

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ И ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ ИМ. И.П. ПАВЛОВА РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК

Научный доклад об основных результатах подготовленной научно-
квалификационной работы

**«Эффекты пренатальной гипоксии на потребление никотина и синдром
отмены у взрослых крыс»**

Стратилов Виктор Андреевич

06.06.01 Биологические науки

03.03.01 Физиология

Научный руководитель:

д.б.н. Тюлькова Екатерина Иосифовна

Санкт-Петербург

2021

Актуальность исследования

Основная проблема нейробиологии аддикций заключается в отсутствии понимания причин широкой вариабельности индивидуальной предрасположенности к зависимостям [1], [2]. Накоплен существенный массив информации о наследственных факторах риска развития аддикций [3], [4], однако до сих пор не сформирована цельная картина представлений о влиянии факторов внешней среды, особенно в период перинатального онтогенеза, на эффективность функционирования системы «вознаграждения». Клинические данные и результаты экспериментальных исследований на животных показывают влияние стресса матери, сопровождающегося выбросом эндогенных глюкокортикоидных гормонов, а также патологий плаценты на дальнейшее физическое [5]–[8] и когнитивное развитие потомства. Гипоксия является одной из наиболее распространенных форм пренатального стресса [9], [10]. Гипоксия плода возможна при различных условиях, включая беременность с анемией, плацентарной недостаточностью, сдавлением пуповины, преэклампсией, заболеваниями сердца, легких и почек, а также при гемоглобинопатиях [11]–[13]. Нарушения развития мозга, вызванные гипоксией и асфиксией, встречаются примерно у 2% доношенных и почти у 60% недоношенных новорожденных детей [14], [15]. В настоящем исследовании была произведена оценка влияния такого широко распространённого фактора, как пренатальная гипоксия на дальнейшее развитие у потомства никотиновой зависимости во взрослом возрасте. Несмотря на то, что никотин не считается тяжелым наркотиком, его потребление наносит колоссальный ущерб. По данным ВОЗ ежегодно в мире от последствий употребления табака погибает до 8 млн. человек [16]. Потому изучение идиопатической предрасположенности к потреблению табака становится особенно актуальным. Как и в других видах аддикций, ключевую роль в развитии никотиновой зависимости играет дофаминергическая система мозга, представленная нейронами вентральной тегментарной области (VTA), отдающими свои проекции (в основном) в прилежащее ядро стриатума (NAcc) и префронтальную кору. Никотин свободно проникает через

гематоэнцефалический барьер и с высокой афинностью связывается с никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами (nAChR), представляющими собой катионные каналы. Считается, что в VTA никотин опосредует свой эффект через активацию nAChR, локализованных с глутаматными рецепторами на дофаминергических нейронах, что способствует выбросу дофамина [17]–[20]. Альтернативная гипотеза дополняет это представление, предполагая также наличие nAChR на пресинаптической мембране глутаматергических проекций в VTA. В таком случае, активация этих рецепторов никотином усиливает выброс глутамата в VTA, где глутамат начинает оказывать свое возбуждающее действие на дофаминергические нейроны [18]. $\alpha 4\beta 2$ nAChR и $\alpha 7$ nAChR являются наиболее распространенными типами ацетилхолиновых рецепторов в мозге [21]. Активация $\alpha 4\beta 2$ nAChR, расположенных преимущественно на телах дофаминергических нейронов, приводит к увеличению их спайковой активности и повышению уровня дофамина в прилежащем ядре и префронтальной коре. На аксонах глутаматергических нейронов преимущественно располагаются $\alpha 7$ nAChR рецепторы [21], [22]. Потенциальное влияние пренатальной гипоксии, в данном исследовании смоделированное на 14-16 сутки беременности, может оказывать как повреждающий эффект на нейроны «системы вознаграждения» (в частности, дофаминергические, завершающие к этому моменту аксональное наведение к NAcc), а также оказывать модифицирующие влияния на процесс реализации генетических программ, тем самым обеспечивая долговременные изменения в развитии мозга.

Цель и задачи исследования

Цель исследования:

Изучение влияния пренатальной гипоксии на развитие никотиновой зависимости и выяснение возможных механизмов, лежащих в ее основе.

Задачи исследования:

1. Изучить скорость развития никотиновой зависимости и тяжесть синдрома отмены у взрослых крыс после перенесенной пренатальной гипоксии.

2. Оценить влияние пренатальной гипоксии на функционирование дофаминергической системы мозга, являющейся ключевой в развитии аддикций.
3. Оценить влияние пренатальной гипоксии на эффективность глутаматного сигналинга, регулирующего активность дофаминергических нейронов в вентральной тегментарной области мозга.

Научная новизна

Впервые показано, что пережитая на 14-16 сутки беременности пренатальная гипоксия провоцирует повышенную склонность к потреблению никотина и усиливает синдром отмены. Также было показано, что пренатальная гипоксия не вызывает изменений в биосинтезе дофамина в VTA и количестве дофаминовых рецепторов первого типа в NAcc, но изменяет паттерн фосфорилирования белка DARPP-32, что, по-видимому, связано с изменением глутаматной трансдукции как в VTA, так и в NAcc.

Материалы и методы

Эксперименты проводились на самцах крыс линии Вистар, рожденных интактными самками (контрольная группа) и самками, подверженными тяжелой гипобарической гипоксии (3 часа, 180 мм.рт.ст. (5% O₂), 20-25 °C) на 14, 15 и 16-е сутки беременности (группа пренатальной гипоксии, ПГ). Интервал между воздействиями составлял 24 часа. Крысят отлучали от матери в возрасте 30 суток и помещали в клетки размером 60 × 30 × 20 по 6 особей. В течение всего периода проведения экспериментов крысы содержались при режиме свет/темнота 12 : 12 ч, температуре 20–23 °C и при постоянном доступе к воде и пище.

Оценка свободного потребления никотина

С целью оценки свободного потребления никотина 3-месячных крыс рассаживали по одиночке в стандартные клетки размером 60 × 30 × 20 с двумя поилками, наполненными водой. Каждый день содержимое бутылок взвешивалось, а бутылки менялись местами. На 4 сутки эксперимента у

половины животных из каждой группы одну из поилок наполняли раствором тартрата никотина в концентрации 10 мкг/мл. Производилось сравнение отношения общего количества потребленного никотина в течение каждых 8 дней эксперимента на потребленную жидкость и вес соответствующего животного.

