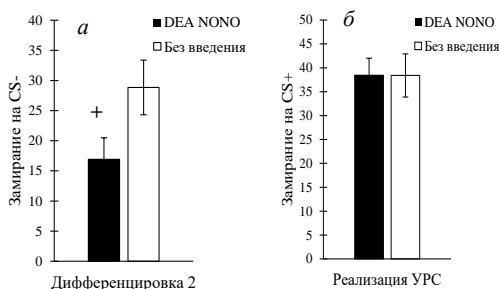


Рисунок 10. Длительность замирания на CS- (а) и на CS+ (б), у крыс, подвергавшихся в первый день экспериментов введению в mPFC 1 мМ DEA (DEA NONO) и у животных без введения препаратов (Без введения). + – $p < 0.05$ – при сравнении с животными без введения препаратов.

Через сутки после выработки УРС крысы группы «DEA NONO» не отличались от крыс группы «Без введения» по времени пребывания в закрытых ($U = 84$, $p = 0.653$) и открытых рукавах лабиринта ($U = 96$, $p = 0.653$), а также по амбулации ($U = 82$, $p = 0.539$) и вертикальной активности ($t = 1.2$, $p = 0.24$) в закрытых рукавах. Однако крысы группы «DEA NONO» демонстрировали большую горизонтальную ($U = 114.5$, $p = 0.048$) и вертикальную исследовательскую активность в открытых рукавах лабиринта ($t = 2.1$; $p = 0.047$). Крысы групп «DEA NONO» и «Без введения» не отличались по порогу чувствительности к току ($t=1.1$; $p=0.28$).

Сравнение уровней внеклеточного серотонина во время выработки УРС при введении в mPFC 1 мМ DEA, 0.5 мМ NA и 2 мМ NPLA

Двухфакторный дисперсионный анализ выявил значимые различия по изменениям уровня внеклеточного серотонина в mPFC в ходе выработки УРС между группами «DEA NONO» и «NPLA» ($F_{(16, 238)}=4.7$, $p < 0.001$) и между группами «DEA NONO» и «NA» ($F_{(16, 289)}=8.4$, $p < 0.001$). Эти различия наблюдались на фоне введения препаратов (3 временных точки эксперимента – 90 мин, 105 и 120) перед выработкой УРС.

А именно, в этом временном окне уровень серотонина у животных группы «DEA NONO» был значимо выше, чем этот показатель у крыс групп «NPLA» и «NA» (рис. 11 а, б). Вместе с тем, не было выявлено различий в уровне внеклеточного серотонина между группами «DEA NONO» и «NPLA», а также «DEA NONO» и «NA» во время выработки UPC (временная точка – 135 мин), а также в большинстве временных точек после выработки UPC (рис. 11 а,б).

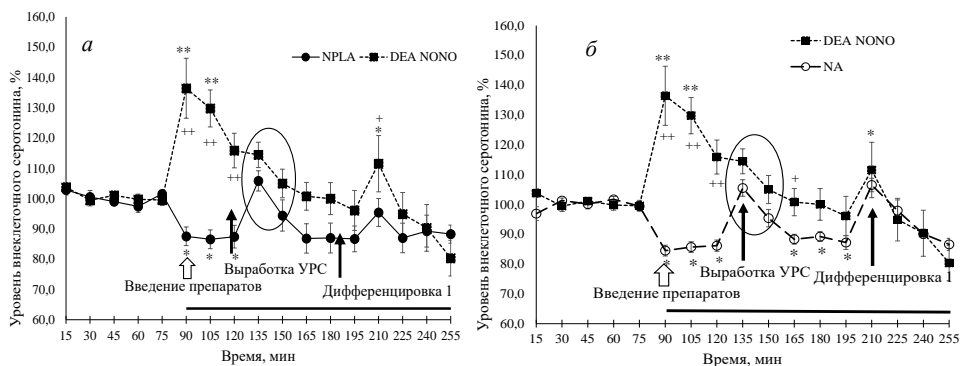


Рисунок 11. Сравнение изменений уровня внеклеточного серотонина в ходе выработки UPC (а) – у крыс с введениями в mPFC 1 mM DEA (DEA NONO) и 2mM NPLA (NPLA) и (б) – у крыс с введением в mPFC 1 mM DEA (DEA NONO) и 0.5 mM NA (NA). Разброс на графиках – ошибка среднего; черные стрелки – начало тестов; горизонтальная линия – период введения препаратов; эллипсом выделен период выработки UPC, в котором пропадают межгрупповые различия; * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.001$ – при сравнении с фоновыми значениями; + – $p < 0.05$; ++ – $p < 0.001$ – при межгрупповом сравнении.

