

*На правах рукописи*

**ЛОПАТИНА**

**Ольга Леонидовна**

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

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени**

**доктора биологических наук**

03.03.01 - физиология

Санкт-Петербург - 2017

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, кафедра биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, Исследовательской лаборатории Центра изучения развития детей Университета г. Канадзава (Япония)

**Научные консультанты:**

доктор медицинских наук, профессор  
M.D., Ph.D., профессор

Салмина Алла Борисовна  
Хигашида Харуширо

**Официальные оппоненты:**

**Дубынин Вячеслав Альбертович** - доктор биологических наук, профессор, заместитель заведующего кафедрой физиологии человека и животных Биологического факультета ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова.

**Романова Ирина Владимировна** - доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Лаборатории сравнительной сомнологии и нейроэндокринологии ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук.

**Семьянов Алексей Васильевич** – член-корр. РАН, доктор биологических наук, руководитель Научно-исследовательского института нейронаук ФГБОУ ВО Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского».

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 года в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д002.020.01, созданного на базе ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН по адресу: 199034, г. 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://infran.ru/>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 года

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор биологических наук

Ордян Наталья Эдуардовна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Изучение физиологических, нейробиологических и нейрохимических механизмов формирования и реализации социального поведения в развивающемся и зрелом мозге в норме и при заболеваниях головного мозга – одно из актуальных направлений современной биологии и медицины, что связано с драматическим увеличением распространенности аберрантных форм поведения и отсутствием эффективных способов его коррекции. Так, за период с 1990 по 2013 гг. число людей, страдающих от депрессии и/или тревожных расстройств, возросло почти на 50% — с 416 миллионов до 615 миллионов человек в мире, а по оценкам ВОЗ, во время чрезвычайных ситуаций от депрессии и тревожных расстройств страдает каждый пятый человек, во всем мире насчитывается 47,5 миллиона людей с деменцией. Расстройства аутистического спектра (РАС) представляют собой группу нарушений развития, характеризующиеся дефицитом социального взаимодействия, а также ограниченными, повторяющимися и стереотипными моделями поведения, симптомы обычно проявляются в возрасте до 3 лет и отражают драматические события в развивающемся головном мозге, молекулярная основа которых до сих пор недостаточно понятна (Мисюк Н.Н. и др., 2012; Нейсон Б., 2016; Симашкова Н.В. и др., 2012). Вместе с тем, по данным Всемирной организации аутизма, в 2008 году 1 случай аутизма приходился на 150 детей, в 2014 году регистрировали 65-67 случаев на 10000 новорожденных.

Очевидно, что в основе социального поведения лежат сложные механизмы нейропластичности, в том числе опыт-индуцированной, которая регулируется широким спектром нейромедиаторов, нейропептидов, факторов роста и цитокинов. Нейропептид окситоцин (ОХТ), синтезируемый в гипоталамусе, участвует в формировании и реализации социального поведения у животных и человека (Bell et al., 2006; Di Simplicio et al., 2009; Norman et al., 2011), включая сексуальное поведение, межличностные взаимодействия, материнское (Feldman et al., 2010; Gordon et al., 2010a) и отцовское поведение (Gordon et al., 2010b), взаимодействие матери с новорожденным (Bartz et al., 2011; Lim, Young, 2006; Mehta et al., 2016), социальное распознавание (Kanat et al., 2017; Westberg et al., 2016) и социальную память (Brambilla et al., 2016; Zhang et al., 2016). Несмотря на значительные успехи в «складывании мозаики» генетических и молекулярных каскадов, инициируемых секрецией ОХТ, все еще остается открытым вопрос, как происходит регуляция продукции окситоцина гипоталамусом и его выделение в кровь нейрогипофизом при реализации социального поведения. До сих пор нет однозначной картины этиопатогенеза дефицита социализации и нарушений социальной памяти (Feldman et al., 2016b; Grinevich et al., 2016; Maroun, Wagner, 2016; Neumann, Slattery, 2016).

Молекулярные механизмы регуляции поведенческих реакций могут быть связаны с НАД<sup>+</sup>-гликогидролазой/CD38 - бифункциональным рецептором/ферментом, присутствующим во многих тканях организма и катализирующим образование и гидролиз циклической АДФ-рибозы (цАДФ-рибоза) и NAADP (Higashida et al., 2001; Lee, 2011; Lee, 2012b). цАДФ-рибоза и NAADP являются эндогенными регуляторами внутриклеточной мобилизации Ca<sup>2+</sup> и центральной секреции ОХТ (Higashida et al., 2007a). Однако цАДФ-рибоза-сопряженные механизмы функционирования нейронов изучены недостаточно. Так, известно, что меластатин-связанный канал транзиторного рецепторного потенциала 2 (TRPM2; ранее названный TRPC7 или LTRPC2) является Ca<sup>2+</sup>-проницаемым ионным катионным каналом и может активироваться посредством β-НАД<sup>+</sup>, АДФ-рибозилциклазы и цАДФ-рибозы. Предполагается, что каналы TRPM2 могут взаимодействовать с рецепторами, функционирующими через активацию цАДФ-рибозы (Beck et al., 2006; Guse, 2005). Но поскольку существует очень мало сообщений об активации CD38/АДФ-рибозилциклазы рецепторами, за исключением мускариновых, ангиотензиновых и брадикининовых (Deshpande et al., 2005; Higashida et al., 1997), остается открытым вопрос об активации TRPM2 цАДФ-рибозой при стимуляции ОХТ-рецепторов.

К настоящему времени известно, что CD38 участвует в регуляции секреции окситоцина, и нарушение экспрессии CD38 ассоциировано с развитием аутистических форм поведения у экспериментальных животных и человека (Jin et al., 2007), установлено, что гетерозиготная мутация в гене, кодирующем CD38, присутствует у части лиц мужского пола с аутизмом (Munesue et al., 2010; Munesue et al., 2016). Экспериментально доказано существование положительной обратной связи в окситоцин-индуцированном высвобождении ОХТ при реализации социальных взаимодействий на примере родительского поведения: повторный родительский опыт способствует запуску молекулярных механизмов ауторегуляции продукции окситоцина: ОХТ, связываясь с ОХТ рецепторами, индуцирует молекулярные каскады активации АДФ-рибозилциклазы и синтез цАДФ-рибозы в клетках гипоталамуса и нейрогипофиза у мышей-самцов, причем опосредованная окситоцином активация АДФ-рибозилциклазы носит дозозависимый характер и протекает с непосредственным участием протеинкиназы С (PKC) (Lopatina et al., 2010).

Наряду с CD38 и его ролью в реализации социального поведения, все большее внимание в данном контексте привлекает гомолог CD38, CD157/антиген стромальных клеток костного мозга-1 (BST-1). НАД<sup>+</sup>-гликогидролаза CD157/BST-1, одноцепочечная молекула, заякоренная с G-белком, принадлежащая к семейству АДФ-рибозилциклаз, поддерживает выживание и функцию В-лимфоцитов и гемопоэтических или кишечных стволовых клеток. Хотя CD157/BST1 является локусом риска при болезни Паркинсона, критически мало известно о возможной

физиологической роли CD157 в нервной системе и вкладе в процессы нейропластичности.