Хроническое введение никотина и оценка абстинентного синдрома

Хирургические процедуры:

На первый день проведения экспериментов 3 месячным крысам имплантировались осмотические помпы (Alzet 2002, Alza Corporation, CA, USA) со скоростью введения вещества интереса 0,5 мкл/ч, наполненные раствором никотина тартрата. Концентрация никотина была рассчитана таким образом, чтобы каждое животное получало 9 мг/кг никотина в сутки. Наивным животным также имплантировались осмотические помпы, но вместо раствора никотина они содержали физиологический раствор.

Поведенческая оценка мотивационного эффекта мекамиламина после хронического введения никотина:

На утро (9:00) на 14 день введения раствора никотина (или физиологического раствора) крысам подкожно инъецировался мекамиламин (антагонист nAChR, усиливающий симптомы отмены приема никотина[23]) в дозе 1.0 мг/кг или физиологический раствор (1 мл/кг), после этого крысы немедленно помещались в одну половину тестовой установки на 60 минут. Вечером того же дня (19:00) крысам вводился физиологический раствор и крысы помещались в другую половину тестовой установки на 60 минут. Совмещения инъекции (мекамиламин или физиологический раствор) и половины тестовой установки (монохромные полосы и круги) были случайны и сбалансированы среди крыс, получавших инъекции мекамиламина. На утро следующего дня тестирование реакции выполнялось следующим образом: перегородка, разделяющая 2 части тестовой установки была поднята и фиксировалось время пребывания в каждой половине установки в течение 900 секундной тестовой сессии. Для групп, получавших мекамиламин данные представлены в виде разности времени пребывания в мекамиламин-ассоциированной половине

тестовой установки и времени пребывания в другой половине (отрицательные значения – избегание места). Для групп не получавших мекамиламин вычитание производилось из времени половины, ассоциированной с утренним введением физиологического раствора. Тестирование также проводилось в черно-белой тестовой установке, в которой крысы изначально избегали белую половину установки. При введении мекамиламина крысы помещались в черную половину тестовой установки, а результат выражен в % пребывания в белой половине тестовой установки.

Пробоподготовка для иммуногистохимического анализа

Образцы мозга 3 месячных крыс, содержащие ядра VTA и NAcc погружались в раствор фиксатора (28 мл Fine Fix, Milestone, Italy + 72 мл 96% этанола) на 24 часа по стандартному гистологическому протоколу. Дегидратация тканей достигалась последовательным помещением образцов в растворы спиртов восходящей концентрации. Далее образцы помещались в жидкий парафин (4 раза, по 1 ч) при 56°C и нарезаны на 7 мкм срезы. Срезы NAcc выполнялись на 2.28 мм от линии брегма и -5.28 для VTA. Срезы монтировались на стекла с L-полилизиновой подложкой, депарафинизировались в ксилоле (дважды по 5 мин), дегидрировались в спиртах нисходящей концентрации (96% → 96% → 96% → 70%) и демаскировались в цитратном буфере (pH 6.0).

Иммуногистохимия и двойной иммунофлюоресцентный анализ

Перед проведением иммуногистохимических исследований, все первичные антитела были проверены на соответствие молекулярной массе Вестерн блот методом. Для парабрахиального субъядра VTA был применен метод тройной иммунофлюоресценции для выявления Nurr1+ (Nuclear receptor related 1) и TH+ (tyrosine hydroxylase) нейронов, демонстрирующих дофаминовый фенотип. Антитела против VGluT2 использовались для оценки количества глутаматергических терминалей. Срезы мозга, содержащие VTA были инкубированы в течение ночи при температуре 4 °C с первичными кроличьими антителами против Nurr1 (N4663, Sigma-Aldrich, USA), козьими поликлональными антителами против TH (SAB2501155, Sigma-Aldrich, USA),

мышинными моноклональными антителами против VGluT2 (AMAb91081, Sigma-Aldrich, USA). После инкубации с первичными антителами, срезы инкубировались с коктейлем из вторичных флюоресцентных антител: противокроличьи антитела CF633 (SAB4600132, Sigma-Aldrich, USA), противомышинные CF568 (SAB4600425, Sigma-Aldrich, USA) и противокозьи CF488A (SAB4600232, Sigma-Aldrich, USA). Высушенные и монтированные срезы анализировались на конфокальном микроскопе LSM 710 Carl Zeiss. В поле зрения случайно выбиралось 3 Nurr1/TH позитивных нейрона для которых оценивался уровень глутаматной иннервации VGluT2 (средняя оптическая плотность).

Вестерн блот анализ белков pThr34DARPP-32 и DRD1

Белки из NAcc были разделены в SDS-PAGE геле и перенесены на PVDF мембрану (Thermo Scientific, USA). После блокировки в 5% молоке мембраны с белком инкубировались в кроличьих антителах против pThr34DARPP32 (SAB4504378, 1:1,000, Sigma-Aldrich), DARPP-32 (1:1,000, SAB4503330, Sigma-Aldrich), DRD1 (1:1,000, SAB4500671, Sigma-Aldrich) и β -актина (1:2,000, a9044, Sigma-Aldrich) (loading control) при комнатной температуре в течение 2 часов. Мембраны отмывались в TBST и инкубировались с вторичными противокроличьими HRP-конъюгированными антителами (1:10,000, a16096, Thermo Scientific) в течение 1 часа при комнатной температуре. Иммунопозитивные белковые бенды визуализировались при помощи Clarity Max ECL kit (Bio-Rad) с использованием ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad). Плотность бендов белков интереса оценивалась при помощи приложения ImageJ (НИН, Bethesda, MD, USA) и нормировалась на DARPP-32 (для pThr34DARPP32) и β -актин (для DRD1).

Оценка уровня дофамина методом ИФА

Образцы NAcc и VTA от 3-месячных крыс были гомогенизированы в PBS-буфере. Уровень дофамина оценивался с использованием Dopamine ELISA Kit (KA1887, Abnova) согласно фирменному протоколу в планшетном спектрофотометре (SPECTROstar NANO, BMG Labtech, Germany). Количество

дофамина оценивалось по стандартной кривой, и выражено в нг на мг общего белка. Общий белок оценивался с использованием Pierce™ Rapid Gold BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) согласно фирменному протоколу.