Таким образом, результаты демонстрируют, что в mPFC эндогенный NO оказывает активационные влияния на базальную и вызванную выработкой UPC активность серотониновой системы этой области, оцениваемую по изменениям уровня внеклеточного серотонина, поскольку блокада нитергической нейротрансмиссии в mPFC во время выработки UPC локальными введениями ингибитора NOS NA снижает оба эти показателя. Такие эндогенные нитергические влияния в основном обусловлены активностью nNOS, так как введения в mPFC NPLA, селективного ингибитора nNOS, оказывает аналогичное действие на уровень внеклеточного серотонина в mPFC в ходе выработки UPC.

Анализ поведения животных показал, что блокада продукции NO в mPFC введениями NA и NPLA во время выработки UPC приводит к увеличению времени замирания животных на дифференцировочный сигнал (CS-) в тесте дифференцировка 1, то есть усиливает первоначальную генерализацию UPC в день ее выработки. Эти результаты соответствуют данным моих коллег, приведенным выше (Саульская, Судоргина 2015). Новым результатом работы явились данные, что животные, подвергавшиеся введениям в mPFC NA и NPLA во время выработки UPC, демонстрируют через сутки (т.е. после консолидации памяти о страхе) селективное снижение генерализации UPC (уменьшение замирания животных на безопасный дифференцировочный сигнал (CS-), но не на опасный условный сигнал (CS+)). Эти результаты позволяют предположить, что введения NA и NPLA в mPFC во время выработки UPC ускоряют

угасание генерализованного страха. Такой эффект введений NA и NPLA в mPFC, возможно, связан с нарушением процессов консолидации памяти о генерализованном страхе под влиянием этих препаратов. Это предположение поддерживают литературные данные, свидетельствующие об участии NO в ЦНС в консолидации памяти об угасании страха (Sadeghi et al. 2022).

Учитывая, что введения NA и NPLA в этих экспериментах сопровождалось снижением уровня внеклеточного серотонина в mPFC (рис. 6, 7), а также упомянутые ранее данные (Саульская, Марчук 2018, 2019), что фармакологическая или естественная стимуляция выброса серотонина в mPFC во время выработки УРС усиливает впоследствии генерализацию УРС, мы предполагаем, что показанное в этой работе тормозное влияние блокады нитергической передачи в mPFC во время выработки УРС на генерализацию УРС через сутки может быть связано со снижением выброса серотонина в mPFC во время выработки УРС, вызванным введениями NA и NPLA.

Эксперименты с экзогенной нитергической стимуляцией mPFC введением в эту область донора NO DEA показали, что длительное (210 мин) введение DEA (1 mM) оказывает двухфазный эффект на активность серотониновой системы этой области: наблюдается первоначальное кратковременное (30 мин) повышение уровня внеклеточного серотонина в mPFC с последующим постепенным снижением. Согласно данным литературы, NO может регулировать высвобождение серотонина посредством разнообразных механизмов. Причем такие влияния могут быть как активационными, так и тормозными в зависимости от концентрации NO-донора и области мозга (Ghasemi et al. 2019), что, возможно, связано с многообразием мишеней NO (Kiss 2000). Показанное в настоящей работе снижение базального уровня внеклеточного серотонина в mPFC в ходе длительного введения 1mM DEA NONO может быть обусловлено, например, десенситизацией растворимой гуанилатциклазы, основной мишени NO, в результате ее нитрозилирования (Sayed et al. 2007).