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

**Задачи исследования.**

1. Исследовать вклад цАДФ-рибозы и каналов TRPM2 в процессы ауторегуляции ОХТ через ОХТ рецепторы и сигнализации нейрональных клеток, опосредованные высвобождением внутриклеточного кальция.
2. Установить возможные молекулярные пути инициации окситоцин-индуцируемых и цАДФ-рибоза-опосредованных осцилляций  $[Ca^{2+}]_i$ .
3. Оценить возможность TRPM2 каналов выступать в качестве молекулы-мишени при заболеваниях, ассоциированных с нарушением социального поведения и стрессоустойчивости.
4. Обозначить роль экспрессии CD157 в нервной системе и в развитии нарушений реализации социального поведения, а также возможность использования *Cd157<sup>-/-</sup>* мышей как модели заболеваний, ассоциированных с нарушением социализации и нейро-социальной пластичности.
5. Изучить вклад CD157 и CD38 в процессы нейро- и синаптогенеза, и их роль в развитии экспериментальной хронической нейродегенерации.
6. Оценить роль CD157 в механизмах секреции и реализации эффектов окситоцина.
7. Обосновать и протестировать в эксперименте потенциальную возможность применения экзогенного ОХТ в качестве модулятора нейро-социально-коммуникативной пластичности, дополнив существующую концепцию позитивной обратной связи при введении экзогенного ОХТ и реализации социального поведения на молекулярном и поведенческом уровнях.

**Положения, выносимые на защиту.**

1. Каналы TRPM2 и цАДФ-рибоза опосредуют температурно-зависимое высвобождение кальция и участвуют в ОХТ-индуцируемой активации ОХТ рецепторов.
2. Каналы TRPM2 могут быть рассмотрены как новые молекулы-мишени при заболеваниях, ассоциированных с нарушением социального поведения и аберрантной чувствительностью к стрессовым факторам.

3. CD157 выступает как мультисистемный регулятор, и кодирующий его ген является геном-кандидатом и риск-фактором развития состояний беспокойства и тревожности, нарушенной чувствительности к стресс-факторам.
4. CD157 и CD38 участвуют в процессах развития головного мозга, нейропластичности за счет регуляции центральной секреции ОХТ, а также в процессах нейровоспаления при нейродегенерации.
5. Экзогенный ОХТ инициирует процессы нейропластичности через каскады активации ОХТ рецепторов с последующей положительной обратной связью в реализуемом социальном поведении и может выступать модулятором нейро-социальной когниции.

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

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

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

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

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

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

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

Полученные результаты формируют новое представление о процессах, ответственных за секрецию и биологическую активность окситоцина, в контексте его регуляторного влияния на процессы социального распознавания и социального

поведения как в норме, так и при развитии заболеваний, ассоциированных с нарушением социальных взаимодействий и эмоциональной сферы.

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

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

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

Результаты проведенных исследований имеют не только фундаментальное, но и прикладное значение в следующих направлениях развития биомедицины: 1) создание коллекций клеточных линий и линий животных, воспроизводящих социально значимые заболевания, в том числе заболевания ЦНС; 2) определение новых биологических мишеней, в том числе гормонов, ферментов, рецепторов, сигнальных внутриклеточных молекул, которые должны подвергаться воздействию синтетических молекул для предотвращения или ограничения патологического процесса; 3) структурно-функциональная характеристика тканей, клеток и клеточных элементов, обеспечивающих когнитивную и социальную функцию; 4) выявление молекулярных и клеточных мишеней, а также эффекторных молекул для диагностики, профилактики и терапии заболеваний головного мозга.

**Личный вклад соискателя.** Основные научные результаты по теме исследования получены лично автором. Совместно с научными консультантами определены цель, задачи, объем исследования, его этапы и направления. Соискателем самостоятельно разработаны протоколы и схемы экспериментов, сформированы экспериментальные группы. Соискатель осуществляла подробную работу с литературой, нейроповеденческое тестирование животных, забор биологического материала, анализ биологических образцов и интерпретацию полученных данных. Участие соискателя в работе представлено в опубликованных трудах. Личный вклад соискателя при выполнении комплексных экспериментальных исследований составил от 45 до 90%, в подготовку докладов и публикаций в соавторстве – 40-80%.

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

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

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 277 страницах машинописного текста, состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, содержащего 423 источника (40 отечественных и 383 иностранных), 13 приложений. Диссертационная работа иллюстрирована 5 таблицами, 81 рисунком.

## **ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Объекты исследования:** мыши линии **ICR**, **C57BL/6**, **Cd38<sup>-/-</sup>**, **Cd157<sup>-/-</sup>**, мыши с экспериментальной болезнью Паркинсона и болезнью Альцгеймера, мыши с локальным нокаутом по CD38 и TRPM2, и культуры клеток линии NG108-15 и HEK293 (**рисунки 1-3**). Эксперименты на животных были одобрены Биоэтической комиссией и Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России (№ 70/2016 от 06.06.2016 г.) и проводились согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. N755), национальному стандарту Российской Федерации ГОСТ Р53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. N708н г. Москва "Об утверждении Правил лабораторной



практики", в соответствии с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директиве Европейского сообщества (2010/63/ЕС).

**Нейроповеденческое фенотипирование животных** осуществляли с помощью тестов: индивидуальная локомоторная активность; анализ структуры следа половозрелых мышей; «Rota rod»; активность в домашней клетке; «Открытое поле», «Трехкамерный лабиринт»; «Черно-белая камера», «Приподнятый крестообразный лабиринт»; «Подвешивание за хвост», «Принудительное плавание»; «Acoustic startle response» (ответ на испуг); «Fear conditioning» - (чувство страха); тест с трубой; анализ ультразвуковой вокализации (USV) мышей.

**Определение уровня окситоцина в плазме крови, цереброспинальной (CSF) жидкости, в тканях головного мозга и перфузатах** определяли с помощью иммуноферментного анализа (Oxytocin ELISA kit, Assay Designs, США) Активность АДФ-рибозилциклазы определяли в гомогенатах тканей мышей в реакции с никотинамидгуанидиндинуклеотидом (Graeff et al., 1994).

**Иммуногистохимию на фиксированных срезах мозга** проводили классическими методами с использованием срезов разной толщины (5-10  $\mu\text{m}$  – фиксация на стекле; 30-50  $\mu\text{m}$ , метод свободно плавающих срезов) с последующей визуализацией (микроскоп Olympus IX71). Применены первичные антитела к молекулам c-fos, CD38 (Santa Cruz, США), CD157, Nestin, DCX, MAP2, PSD95, Staufen, Synaptophysin (Abcam, Великобритания), GFAP (Sigma, США), NeuN (Chemicon, США), вторичные антитела с метками TRITC, FITC, Alexa Fluor 488, 568, 350, Cy 5.5, а также краситель DAPI (Dojindo).

**ПЦР анализ** проводили с использованием стандартных наборов: (ОТ-ПЦР - TRIzol Reagent (Invitrogen, США) на градиенте S Mastercycler ep (Эппендорф, Германия); **ПЦР в реальном времени** - SuperScript™ First-Strand Synthesis System для RT-PCR (Invitrogen, США) с использованием системы VIIA™ 7 Real-Time PCR (Applied Biosystems, США).

**Применены следующие модуляторы молекулярных каскадов:** цАДФ-рибоза, 8-bromo-cADPR,  $\beta$ -НАД<sup>+</sup>, 2-АРВ, ОХТ (Sigma, США); 1,2-бис (2-аминофенокси) этан-N, N, N, N-тетраацетат (ВАРТА)-1 АМ (Eugene, США), Fura-2 АМ (Dojin, Япония).