Статистический анализ

Полученные данные были статистически обработаны с использованием приложения Prism 9.2 (GraphPad, Inc). Все выборки оценивались на нормальность при помощи теста Шапиро-Уилка ($P > .05$) и построением графиков квантиль квантиль-квантиль (QQ-plot). Двух- и трехфакторная ANOVA и t-тест Стьюдента для независимых переменных были использованы, как параметрические тесты. Выборки, имеющие нормальные распределения представлены как среднее \pm SEM. *Post hoc* сравнения выполнялись с использованием теста Сидака. Результат принимался статистически значимым при $P < .05$. В случае отсутствия нормального распределения использовался U тест Манна-Уитни для сравнения двух независимых групп, и тест Краскела-Уоллиса для 3-х и более групп с *post hoc* тестом Данна без корректировок сравнения. Непараметрические распределения на графиках представлены медианой.

Результаты и их обсуждение

Оценка склонности к потреблению никотина проводилась в тесте свободного потребления с двумя бутылками. Во-первых, было оценено общее дневное количество потребленной жидкости на массу тела животного, которое было постоянным внутри групп и не отличалось между группами в течение 21 дня тестирования.

Далее, нами было обнаружено повышенное потребление никотина в течение 16 дней непосредственного эксперимента с никотином у группы ПГ (двухфакторная ANOVA, фактор Времени $F(1, 8) = 39.25$, $P < .001$, тест Сидака, $n=5-15$) (см. Рис. 1) в то время, как у контрольной группы изменения в потреблении отсутствовали ($P > .05$, тест Сидака, $n=5-14$). На 13-20 сутки группа ПГ потребляла больше никотина, чем контрольная группа (two-way ANOVA,

фактор Группы $F(1, 25) = 9.958, P < .01$, тест Сидака, $n=5$). При этом на 4-12 сутки какие-либо отличия отсутствовали.

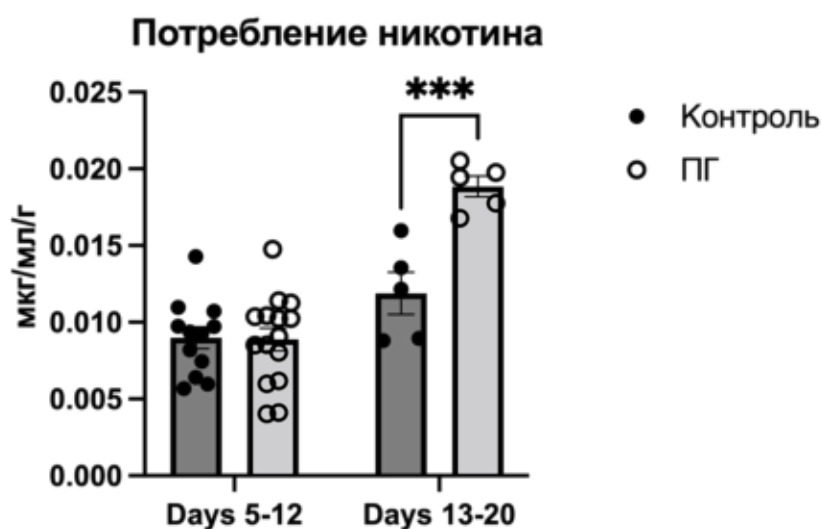


Рис 1. Потребление никотина у взрослых 3-месячных крыс.

На графике представлено потребление никотина каждой крысой, рассчитанное как отношение массы потребленного никотина к общей потребленной жидкости и массе животного. ***- $P < .001$

В тесте условнорефлекторного избегания места с использованием установки с рисунками в виде монохромных полос и кругов было выявлено, что после хронического введения никотина в дозе 9мг/кг в сутки, группа ПГ демонстрирует более выраженную аверсию к мекамиламин-ассоциированной части поведенческой установки по сравнению с получавшим никотин контролем ($P < .05$, тест Данна, $n=4-7$) и группой ПГ, не получавшей никотин ($P < .01$, тест Данна, $n=4-6$) (см. Рис 2). Интактные контрольные и ПГ крысы, получавшие физиологический раствор в обеих половинах установки, не демонстрировали предпочтения к какой-либо ее половине. Однако, была обнаружена тенденция к пребыванию интактных крыс в мекамиламин-ассоциированной половине установки, что, по-видимому, связано с его слабым анксиолитическим действием. Для ограничения этого эффекта нами было проведено дополнительное исследование мекамиламин-ассоциированной аверсии к никотину в аналогичной тестовой установке, но с черным или белым цветом стен, в которой введение мекамиламина ассоциировалось с черной половиной, предпочитаемой крысами по естественным причинам.

Избегание мекамиламин-ассоциированной половины установки

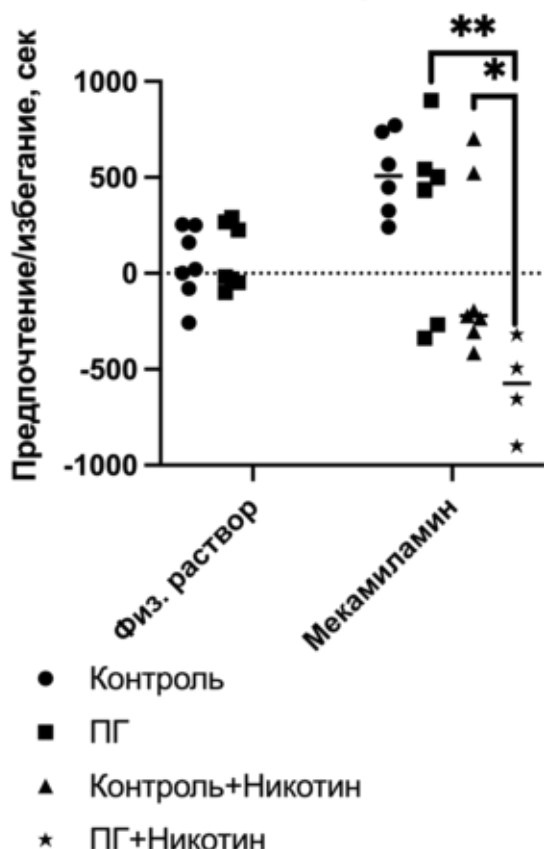


Рис 2.
Избегание/предпочтение мекамиламин-ассоциированной половины установки у 3-месячных крыс

На графике представлены результаты теста на избегание мекамиламин-ассоциированной половины тестовой установки, для соответствующих групп (монохромные круги и полосы). Время рассчитывалось, как разность времени пребывания в мекамиламин-ассоциированной половине установки и времени, проведенного в другой половине. Отрицательные значения проведенного времени в сек (медиана) соответствуют избеганию, положительные предпочтению. * - $P < .05$, ** - $P < .01$

Интактные контрольные и ПГ крысы, получавшие и не получавшие мекамиламин, а также никотиновые контрольные и ПГ крысы, не получавшие мекамиламин, демонстрировали отсутствие предпочтения к выходу в белую половину установки (см. Рис. 3). Значительно большее время в белой половине установки проводили контрольные и ПГ крысы, получавшие никотин в течение 14 суток и получавшие мекамиламин (трехфакторная ANOVA, факторы Мекамиламин x Никотин $F(1, 16) = 24.03$, $P < .001$, $n=5$). При этом склонность к избеганию черного сектора у ПГ крыс была в полтора раза выше, чем у контроля ($P < .05$, тест Сидака, $n=5$), что предположительно указывает на повышенную тяжесть синдрома отмены.