Каковы бы ни были причины такого нарастающего тормозного эффекта экзогенного NO на выброс серотонина в mPFC, следует подчеркнуть, что выработка УРС, проводимая на фоне введения донора NO, сопровождалась почти полным торможением функционального выброса серотонина в mPFC, вызываемого выработкой УРС. В отличие от этого, введение ингибиторов NOS и nNOS в mPFC, быстро снижающее базальный выброс серотонина в этой области, не предотвращало функциональный подъем этого показателя во время выработки УРС. При этом суммарный эффект экзогенного NO на выброс серотонина в mPFC на этапе выработки УРС и после нее был статистически не отличим от влияния введений ингибиторов NOS и nNOS на этот показатель, а также не отличим от фоновых значений уровня серотонина перед фармакологическими воздействиями. А именно, сравнение изменений уровня внеклеточного серотонина в mPFC в ходе выработки УРС у крыс с введениями NO-донора и ингибиторов NOS и nNOS продемонстрировало отсутствие различий по уровню серотонина во время выработки УРС, а также в большинстве временных точек после выработки УРС у животных с введением DEA, и у крыс с введением NA или NPLA (см. рис. 11). Такое сходство действия всех трех препаратов на уровень серотонина во время выработки УРС (но не на этот показатель перед выработкой) (см. рис. 11), видимо, является причиной однонаправленных поведенческих

эффектов их введений, наблюдаемых спустя сутки, а именно, торможения генерализации УРС. Этот результат еще раз подтверждает вывод моих коллег (Саульская, Марчук 2018), что сниженный уровень серотониновой активации mPFC на этапе формирования УРС может быть предпосылкой ослабления генерализации этой условнорефлекторной реакции через сутки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многочисленные литературные данные, полученные на основе экспериментов с использованием УРС, освещают роль mPFC в различных аспектах страха (Burgos-Robles et al. 2009; Corcoran, Quirk 2007; Guhn et al. 2014; Milad, Quirk 2002; Vidal-Gonzalez et al. 2006), включая генерализацию УРС (Asok et al. 2019; Lopresto et al. 2016; Lee, Choi 2012; Xu, Südhof 2013). Известен вклад ряда нейромодуляторных систем данной корковой области, в том числе нитергической (Саульская, Судоргина 2015; Судоргина, Саульская 2015) и серотонинергической (Саульская, Марчук 2018; Саульская, Марчук 2019), в эти процессы.

Важный результат настоящей работы заключается в том, что в ней впервые продемонстрировано активационное влияние эндогенного NO в mPFC на базальный выброс серотонина в этой области, о чем свидетельствует снижение уровня внеклеточного серотонина в этой области при введении в mPFC ингибитора NOS.

Еще одним важным результатом работы являются данные об активационной роли эндогенного NO нейронного происхождения в регуляции выброса серотонина в mPFC во время выработки УРС и о возможной роли такой регуляции в генерализации УРС.

Ранее упоминалось, что выработки УРС сопровождается подъёмом уровня внеклеточного серотонина в mPFC, 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 эндогенного NO на серотониновую систему mPFC в ходе выработки УРС.

Полученные в работе новые данные о локальных активационных влияниях эндогенного NO нейронного происхождения на вызываемую выработкой УРС активность серотониновой системы mPFC и на генерализацию этой условнорефлекторной реакции вносят вклад в понимание нейрохимических и структурных механизмов формирования генерализованного страха. Результаты работы могут быть учтены при разработке подходов, направленных на коррекцию расстройств, сопровождающихся проявлениями генерализованного страха.

ВЫВОДЫ

1. Введение в mPFC аргинина (1 мМ, 5 мМ), субстрата NOS, сопровождается увеличением уровня внеклеточного серотонина в mPFC, что свидетельствует об активационном влиянии эндогенного NO mPFC на серотониновую систему mPFC.
2. Введения в mPFC донора NO (DEA) в концентрациях 0,1, 0,5 и 1 мМ приводят к дозозависимому повышению уровня внеклеточного серотонина в mPFC в первые 15 мин

введения препарата, а введение DEA в концентрации 2.5 мМ (после длительного введение более низких концентраций) и в концентрации 3 мМ приводит к быстрому снижению этого показателя. То есть эффект экзогенной нитрергической активации введениями донора NO в mPFC зависит от дозы донора NO и длительности его введения.