**Осцилляции внутриклеточных концентраций кальция** регистрировали, используя Oregon Green 488 ВАРТА-1, либо Fura-2, как описано ранее (Higashida et al., 2007a).

**Внутричерепные манипуляции и забор тканей мозга** проводили по стереотаксическим координатам атласа мозга мыши (Franklin and Paxinos, 2008) в соответствии с поставленными задачами. **Ректальную температуру** мыши измеряли с использованием цифрового термометра (модель NS-TC10, Neuroscience Inc., Токио, Япония).

Средства для культивирования клеток: среда (DMEM), сыворотка (FCS) и Таq-полимераза (Invitrogen, США; Takara Biomedicals, Япония).



Рисунок 1 Дизайн блока исследовательской работы – *IN VIVO* - часть I.

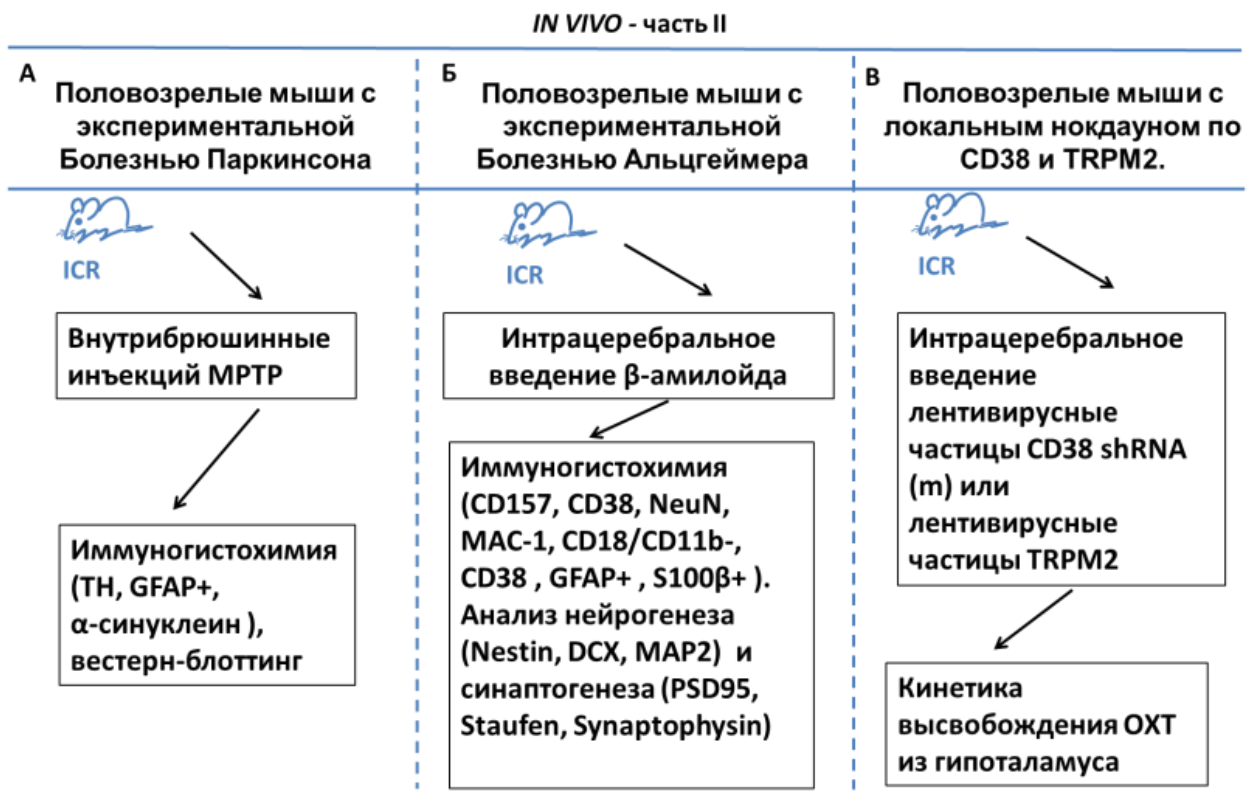


Рисунок 2 Дизайн блока исследовательской работы – *IN VIVO* - часть II.

## IN VITRO

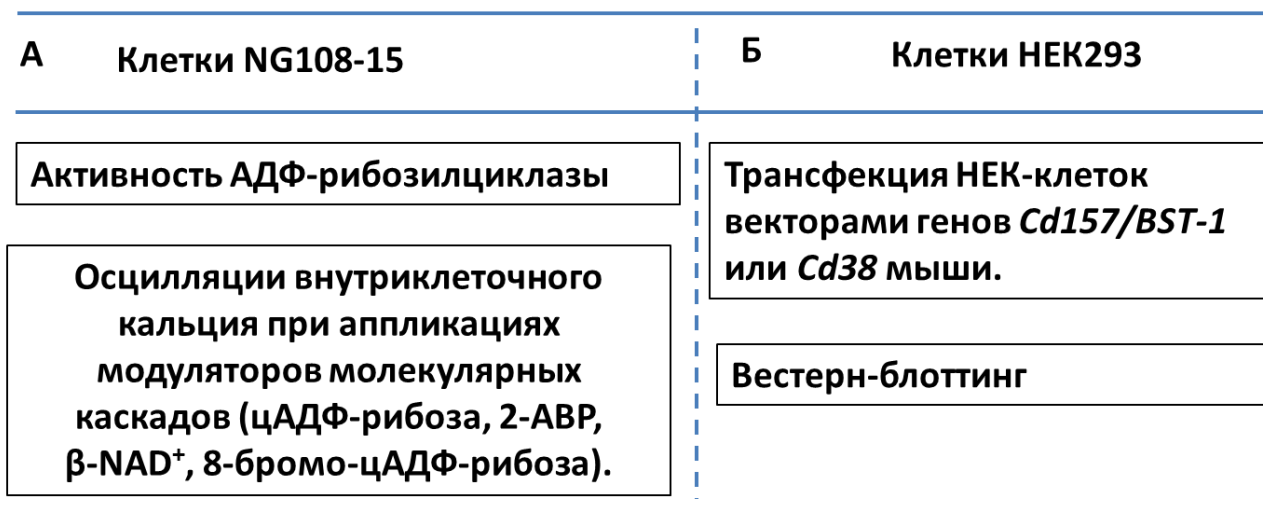


Рисунок 3 Дизайн блока исследовательской работы – *IN VITRO*.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного пакета “GraphPad Prizm 4” (версия 4.0, США). Данные представлены в виде: среднее значение (Mean)  $\pm$  стандартная ошибка среднего (S.E.M.). Критерий Колмогорова-Смирнова использовали для оценки нормальности распределения. Сравнения двух групп проводили с использованием t-критерия Стьюдента (при условии нормального распределения в выборках), и U-критерий Манна—Уитни - при несоблюдении условий нормальности распределения. Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) использовали при сравнении трех и более групп с одной переменной. Для оценки взаимосвязи двух переменных (например, *Генотип*  $\times$  *Возраст*; *Вводимое вещество*  $\times$  *Категория USV* и др.) применяли двухфакторный ANOVA. Последующее попарное сравнение групп проводили с помощью *post-hoc* Bonferroni's, Tukey's или Sidak's тестов множественных сравнений. Категориальные переменные сравнивали с помощью хи-квадрат ( $\chi^2$ ) теста. Колокализацию иммунореактивности оценивали с использованием коэффициента корреляции Пирсона и коэффициента перекрытия с помощью программного обеспечения Olympus FluoView (версия 4.0a, Япония). Различия принимали статистически значимыми при  $P \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### Особенности нейроповеденческого статуса у взрослых *Cd157<sup>-/-</sup>* мышей

Дневной и ночной ритмы были похожи у мышей дикого типа и мышей линии *CD157<sup>-/-</sup>* в течение 7 дней. Мы отметили, что *CD157<sup>-/-</sup>* мыши могут проводить достаточно долгое время без движения, что может привести к уменьшению общей двигательной активности в повседневной жизни, и, по-видимому, вытекает из конкретных эмоциональных состояний.