Проведенные поведенческие исследования позволяют сделать заключение, что пренатальная гипоксия предопределяет повышенную склонность к формированию никотиновой зависимости во взрослом возрасте.

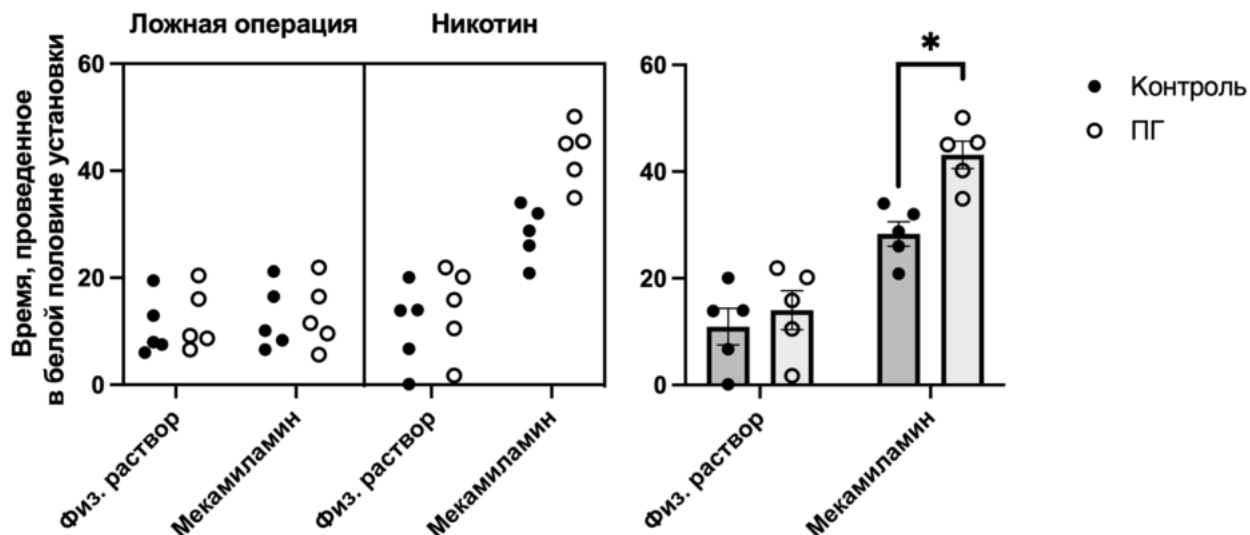
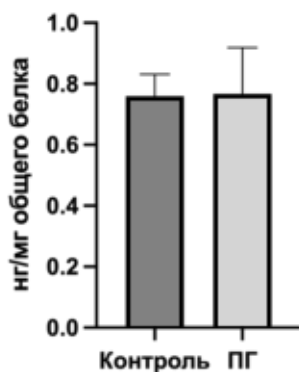


Рис 3. Избегание черной половины установки, ассоциированной с введением мекамилламина.

На левом графике продемонстрированы показатели времени, проведенного в белой половине тестовой установки в % у всей выборки животных, участвующих в тесте на избегание черной половины тестовой установки. Только животные, получавшие никотин в течение 2 недель и затем мекамилламин в черной половине тестовой установки демонстрировали ее избегание. Справа продемонстрированы графики сравнения времени, проведенного в белой половине тестовой установки у контрольных и ПГ крыс, получавших никотин в течение 2 недель и затем мекамилламин в черной половине установки (средняя \pm SEM). * - $P < .05$

Дальнейшей задачей исследования являлась оценка возможных изменений, вызванных пренатальной гипоксией в дофаминергической системе мозга взрослых крыс, с этой целью был проведен ее базовый скрининг. Нами не было обнаружено изменений в уровне дофамина в VTA ($P = .69$, тест Манна-Уитни, $n=5$) и стриатуме ($P = .96$, тест Стьюдента, $n=5$) (см. Рис 4). Также изменений не было обнаружено в количестве мажорных для NAcc DRD1 (дофаминовый рецептор первого типа) (см. Рис 5), опосредующих действие дофамина через аденилатциклазу и протеинкиназу A и прямо увеличивающих долю фосфорилированного по 34 треониновому остатку белка DARPP-32.

Уровень дофамина в стриатуме



Уровень дофамина в VTA

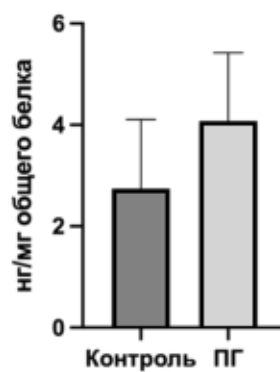


Рис 4. Уровни дофамина в стриатуме и VTA
На графиках представлен уровень дофамина, оцененный методом ИФА. Результат выражен отношением дофамина к общему белку (средняя \pm SEM).

Сам DARPP-32 является белком постсинаптических уплотнений, располагающимся в средних шипиковых нейронах стриатума. Функционально представляет собой релейный для дофаминового и глутаматного сигналинга белок.

Уровни DRD1 в NAcc

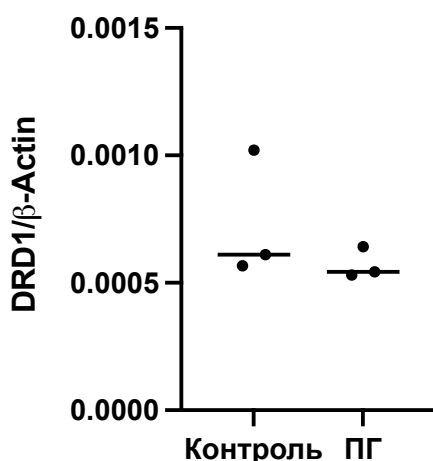


Рис 5. Уровень DRD1 в NAcc

На графике продемонстрированы результаты количественной оценки белка DRD1 методом вестерн блот в NAcc. Результат выражен отношением DRD1 к актину (медиана).