3. Блокада продукции NO в mPFC 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 1 свидетельствуют, что серотониновая система mPFC находится под тоническими активационными влияниями эндогенного NO, которые, в частности, могут усиливать эффективность локального фармакологического действия флуоксетина.
4. Введения в mPFC 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 mPFC; к снижению функционального подъёма 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 mPFC и поведенческих эффектов, отражающих степень генерализации условнорефлекторной реакции страха. Это означает, что основным источником нитрергической регуляции базального и функционального высвобождения серотонина в mPFC является эндогенный NO нейронного происхождения.
5. Длительное введение в mPFC донора NO – DEA (1 мМ) вызывает кратковременное увеличение уровня внеклеточного серотонина в mPFC в начале введения препарата с последующим постепенным снижением этого показателя, и на фоне такого снижения уменьшает функциональный подъём уровня внеклеточного серотонина в mPFC, вызываемый выработкой УРС, а также снижает через сутки генерализацию УРС (замирание на безопасный CS-). Эти данные свидетельствуют, что длительная экзогенная нитрергическая стимуляция mPFC тормозит функциональную активность серотониновой системы этой области коры во время выработки УРС и может оказывать тормозное влияние на степень последующей генерализации этой условнорефлекторной реакции.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных 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// Нейрохимия. – 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.

3. Саульская Н. Б., **Сусорова М. А.**, Трофимова Н. А. 2023. Влияние ингибиторов синтазы NO на выброс серотонина в медиальной префронтальной коре в ходе формирования и генерализации условной реакции страха у крыс// Российский физиол. журн. им. И.М. Сеченова – 2023. – Т. 109, № 9. – С. 1282 – 1294.

Иные издания:

1. **Сусорова М. А.**, Саульская Н. Б. Влияние нитергических сигналов на выброс серотонина в медиальной префронтальной коре крыс// Интегративная физиология, 2023. Т. 4, № 4. – С. 457 – 465.

Публикации в материалах научных мероприятий:

1. **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.
2. **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.
3. **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.
4. **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.
5. **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// Тезисы конференции «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье», Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 2021.
6. **Бурмакина (Сусорова) М. А.**, Трофимова Н. А., Саульская Н. Б. Стимуляция нитергической 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.
7. **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.
8. **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.

9. **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
10. Саульская Н.Б., **Сусорова М.А.**, Трофимова Н. А. Стабилизация динамики генерализации страха нитрергическими и серотониновыми сигналами префронтальной коры// Тезисы докладов Всероссийской конференции с международным участием «Интегративная физиология-2022», Институт Физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, 2022. – С. 88
11. **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.
12. Саульская Н.Б., **Сусорова М.А.**, Трофимова Н.А. Нитрергическая регуляция активности серотониновой системы медиальной префронтальной коры при формировании генерализованного страха// Сборник тезисов XXIV съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. Санкт-Петербург, 2023. – С. 183.
13. **Бурмакина (Сусорова) М.А.**, Трофимова Н.А., Саульская Н.Б. Активация и блокада нитрергической системы медиальной префронтальной коры: влияние на серотониновую трансмиссию// Тезисы докладов Всероссийской конференции с международным участием «Интегративная физиология-2023», Институт Физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, 2023. – С. 92.
14. **Сусорова М. А.** Влияние блокады NO-сигналов медиальной префронтальной коры в ходе выработки условной реакции страха на выброс серотонина и на генерализацию страха// Материалы XXX Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины-2024», Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, 2024 – С. 133.
15. **Сусорова М. А.** Эндогенный NO влияет на формирование генерализованного страха, регулируя выброс серотонина в медиальной префронтальной коре// Материалы XXVII Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина - человек и его здоровье». СПбГУ, Санкт-Петербург, 2024 – С. 698-699.
16. **Сусорова М. А.** Блокада эндогенных NO-сигналов уменьшает проявления генерализованного страха, снижая выброс серотонина в медиальной префронтальной коре// Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2024», МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва. Электронный ресурс.