Процент времени, проведенного близко к несоциальному объекту во внутренней зоне лабиринта «Открытое поле», был значительно короче у мышей *Cd157<sup>-/-</sup>*, чем у мышей *Cd157<sup>+/+</sup>* ( $n=8$ ,  $P=0,0025$ ). Когда неизвестную мышшь-самца использовали как социальный стимул, нокаутные мыши проявляли повышенный интерес по сравнению с их интересом к несоциальному объекту. Тем не менее, *Cd157<sup>-/-</sup>* меньше входили во внутреннюю зону ( $n=8$ ,  $P=0,0074$ ) и оставались там более короткое время ( $n=8$ ,  $P=0,0351$ ) по сравнению с мышами дикого типа. Таким образом, наши результаты указывают на высокий уровень тревожности у *Cd157<sup>-/-</sup>* мышей и пониженный уровень интереса к другим объектам.

Поведение, связанное с тревожностью, было подтверждено с помощью теста «Черно-белая камера». *Cd157<sup>-/-</sup>* мыши входили в темную камеру со средней частотой  $2,2 \pm 0,4$  раза в течение 10-минутного теста, тогда как *Cd157<sup>+/+</sup>* мыши - с частотой  $8,6 \pm 2,4$  раза в течение того же промежутка времени ( $n=8$ ,  $P=0,0019$ ). В светлой зоне *Cd157<sup>-/-</sup>* мыши перемещались значительно медленнее, чем мыши *Cd157<sup>+/+</sup>* ( $n=8$ ,  $P=0,021$ ). И наоборот, когда мышью сначала помещали на темную арену до начала экспериментов, *Cd157<sup>-/-</sup>* мыши оставались в темноте в течение более длительного периода времени.

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

**Тревожное поведение и его коррекция.** Для подтверждения тревожности у *Cd157<sup>-/-</sup>* мышей мы применили тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» как наиболее классический и дополняющий «Открытое поле» и «Черно-белую камеру». *Cd157<sup>-/-</sup>* мыши оставались ненадолго в открытых рукавах ( $P=0,016$ ) и дольше находились в закрытых ( $P=0,0034$ ) по сравнению с контрольной группой. Для фармакологической коррекции тревожного поведения у *Cd157<sup>-/-</sup>* мышей использовали диазепам с концентрацией 1 мг/кг с введением (i.p.) за 30 мин до теста или мirtазапин в дозе 1 мг/кг (i.p.) один раз в день в течение 7 последовательных дней. Оба препарата восстанавливали поведение нокаутных мышей до уровня контрольной группы.

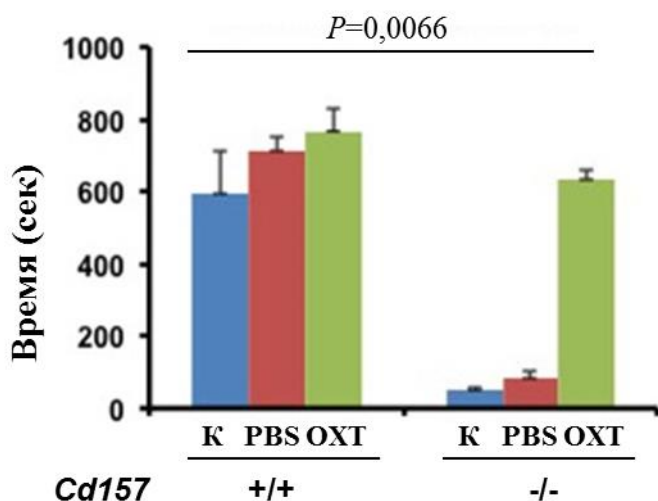
**Депрессивно-подобное поведение** исследовали с использованием тестов «Подвешивание за хвост» и «Принудительное плавание». Было выявлено значительное увеличение неподвижности во время испытаний подвешивания за хвост ( $n=20$ ,  $P=0,0195$ ) и принудительного плавания ( $n=10$ ,  $P<0,0224$ ) у *Cd157<sup>-/-</sup>* самцов мышей по сравнению с мышами контрольной группы.

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

**Социализация в трехкамерном лабиринте.** Мыши обоих генотипов не проявляли значимого предпочтения между левой и правой камерой в фазе привыкания. Не было различий в количестве входов в камеру со Stranger 1 у *Cd157<sup>-/-</sup>* мышей и контрольной группой ( $n=8$ ). Количество входов в камеру, содержащую социальную цель (Stranger 1), было одинаково у мышей обеих групп и значительно выше, чем количество входов в пустую камеру (двухфакторный ANOVA,  $F_{(2,28)}=73,673$ ,  $P=0,0085$ ). Процент социализации, который оценивался по проценту времени пребывания мыши в камере с социальным объектом, также был одинаково высок для обоих генотипов ( $n=8$ ). Когда второй социальный объект (Stranger 2) был помещен в правую камеру, количество входов в правую камеру было меньше у *Cd157<sup>-/-</sup>* мышей по сравнению с контрольной группой ( $n=8$ ; двухфакторный ANOVA, эффекты генотипа:  $F_{(1,32)}=1,057$ ,  $P=0,0678$ ). Таким образом, было выявлено, что *Cd157<sup>-/-</sup>* мыши демонстрируют одинаковый уровень социализации, но с присутствием социального избегания и/или искаженного социального предпочтения

**Эмоциональные ответы *Cd157<sup>-/-</sup>* мышей при страхе и испуге.** Чтобы подтвердить сенсорные особенности *Cd157<sup>-/-</sup>* мышей, был измерен их ответ на акустический пугающий стимул. Реакция испуга была значительно повышена у нокаутных мышей по сравнению с мышами дикого типа. *Cd157<sup>-/-</sup>* мыши демонстрировали более высокие реакции испуга почти во всех предстимульных состояниях, за исключением стимуляции при 90 дБ. Кроме того, сенсорные нарушения наблюдались также во время парадигмы контекстуального страха, что указывает на то, что делеция гена *Cd157* ассоциирована с нарушениями внимания и сенсорного восприятия.

**Коррекция пониженного уровня социализации с помощью экзогенного окситоцина.** Через 20 мин после внутривентральных инъекций ОХТ (100 нг/кг массы тела) *Cd157<sup>-/-</sup>* мышам их уровень социализации восстанавливался до уровня контрольной группы. Двухфакторный ANOVA выявил значительные эффекты взаимодействия *Фармакологическая Коррекция* x *Генотип* ( $F_{(2,42)}=5,674$ ,  $P=0,0066$ , рисунок 4).