После связывания лиганда (дофамина) с DRD1 происходит активация аденилатциклазы, продукция цАМФ и сопряженная активация протеинкиназы А (РКА). Фосфорилирование DARPP-32 протеинкиназой А по 34 треониновому остатку конвертирует DARPP-32 в ингибитор протеинфосфатазы-1 (PP-1)[24]. РКА также приводит к активации РКА-чувствительной протеинфосфатазы 2А, дефосфорилирующей DARPP-32 по 75 треониновому остатку и ослабляющее его ингибирующее действие на РКА (механизм положительной обратной связи). В конце концов pThr34DARPP-32, как ингибитор PP-1 усиливает

фосфорилирование некоторых белков включая некоторые ионные каналы, включая NMDA и оказывая модулирующий эффект на глутаматную проводимость [25]–[27]. Следует также отметить, что NMDA-зависимое повышение внутриклеточного кальция дефосфорилирует pThr34DARPP-32 через PP2B (протеинфосфатаза 2B, кальцинейрин) [28]. (схему взаимодействий белка DARPP-32 см. на Рис 8)

Нами было установлено, что удельное содержание pThr34DARPP-32, относительно его общего количества в вентральном стриатуме ПГ крыс достоверно выше, чем у контроля ($P < .001$, тест Манна-Уитни, $n=9$) (см. Рис. 6B).

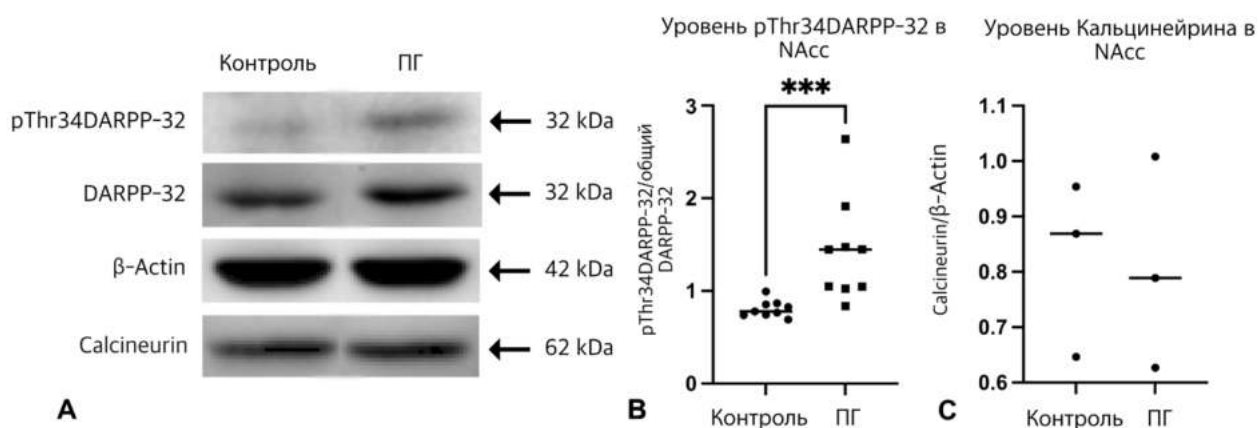


Рис 6. Уровни pThr34DARPP-32 (B) и Кальцинейрина (C) в NAcc

На рисунке (A) представлены репрезентативные иммуноблоты исследуемых белков, на графике (B) представлены данные уровня pThr34DARPP-32 нормированного на DARPP-32 (медиана). На рисунке (C) представлены данные по уровню кальцинейрина, нормированного на актин.

Увеличение содержания pThr34DARPP-32 в NAcc на фоне отсутствия изменений в количестве DRD1 и общего дофамина порождает 2 потенциальные гипотезы:

А) Усиленное фосфорилирование связано с повышенной дофамин-зависимой активацией D1-рецепторов, что может быть связано с усилением спайковой активности дофаминергических нейронов VTA.

Б) Ослабление глутаматного сигналинга в NAcc снижает Ca^{2+} -зависимую активность кальцинейрина, который дефосфорилирует pThr34DARPP-32. С

целью проверки гипотезы Б был оценен уровень кальцинейрина, отличия в котором обнаружены не были (Рис 6, С). Весьма вероятным предполагается ослабление глутаматной трансдукции к нейронам NAcc, также как было показано нами для гиппокампа ПГ крыс[29], однако данная гипотеза все еще нуждается в проверке.