**Рисунок 4 Социальное избегание в двухэтапном тесте «Открытое поле».** Время, проведенное во внутренней зоне в течение 10-минутного теста у *Cd157<sup>-/-</sup>* и *Cd157<sup>+/+</sup>* мышей после введения PBS или OXT. n=6-7; К - интактный контроль в каждой экспериментальной группе, двухфакторный ANOVA, влияние генотипа при коррекции OXT -  $F_{(1,11)}=13,01$ ;  $P<0,0001$ .

### Экспрессия CD157 в различные периоды онтогенеза

Иммунореактивность CD157 была обнаружена в следующих регионах головного мозга у мышей дикого типа: центральном амигдалоидном ядре, медиальном амигдалоидном ядре, задневисочной части, соматосенсорной коре, медиальной преоптической области, вторичной соматосенсорной коре и дугообразном гипоталамическом ядре. В других исследованных областях головного мозга была обнаружена незначительная экспрессия или ее вообще не наблюдали: гиппокамп, кора головного мозга, периринальная кора, ретроспленальная гранулярная область коры или область, прилежащая к ядру. Однако идентичная иммунореактивность не была обнаружена у *Cd157<sup>-/-</sup>* мышей. Иммунореактивность CD157 была обнаружена в цитоплазме или на клеточной поверхности многих, но не всех, Nestin-позитивных клеток в желудочковой и субвентрикулярной зонах у третьего желудочка в гипоталамусе эмбрионов E17 у мышей дикого типа. Степень перекрытия сигналов флуоресценции превышает 50%. По нашим оценкам, эта колокализация ограничена эмбриональными стволовыми клетками.

Мы проанализировали количество c-fos-иммунопозитивных клеток в миндалине мышей обоих генотипов после воздействию новой среды в тесте «Открытое поле» в течение 10 минут. Количество c-fos-иммунопозитивных клеток было значительно меньше у *Cd157<sup>-/-</sup>* мышей по сравнению с контрольной группой (n=4,  $P=0,0009$ ), свидетельствуя о менее развитой миндалине у нокаутных мышей и низкой функциональной компетентности нейронов в ней.

### Ферментативная активность CD157

Далее мы оценили, обладает ли CD157 двумя ферментными активностями и особенно активностью обмена по основанию, проведя трансфекцию НЕК-клеток генами *Cd157* или *Cd38* мыши. Активность АДФ-рибозилциклазы клеток, экспрессирующих *Cd157*, была выше, чем в вектор-трансфицированном контроле ( $P<0,001$ ) и ниже, чем у *Cd38*-трансфицированных клеток (n=3,  $F_{(8,34)}=9,01$ ,

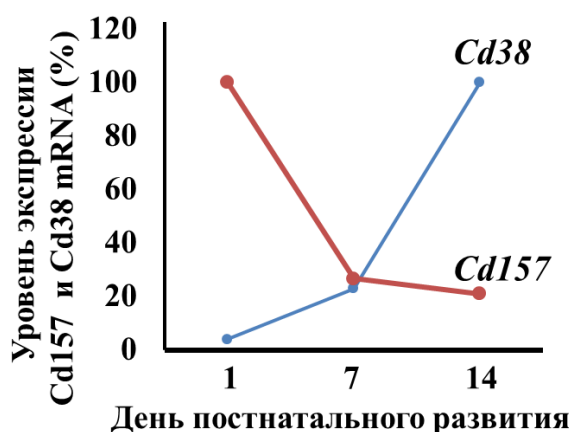
$P=0,0001$ ; однофакторный ANOVA). CD157 имеет очень низкую активность обмена оснований ( $F_{(2,37)}=36,26$ ,  $P=0,0001$ ,  $n=3$ , однофакторный ANOVA): клетки, трансфицированные Cd157, показали отсутствие или небольшую синтезирующую активность NAADP без заметных отличий от вектор-трансфицированного контроля. CD38+-клетки обладали значительно более высокой активностью в плане продукции NAADP по сравнению с контролем. Таким образом, роль CD157, вероятно, связана с производством цАДФ-рибозы, а не NAADP, и продукция цАДФ-рибозы за счет CD157 не является значимой, в отличие от CD38.

#### Активность АДФ-рибозилциклазы и уровень ОХТ в плазме крови у половозрелых мышей с делецией гена *Cd157*

Существенных различий в активности АДФ-рибозилциклазы в гипоталамусе ( $1584,1 \pm 53,1$  пмоль/мин/мг белка у *Cd157<sup>+/+</sup>* мышей;  $1509,2 \pm 71,5$  пмоль/мин/мг белка - у *Cd157<sup>-/-</sup>* мышей) и гипофизе ( $126,7 \pm 17,2$  пмоль/мин/мг белка у *Cd157<sup>+/+</sup>* и  $106,3 \pm 8,7$  пмоль/мин/мг белка и *Cd157<sup>-/-</sup>* мышей соответственно) между двумя генотипами не наблюдали. Измерение уровня ОХТ в плазме крови показало, что концентрация ОХТ у *Cd157<sup>-/-</sup>* мышей ( $457,1 \pm 54,1$  пг/мл,  $n=6$ ) была значительно ниже, чем у мышей контрольной группы ( $623,5 \pm 46,1$  пг/мл,  $n=6$ ,  $P=0,01$ ).

#### Экспрессия мРНК НАД+-гликогидролаз у новорожденных и взрослых самцов мышей

Далее мы оценили уровни экспрессии мРНК CD157 и CD38 в головном мозге *Cd157<sup>-/-</sup>* мышей-самцов. Экспрессия CD157 мРНК заметно снижалась в течение 7-14 дней постнатального периода относительно высоких уровней в эмбриональном периоде, тогда как экспрессия CD38 мРНК нарастала к 14 дню постнатального развития, и была выше в 25 раз по сравнению с первым постнатальным днём (рисунок 5).



**Рисунок 5** Схематическое изображение временного хода экспрессии CD157 и CD38 мРНК в головном мозге *Cd157<sup>-/-</sup>* мышей-самцов в постнатальные дни 1, 7 и 14.

Уровни экспрессии мРНК CD157 в различных областях головного мозга (большого мозга, мозжечка, гипоталамуса и полосатого тела) были крайне низкими по сравнению с уровнями в селезенке у взрослых самцов мышей C57BL/6 ( $n=5$ ; однофакторный ANOVA,  $F_{(2,40)}=195,94$ ,  $P=0,0001$ ). В отличие от этого мРНК CD38 экспрессировалась обильно в четырех исследованных



областях мозга без существенного различия в плотности по регионам, хотя эти плотности были значительно ниже, чем в селезенке ( $n=4$ , однофакторный ANOVA,  $F_{(4,20)}=9,78$ ,  $P=0,0001$ ).

### **CD38 и CD157 в процессах нейрогенеза и синаптогенеза**

Мы обнаружили, что делеция гена *Cd157* вызывает снижение пролиферации нейрональных клеток-предшественников в субгранулярной зоне зубчатой извилины, что видно по значительному снижению экспрессии маркера Nestin у *Cd157<sup>-/-</sup>* мышей в данном регионе мозга по сравнению с мышами дикого типа C57BL/6 ( $1,43\pm 2,36\%$  и  $8,0\pm 2,41\%$ , соответственно,  $P=0,0039$ ). Также была выявлена тенденция к снижению экспрессии маркера нейробластов (MAP2) в субгранулярной зоне зубчатой извилины у мышей, дефицитных по *Cd157* ( $12,64\pm 4,44\%$ ) по сравнению с контрольной группой ( $25,12\pm 5,77\%$ ,  $P=0,0410$ ). Однако не было найдено различий в экспрессии маркера незрелых нейронов (DCX) в экспериментальной и контрольной группах, что свидетельствует о том, что CD157 не контролирует количество незрелых нейронов.

Наблюдалось значительное снижение количества Nestin<sup>+</sup> клеток у *Cd38<sup>-/-</sup>* мышей ( $10,30\pm 3,83\%$  по сравнению с мышами дикого типа ICR ( $57,92\pm 6,19\%$ ),  $P=0,0024$ ). Это ассоциировано с тенденцией к снижению экспрессии MAP2 в субгранулярной зоне зубчатой извилины у мышей, дефицитных по *Cd38* ( $22,62\pm 6,48\%$  по сравнению с контролем ( $40,75\pm 5,13\%$ ),  $P=0,0334$ ). Делеция гена *Cd38* приводит к значительному снижению экспрессии DCX в экспериментальной ( $7,00\pm 1,51\%$ ) и контрольной ( $47,31\pm 3,79\%$ ,  $P=0,0154$ ) группах.

В субгранулярной зоне зубчатой извилины у *Cd157<sup>-/-</sup>* мышей выявлено статистически значимое снижение экспрессии маркера постсинаптической плотности PSD95 ( $18,79\pm 1,88\%$ ) по сравнению с контролем ( $40,51\pm 0,13\%$ ,  $P=0,0089$ ). Такое же наблюдение было сделано и при делеции гена *Cd38* ( $8,95\pm 1,41\%$  в сравнении с контролем ( $46,43\pm 1,43\%$ ),  $P=0,0008$ ).

Результаты исследования экспрессии Staufen (РНК-связывающий белок, участвующий в локализации и транспорте дендритной мРНК; маркер нейрональных РНК гранул) в зубчатой извилине гиппокампа у *Cd157<sup>-/-</sup>* мышей и мышей дикого типа C57BL/6 показали отсутствие статистически значимых различий ( $67,07\pm 4,28\%$  и  $69,19\pm 5,67\%$ , соответственно,  $P=0,7834$ ). Экспрессия клетками CD38 оказывает значительное влияние на экспрессию Staufen ( $60,07\pm 9,94\%$  - *Cd38<sup>-/-</sup>*,  $92,90\pm 5,25\%$  - *Cd38<sup>+/+</sup>*,  $P=0,0034$ ). Интересно, что делеция гена *Cd157* статистически значимо ассоциирована со снижением экспрессии синаптофизина (Synaptophysin), а нокаут по гену *Cd38* приводит к полному отсутствию Synaptophysin<sup>+</sup> клеток.

В целом, экспрессия CD157 и CD38 связана с прохождением клетками разных стадий нейрогенеза и, вероятно, актуальна для их дифференцировки;



отсутствие CD157 и CD38 подавляет процессы синаптогенеза, что сопровождается снижением экспрессии маркеров синаптической пластичности.

### **Особенности экспрессии CD38 и CD157 в клетках глиальной природы при экспериментальной нейродегенерации**

При исследовании экспрессии CD38 в клетках микроглии (MAC-1, CD18/CD11b-иммунопозитивные клетки) олифакторных луковиц мы не выявили статистически значимых различий ( $P=0,25$ ), хотя наблюдали тенденцию к увеличению экспрессии CD38 клетками микроглии данного региона при экспериментальной нейродегенерации ( $10,00\pm 2,77\%$  против  $5,96\pm 1,31\%$  группы с ложной операцией). При этом экспрессия CD38 на GFAP+ астроцитах обонятельных луковиц не отличается между анализируемыми группами. Вместе с тем, нами выявлено статистически значимое увеличение экспрессии CD38 в S100 $\beta$ + клетках ( $11,83\pm 2,04\%$ ) в сравнении с ложно-оперированными животными ( $5,27 \pm 0,69\%$ ,  $P=0,014$ ).

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

Таким образом, мы установили, что развитие нейродегенерации сопровождается увеличением экспрессии CD38 и CD157 в клетках микроглии, возможно ассоциированное с их активацией. Характерная экспрессия CD38 и CD157 в субпопуляциях астроцитов (CD38 в s100 $\beta$ +клетках, CD157 в GFAP+клетках) при нейродегенерации подтверждает ассоциированность молекул с разными стадиями дифференцировки клеток нейрогенных ниш.

### **Особенности развития и ультразвуковая коммуникация в период грудного вскармливания у *Cd157* нокаутных мышей**

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

*Cd157*<sup>+/+</sup> и *Cd157*<sup>-/-</sup> мыши самцы хорошо вокализируют на 3, 7 и 10 день постнатального периода при изоляции от матери. Двухфакторный ANOVA показал статистически значимое взаимодействие *Генотип* x *Возраст* ( $F_{(2,14)}=17,54$ ,

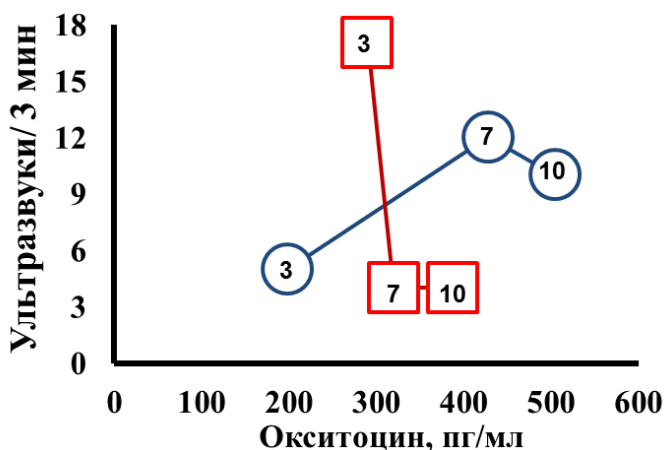
$P=0,0001$ ). *Post-hoc* Tukey's тест выявил, что количество USV было статистически значимо в PND 3 у  $Cd157^{-/-}$  мышей ( $17\pm 2$  ультразвуков/3 мин) по сравнению с контрольной группой ( $5\pm 1$  ультразвуков/3 мин,  $P=0,001$ ). В период первой постнатальной недели число USV, продуцируемых  $Cd157^{-/-}$  мышами, значительно упало до  $4\pm 2$  ультразвуков/3 мин в PND 10 ( $\chi^2=0,974$ ,  $P=0,02$ ), в то время как число USV у  $Cd157^{+/+}$  мышей возросло в PND 7 и 10 до  $12\pm 3$  и  $10\pm 2$  ультразвуков/3 мин соответственно. Между экспериментальной и контрольной группами наблюдали статистически значимые отличия ( $P=0,0001$ ). Категории вокализируемых ультразвуков мышами линии  $Cd157^{+/+}$  и  $Cd157^{-/-}$  в постнатальном периоде многообразны.  $Cd157^{-/-}$  мыши в возрасте 3х дней продуцируют USV трех категорий (72% downwards, 22% upwards, 6% chevron), тогда как  $Cd157^{+/+}$  детеныши идентичного возраста вокализируют только двумя категориями ультразвуков (15% upward, 85% downward). Двухфакторный ANOVA демонстрирует статически значимую взаимосвязь *Генотип* x *Категория USV* в PND 7 ( $F_{(2,114)}=22,39$ ,  $P=0,0001$ ).