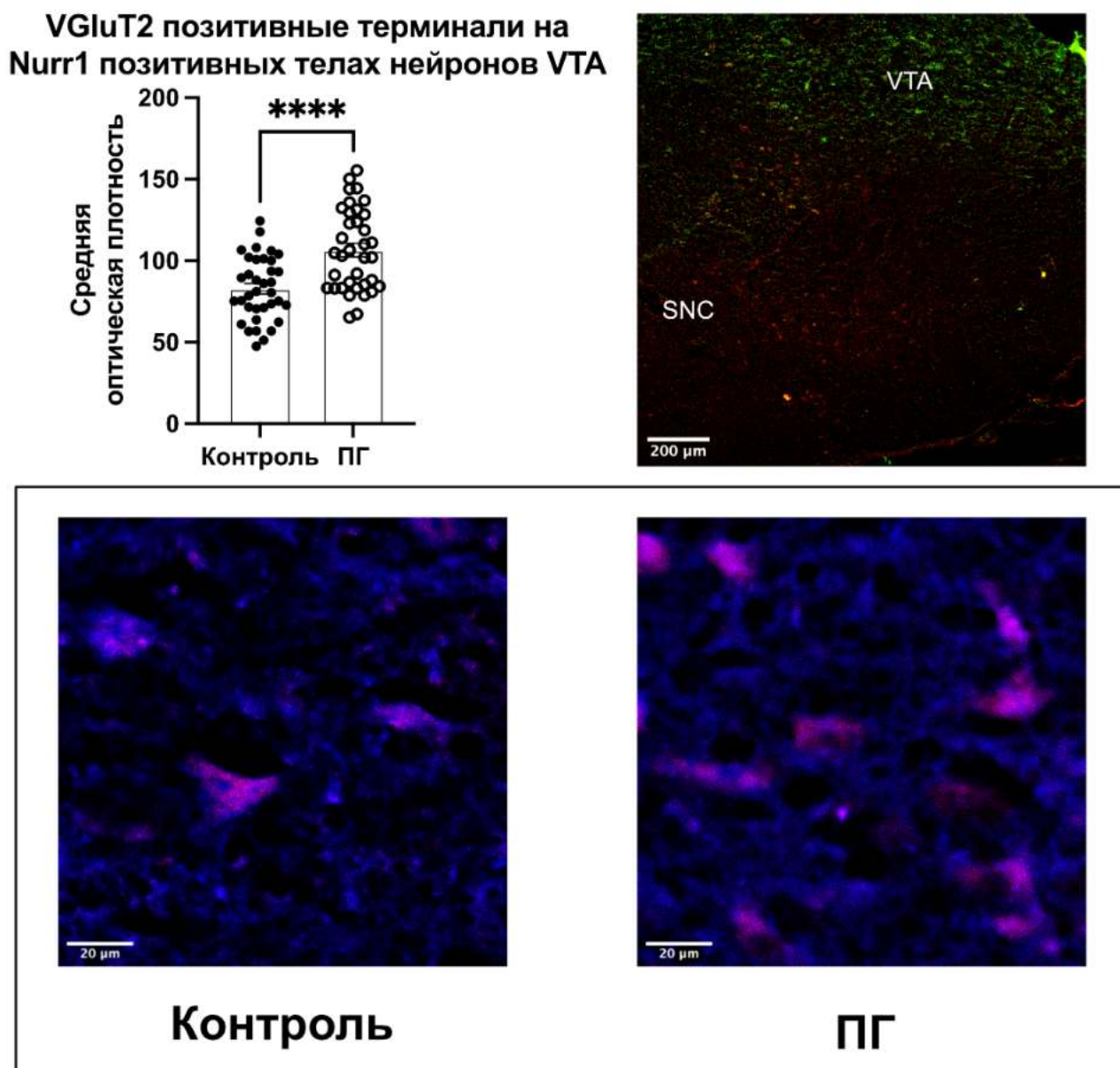


Рис 7. Иммуногистохимический анализ иннервации Nurr1 позитивных нейронов VTA VGluT2 позитивными глутаматергическими терминалями.

Сверху справа представлена микрофотография (x5) среза среднего мозга, содержащего VTA и компактную часть черной субстанции (SNC). Nurr-1 позитивные нейроны флюоресцируют в дальнем красном свете (CF633), TH позитивные нейроны в зеленом свете CF488A. Снизу представлены микрофотографии (x63) нейронов VTA, Nurr1 позитивные тела нейронов флюоресцируют в дальнем красном свете (CF633), VGluT2 позитивные терминалы

флюоресцируют в красном спектре (CF568), но для визуальной контрастности представлены в псевдосинем цвете. Результат на графике выражен в средней оптической плотности VGluT2 позитивного сигнала в Nurr1 позитивных областях изображения (нейронах) (средня \pm SEM) **** - $P < .0001$

Гипотеза А может иметь место при усилении глутаматной стимуляции дендритов и тел дофаминергических нейронов VTA, отдающих проекции в NAcc. С целью проверки гипотезы измененной глутаматергической стимуляции дофаминергических нейронов VTA, иммуногистохимическим методом было оценено количество VGluT2-позитивных глутаматергических терминалей, иннервирующих VTA. Нами было установлено увеличение VGluT2-позитивного (везикулярный глутаматный транспортер) сигнала на Nurr1 (Nuclear related-1 protein, транскрипционный фактор, маркер дофаминергических нейронов и их клеток-прекурсоров) и TH (тирозингидроксилаза, маркер катехоламинергических нейронов, в эксперименте является маркером зрелых дофаминергических нейронов) позитивных телах нейронов по сравнению с контролем ($P < .0001$, тест Стьюдента, $n=36$) (см. Рис 6), что потенциально может играть огромную роль в развитии именно никотиновой зависимости, поскольку в VTA nAChR7 располагаются преимущественно на глутаматергических терминалях.

Выводы

1. Пренатальная гипоксия пережитая на 14-16 сутки внутриутробного развития, вызывает повышенную склонность к потреблению никотина во взрослом возрасте у крыс.
2. Абстинентный синдром, вызванный отменой 2-недельного хронического приема никотина и форсированный однократным введением мекамиламина более выражен у крыс, переживших пренатальную гипоксию.
3. Эффект пренатальной гипоксии не связан с изменениями в биосинтезе или деградации дофамина в вентральной тегментарной области и прилежащем

ядре стриатума взрослых крыс, также он не связан с изменением в количестве дофаминового рецептора первого типа в прилежащем ядре.

4. Пренатальная гипоксия приводит к достоверному увеличению доли фосфорилированного по 34 треониновому остатку белка DARPP-32 в прилежащем ядре стриатума у взрослых крыс.
5. Изменения в паттернах фосфорилирования DARPP-32, по-видимому, связаны с изменениями в глутаматной трансдукции в вентральной тегментарной области и прилежащем ядре стриатума. У крыс, переживших пренатальную гипоксию достоверно увеличено количество VGluT2 позитивных терминалей в вентральной тегментарной области, что опосредованно должно усилить спайковую активность дофаминергических нейронов. (Результаты биохимической и иммуногистохимической части исследования проиллюстрированы на Рис 8)