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

Внутрибрюшинные инъекции ОХТ (10 нг/мышь) способствуют обогащению USV «репертуара»  $Cd157^{-/-}$  мышей в течение 30 мин по сравнению с исходным (таблица 1). Кроме того, двухфакторный дисперсионный анализ подтверждает статически значимую взаимосвязь *Вводимое вещество* x *Категория USV* ( $F_{(2,266)}=73,53$ ,  $P=0,001$ ). На 60 минуте после инъекции ОХТ спектр USV  $Cd157^{-/-}$  мышей содержал только 4-3 категории ультразвуков из 6 (регистрируемых на 30 минуте). Через 2 часа после введения ОХТ «репертуар» вокализации  $Cd157^{-/-}$  мышей возвращается к исходному уровню с двумя категориями USV. Становится

ясно, что ОХТ может восстановить дефицит вокализации *Cd157<sup>-/-</sup>* мышей до нормальной структуры дикого типа, и данный эффект является временным.

У мышей *Cd157<sup>+/+</sup>* количество продуцируемых ультразвуков ассоциировано с более высокой активностью АДФ-рибозилциклазы и уровнями ОХТ в плазме крови (**рисунок 6**) в зависимости от возраста. Напротив, у мышей *Cd157<sup>-/-</sup>* обнаружена отрицательная взаимосвязь между числом испускаемых ультразвуков и активностью АДФ-рибозилциклазы и ОХТ в плазме крови в первые 10 дней постнатального развития. На 30 и 60 минуте после введения ОХТ мы наблюдали моделирующие и статистически значимые изменения по количеству и качеству продуцируемых ультразвуков у мышей по сравнению с группой, которой вводился физиологический раствор. Таким образом, вполне вероятно, что изменения в продуцировании USV есть отражение сдвига уровней ОХТ в плазме крови (**таблица 1**).



**Рисунок 6** Концентрация окситоцина в плазме крови в профиле развития ультразвуковой вокализации у мышей-самцов линии *Cd157<sup>+/+</sup>* (круглый маркер) и *Cd157<sup>-/-</sup>* (квадратный маркер) на 3, 7 и 10 день постнатального развития. Данные были получены от детенышей в указанные PND (арабские цифры).

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

На седьмой день постнатального развития *Cd38<sup>-/-</sup>* мыши-самцы демонстрировали значительно более высокие уровни индивидуальной локомоторной активности в течение первых 3 мин после изоляции от матери. При анализе групповой активности *Cd38<sup>-/-</sup>* мыши-самцы также статистически значимо показали более высокую подвижность.

Детеныши мышей хорошо вокализировали при изоляции от матери. Свойства продуцируемых USV звуков были схожими по частоте ( $\sim 62 \pm 0,57$  кГц ( $n=23$ )) и продолжительности ( $\sim 64 \pm 2$  мсек) у мышей обеих групп. Однако количество испускаемых ультразвуков в течение 3-минутной сессии было меньше у *Cd38<sup>-/-</sup>* мышей ( $n=20$ ), чем у контрольных животных дикого типа ( $n=30$ ), со средним снижением на  $38 \pm 3\%$ . Эти результаты хорошо согласуются с предыдущими наблюдениями у нокаутных мышей по ОХТ и ОХТ-рецепторам. Тем не менее, степень нарушения поведения была более мягкой в случае *Cd38<sup>-/-</sup>* мышей по

сравнению с двумя генотипами, дефицитными по ОХТ и ОХТ-рецепторам. Это свидетельствует о том, что у *Cd38<sup>-/-</sup>* мышей частично сохраняется способность к социальному взаимодействию с другими особями, что видно в контроле. Это предположение побудило нас измерить уровни ОХТ в плазме крови и оценить влияние эндогенного ОХТ на поведение.

**Таблица 1. Количественные и качественные характеристики ультразвуковой вокализации, и уровень ОХТ в плазме крови, у *Cd157<sup>-/-</sup>* мышей-самцов (PND7).**

<i>CD157<sup>-/-</sup>, PND7</i>					
Исследуемые характеристики	Вводимое вещество (i.p.)	Время после введения вещества (i.p.), мин			
		0'	30'	60'	120'
Вокализируемые ультразвуки/3 мин (n=8-14)	контроль	3±2			
	PBS		5±2	4±2	4±2
	ОХТ		4±2	<b>9±1*</b>	5±1
Частота, кГц (n=18)	контроль	65,0±1,3			
	PBS		67,1±1,5	66,4±2,3	64,3±3,1
	ОХТ		<b>56,4±2,7*</b>	<b>54,7±2,3*</b>	63,3±2,2
Продолжительность, мсек (n=18)	контроль	49,7±2,1			
	PBS		51,3±2,1	50,9±2,5	50,3±1,8
	ОХТ		<b>57,7±0,9*</b>	<b>59,5±0,8*</b>	53,3±3,2
Уровень ОХТ в плазме крови в пг/мл (n=8-14)	контроль	318,5±37,9			
	PBS		312,5±33,3	320,7±27,8	323,7±19,5
	ОХТ		<b>646,9±84,6*</b>	<b>549,4±24,9*</b>	346,3±32,8

\**P*<0,001- ОХТ против PBS.

### **Уровень ОХТ в плазме крови и активность АДФ-рибозилциклазы в тканях головного мозга у *Cd38<sup>-/-</sup>* мышей (модель экспериментального аутизма)**

Мы изучили АДФ-рибозилциклазную активность в гипоталамусе и задней доле гипофиза у мышей дикого типа и нокаутных животных в течение первых двух месяцев жизни. В исследуемых областях мозга АДФ-рибозилциклазная активность была выше у мышей контрольной группы 1-недельного возраста, чем у нокаутных мышей того же возраста, но разница не была значительной. Со второй недели жизни мыши контрольной группы показали значительно более высокий уровень активности АДФ-рибозилциклазы в гипоталамусе и гипофизе по сравнению с *Cd38<sup>-/-</sup>*

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

В гипоталамусе активность АДФ-рибозилциклазы увеличивалась с возрастом у мышей контрольной группы, но только небольшое снижение наблюдалось у *Cd38<sup>-/-</sup>* мышей. Активность АДФ-рибозилциклазы была ниже в гипофизе, чем в гипоталамусе у мышей обеих линий. Ни у мышей *Cd38<sup>+/+</sup>*, ни у *Cd38<sup>-/-</sup>* животных не было обнаружено значимых изменений активности АДФ-рибозилциклазы в процессе развития.

Несмотря на небольшие отклонения в ультразвуковой вокализации и локомоторной активности у мышей линии *Cd38<sup>-/-</sup>*, возможность фармакологической коррекции с помощью экзогенного ОХТ в детском возрасте не представляла интереса, поскольку уровень окситоцина у мышей самцов был таким же, как и у контрольной группы. Однако, интересен тот факт, что уровень окситоцина ни в молочной железе, ни в грудном молоке нокаутных животных не отличался от контрольной группы.