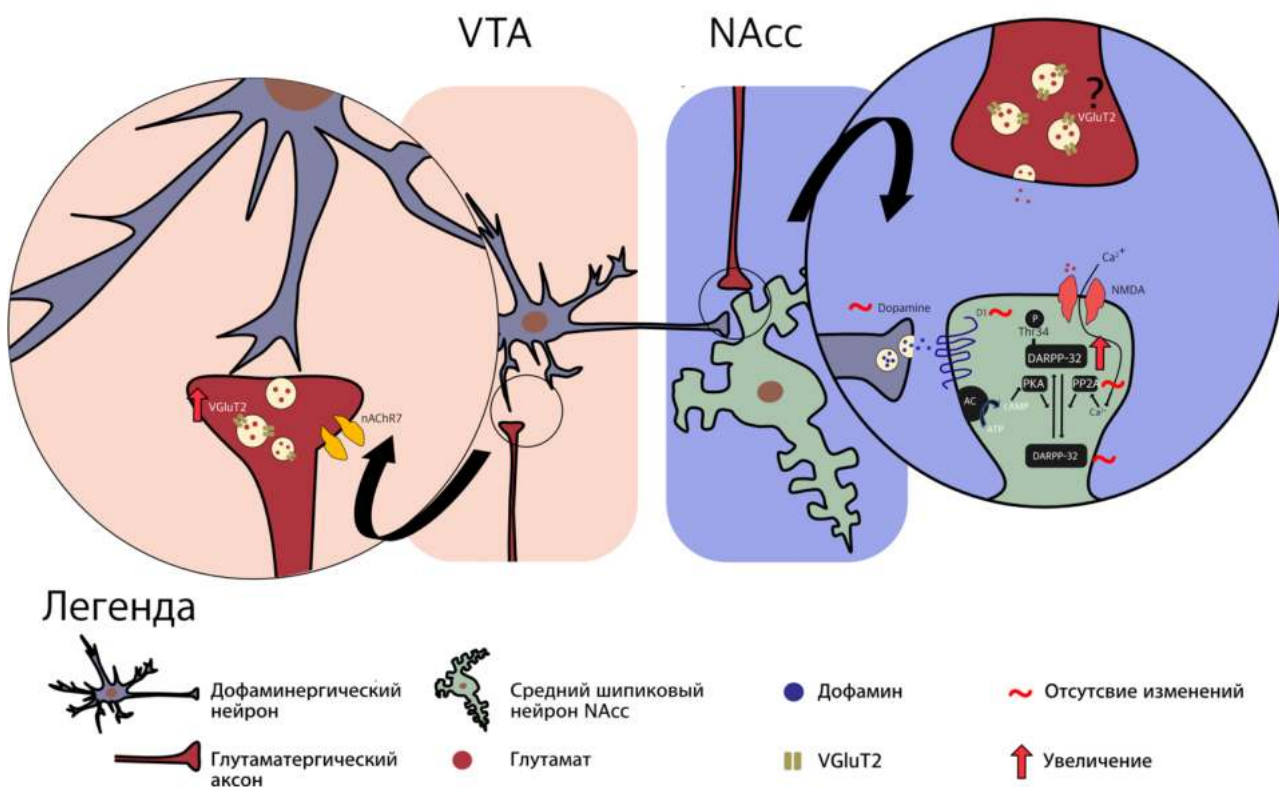


Рис 8. Графическая иллюстрация выводов

Апробация работы

По материалам работы опубликовано 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ и 18 тезисов конференций. Результаты работы представлены и обсуждены, в том числе на 1ST ESN Virtual Confrence, (2021); ISN-ASN Confrence (Montreal, 2019); XXIV Международной медико-биологической конференции молодых исследователей (Санкт-Петербург, 2021); XXVII Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОМЕДИЦИНЫ – 2021» (Санкт-Петербург, 2021); V Международной школе-семинаре по ранней помощи детям и их семьям (Санкт-Петербург, 2021); Международном молодежном научном форуме «ЛОМОНОСОВ-2021» (Москва); XXIV Научная школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии (Москва, 2020).

Список статей по теме работы

O. Vetrovoy, **V. Stratilov**, P. Nimiritsky, P. Makarevich, E. Tyulkova. Prenatal hypoxia induces premature aging accompanied by disturbed function of glutamatergic system in rat hippocampus. *Neurochemical Research*, 2021 (IF 3,038) DOI: 10.1007/s11064-020-03191-z (Q1)

Стратилов В.А., Ветровой О. В., Ватаева Л.А., Тюлькова Е.И. Ассоциированные с возрастом изменения в исследовательской активности в тесте «Открытое поле» у крыс, переживших пренатальную гипоксию. *Журнал высшей нервной деятельности*, 2021, том 71, No 3, с. 428–436. DOI: 10.31857/S0044467721030102

O. Vetrovoy, E. Tyulkova, **V. Stratilov**, K. Baranova, P. Nimiritsky, P. Makarevich, E. Rybnikova. Long-term effects of the prenatal severe hypoxia on central and peripheral components of the glucocorticoid system in rats. *Developmental Neuroscience*, 2020 (IF 3,041) DOI:10.1159/000512223 (Q2)

Stratilov V., Vetrovoy O., Tyulkova E. Prenatal stress as a factor of the development of addictive states. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* volume 56, pages 471–490 (2020) DOI:10.1134/S0022093020060010

Tyulkova, L. A. Vataeva, **V. A. Stratilov**, V. S. Barysheva, and O. V. Vetrovoy
Peculiarities of DNA and Histone H3 Methylation in the Hippocampus and
Neocortex of Rats Subjected to Pathological Treatments during the Prenatal Period.
Neurochemical Journal, 2020, Vol. 14, No. 1, pp. 64–72. DOI:
10.1134/S1819712420010195 (Q4)

L.A. Vataeva, E.I. Tyulkova, A.N. Alehin, **V.A. Stratilov**. Influence of hypoxia or
dexametazone in various terms of gestation on the conditional refractory fear
application in adult rats", *J. of Evolution Biochemistry and Physiology* Vol. 54, no
6, pp. 404-410 (IF 0,455) (Q4)

Список цитируемой литературы

- [1] S. S. Martins, J. Santaella-Tenorio, B. D. L. Marshall, A. Maldonado, and M. Cerdá, "Racial/ethnic differences in trends in heroin use and heroin-related risk behaviors among nonmedical prescription opioid users," *Drug and Alcohol Dependence*, vol. 151, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.drugalcdep.2015.03.020.
- [2] D. A. Nielsen *et al.*, "Former heroin addicts with or without a history of cocaine dependence are more impulsive than controls," *Drug and Alcohol Dependence*, vol. 124, no. 1–2, Jul. 2012, doi: 10.1016/j.drugalcdep.2011.12.022.
- [3] J. C. Crabbe, "Genetic Contributions to Addiction," *Annual Review of Psychology*, vol. 53, no. 1, Feb. 2002, doi: 10.1146/annurev.psych.53.100901.135142.
- [4] L. A. Briand and J. A. Blendy, "Molecular and genetic substrates linking stress and addiction," *Brain Research*, vol. 1314, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.brainres.2009.11.002.
- [5] S. Bloom, "Antenatal dexamethasone and decreased birth weight," *Obstetrics & Gynecology*, vol. 97, no. 4, Apr. 2001, doi: 10.1016/S0029-7844(00)01206-0.
- [6] N. P. French, R. Hagan, S. F. Evans, M. Godfrey, and J. P. Newnham, "Repeated antenatal corticosteroids: Size at birth and subsequent development," *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 180, no. 1, Jan. 1999, doi: 10.1016/S0002-9378(99)70160-2.
- [7] M. Nyirenda and L. Welberg, "Programming hyperglycaemia in the rat through prenatal exposure to glucocorticoids-fetal effect or maternal influence?," *Journal of Endocrinology*, vol. 170, no. 3, Sep. 2001, doi: 10.1677/joe.0.1700653.
- [8] J. Reinisch, N. Simon, W. Karow, and R. Gandelman, "Prenatal exposure to prednisone in humans and animals retards intrauterine growth," *Science*, vol. 202, no. 4366, Oct. 1978, doi: 10.1126/science.705336.
- [9] O. Vetrovoy *et al.*, "Long-Term Effects of Prenatal Severe Hypoxia on Central and Peripheral Components of the Glucocorticoid System in Rats," *Developmental Neuroscience*, 2021, doi: 10.1159/000512223.
- [10] F. Xiong and L. Zhang, "Role of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in developmental programming of health and disease," *Frontiers in Neuroendocrinology*, vol. 34, no. 1, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.yfrne.2012.11.002.
- [11] P. Tomalski and M. H. Johnson, "The effects of early adversity on the adult and developing brain," *Current Opinion in Psychiatry*, vol. 23, no. 3, May 2010, doi: 10.1097/YCO.0b013e3283387a8c.

- [12] Y. Li, P. Gonzalez, and L. Zhang, "Fetal stress and programming of hypoxic/ischemic-sensitive phenotype in the neonatal brain: Mechanisms and possible interventions," *Progress in Neurobiology*, vol. 98, no. 2, Aug. 2012, doi: 10.1016/j.pneurobio.2012.05.010.
- [13] M. Piešová and M. Mach, "Impact of perinatal hypoxia on the developing brain," *Physiological Research*, 2020, doi: 10.33549/physiolres.934198.
- [14] E. M. Graham, K. A. Ruis, A. L. Hartman, F. J. Northington, and H. E. Fox, "A systematic review of the role of intrapartum hypoxia-ischemia in the causation of neonatal encephalopathy," *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 199, no. 6, Dec. 2008, doi: 10.1016/j.ajog.2008.06.094.
- [15] J. J. Kurinczuk, M. White-Koning, and N. Badawi, "Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy," *Early Human Development*, vol. 86, no. 6, Jun. 2010, doi: 10.1016/j.earlhumdev.2010.05.010.
- [16] N. L. Benowitz, "Pharmacology of nicotine: Addiction, smoking-induced disease, and therapeutics," *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2009. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094742.
- [17] S. R. Laviolette and D. van der Kooy, "The neurobiology of nicotine addiction: bridging the gap from molecules to behaviour," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 5, no. 1, Jan. 2004, doi: 10.1038/nrn1298.
- [18] I. W. Jones and S. Wonnacott, "Precise localization of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors on glutamatergic axon terminals in the rat ventral tegmental area," *Journal of Neuroscience*, 2004, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3009-04.2004.
- [19] M. R. Picciotto and W. A. Corrigall, "Neuronal Systems Underlying Behaviors Related to Nicotine Addiction: Neural Circuits and Molecular Genetics," *Journal of Neuroscience*. 2002. doi: 10.1523/jneurosci.22-09-03338.2002.
- [20] S. S. Watkins, G. F. Koob, and A. Markou, "Neural mechanisms underlying nicotine addiction: Acute positive reinforcement and withdrawal," *Nicotine and Tobacco Research*. 2000. doi: 10.1080/14622200050011277.
- [21] J. A. Dani and D. Bertrand, "Nicotinic Acetylcholine Receptors and Nicotinic Cholinergic Mechanisms of the Central Nervous System," *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 47, no. 1, Feb. 2007, doi: 10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105214.
- [22] M. Marchi, F. Risso, C. Viola, P. Cavazzani, and M. Raiteri, "Direct evidence that release-stimulating $\alpha 7^*$ nicotinic cholinergic receptors are localized on human and rat brain glutamatergic axon terminals," *Journal of Neurochemistry*, vol. 80, no. 6, Mar. 2002, doi: 10.1046/j.0022-3042.2002.00805.x.
- [23] T. Suzuki, Y. Ise, M. Tsuda, J. Maeda, and M. Misawa, "Mecamylamine-precipitated nicotine-withdrawal aversion in rats," *European Journal of Pharmacology*, 1996, doi: 10.1016/S0014-2999(96)00723-6.
- [24] H. C. Hemmings, K. R. Williams, W. H. Konigsberg, and P. Greengard, "DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated neuronal phosphoprotein. I. Amino acid sequence around the phosphorylated threonine," *Journal of Biological Chemistry*, 1984, doi: 10.1016/s0021-9258(17)42625-1.
- [25] P. Greengard, P. B. Allen, and A. C. Nairn, "Beyond the dopamine receptor: The DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade," *Neuron*, vol. 23, no. 3. 1999. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80798-9.
- [26] P. Svenningsson, A. Nishi, G. Fisone, J. A. Girault, A. C. Nairn, and P. Greengard, "DARPP-32: An Integrator of Neurotransmission," *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 44. 2004. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121415.
- [27] S. Scheggi, A. Crociani, M. G. de Montis, A. Tagliamonte, and C. Gambarana, "Dopamine D1 receptor-dependent modifications in the dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein of

- Mr 32 kDa phosphorylation pattern in striatal areas of morphine-sensitized rats," *Neuroscience*, vol. 163, no. 2, 2009, doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.06.053.
- [28] A. Nishi *et al.*, "Regulation of DARPP-32 dephosphorylation at PKA- and Cdk5-sites by NMDA and AMPA receptors: Distinct roles of calcineurin and protein phosphatase-2A," *Journal of Neurochemistry*, vol. 81, no. 4, 2002, doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.00876.x.
- [29] O. Vetrovoy, V. Stratilov, P. Nimiritsky, P. Makarevich, and E. Tyulkova, "Prenatal Hypoxia Induces Premature Aging Accompanied by Impaired Function of the Glutamatergic System in Rat Hippocampus," *Neurochemical Research*, 2021, doi: 10.1007/s11064-020-03191-z.