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

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

Мы попытались ответить на следующие вопросы: может ли внеклеточная аппликация цАДФ-рибозы активировать сигнализацию  $[Ca^{2+}]_i$  или TRPM2 каналы через CD38. Для этих целей были использованы гибридные клетки NG108-15 (*клетки нейробластомы мыши x клетки глиомы крысы*), экспрессирующие CD38, но не окситоциновые рецепторы (Higashida et al., 2007a). Данная модель является широко используемой для изучения эффектов цАДФ-рибозы. Известно, внутриклеточная активация цАДФ-рибозы вызывает потенциал-зависимое мембранное возрастание свободного цитозольного  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) (Hashii, Minabe, Higashida, 2000). Мы измерили  $[Ca^{2+}]_i$  в клетках NG108-15 дикого типа до и после стимуляция внеклеточной аппликацией 50мМ цАДФ-рибозы (Hashii et al., 2000) с

использованием  $\text{Ca}^{2+}$  индикаторного красителя, Oregon Green BAPTA AM. NG108-15 клетки демонстрировали небольшое, но значимое увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в ответ на цАДФ-рибозу при 35°C. Средняя концентрация  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  после стимуляции цАДФ-рибозой составила  $121 \pm 7\%$  ( $n=4$ ;  $P=0,0098$ ) от предстимуляционного уровня. Интересно, что клетки NG108-15 показали статистически значимое увеличение при внеклеточной аппликации 50 мкМ цАДФ-рибозы наряду с увеличением температуры до 40°C. Средний пиковый уровень составил  $169 \pm 12\%$  ( $n=5$ ;  $P=0,0076$ ), что было значительно больше, чем при 35°C ( $P=0,0007$ ). При температурном сдвиге до 40°C без агониста уровень  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  составил  $111 \pm 2\%$  от уровня при 35°C ( $n=6$ ). Это увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в ответ на комбинацию изменения температуры и введения цАДФ-рибозы очень похоже на наблюдаемые в клетках НЕК-293, экспрессирующие каналы TRPM2 (Togashi et al., 2006). Ингибитор TRPM2 2-APB при более низкой концентрации ингибирует приток кальция через каналы TRPM2, активируемые лигандами и теплом. Мы обнаружили, что наблюдаемое повышение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  с помощью внеклеточного применения цАДФ-рибозы (50 мМ) и повышенной температуры полностью подавляется предварительной аппликацией 2-APB, в концентрации, способной ингибировать каналы TRPM2 человека (Togashi et al., 2006).

### **Модуляция стимулированного уровня внутриклеточного кальция 8-bromo-cADPR**

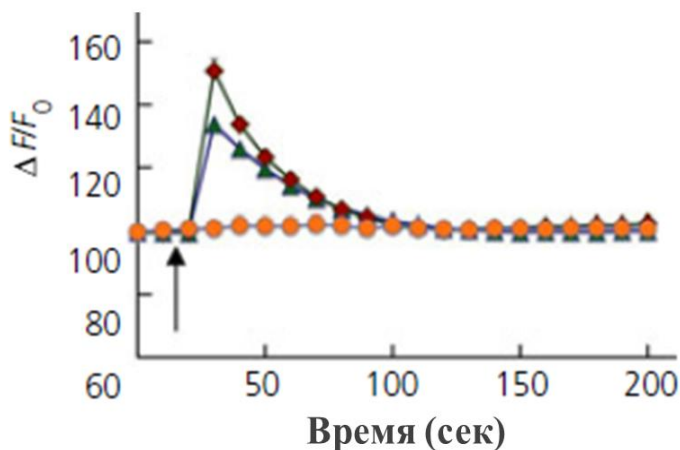
Мы рассмотрели эффекты 8-bromo-cADPR (антагонист высвобождения  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных пулов  $\text{Ca}^{2+}$  путем ингибирующего связывания цАДФ-рибозы) на высвобождения кальция с участием рианодиновых рецепторов (Lee, 2001; Walseth and Lee, 1993). 8-bromo-cADPR (50 мМ) значительно ингибирует цАДФ-рибоза/термо-индуцированное увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  - пиковый уровень составил  $121 \pm 9\%$  от уровня предстимуляции. Аналогичным образом эффект 8-bromo-cADPR наблюдали в ответах на стимуляцию 100 мМ  $\beta$ -НАД<sup>+</sup> и температурой:  $138 \pm 5\%$  и  $118 \pm 13\%$  в отсутствие и присутствии 8-bromo-cADPR соответственно. Эффект  $\beta$ -НАД<sup>+</sup> и тепла также был ингибирован аппликацией 10 мМ никотинамида, ингибитора превращения  $\beta$ -НАД<sup>+</sup> в цАДФ-рибозы. Таким образом, мобилизация  $\text{Ca}^{2+}$  из внутренних пулов  $\text{Ca}^{2+}$  осуществляется за счет цАДФ-рибозы.

Также нами было исследовано влияние АДФ-рибозы (агонист TRPM2 каналов; не влияет на опосредованное рианодиновыми рецепторами высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$  - отличие от цАДФ (Bruzzone et al., 2001). Повышение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , вызываемое АДФ-рибозой (50 мМ) и теплом, было очень небольшим, но статистически значимым ( $118 \pm 4\%$ ,  $n=4$ , однофакторный ANOVA -  $F_{(1,28)}=16,98$ ,  $P=0,0356$ ). Продолжительность всплеска  $\text{Ca}^{2+}$  составляло 1-2 мин. Этот результат согласуется с наблюдениями в клетках НЕК-293, в которых кратковременное

применение АДФ-рибозы приводило к открытию канала TRPM2 в течение 1-2 мин (Bruzzone et al., 2001).

### Окситоцин-индуцируемое повышение содержания кальция в OXTR<sup>+</sup>-клетках NG108-15

Чтобы проанализировать, действует ли цАДФ-рибоза в качестве вторичного мессенджера рецепторов к окситоцину и является ли TRPM2-подобным термочувствительным каналом, активируемым стимуляцией окситоцинового рецептора, мы использовали клетки NG108-15 с трансфекцией кДНК рецепторов окситоцина (OXTR) человека. Как показано на **рисунке 7**, применение 100 нМ ОХТ (концентрация, при которой наблюдается максимальная активация АДФ-рибозилциклазы в гипоталамусе мышей) повышает  $[Ca^{2+}]_i$  до  $134 \pm 3\%$  ( $n=7$ ) и  $151 \pm 4\%$  ( $n=7$ ) при  $35^\circ C$  и  $40^\circ C$ , соответственно. Применение однофакторного ANOVA подтверждает статистически увеличение  $[Ca^{2+}]_i$  в 1,5 раза при повышении температуры  $40^\circ C$  ( $F_{(1,32)}=15,70$ ,  $P=0,001$ ).



**Рисунок 7** Влияние окситоцина на  $[Ca^{2+}]_i$  в контроле или клеток NG108-15 клеток с экспрессией окситоциновых рецепторов (OXTR) человека.  $[Ca^{2+}]_i$  измеряли либо при  $35^\circ C$  ( $\Delta$ , OXTR<sup>+</sup>) или  $40^\circ C$  ( $\diamond$ , OXTR<sup>+</sup>). Контроль – клетки без экспрессии OXTR (O). Стрелка указывает на добавление ОХТ (конечная концентрация - 100 нМ).

Данные показаны в виде отношения изменения интенсивности флуоресценции к состоянию покоя ( $\Delta F/F_0$ ).  $n=7$ .

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

Полученные нами данные на клетках NG108-15 свидетельствуют о том, что катионный канал TRPM2 и CD38 одновременно участвуют в термо-индуцируемом и  $\beta$ -НАД<sup>+</sup>- метаболит-чувствительном возрастании  $[Ca^{2+}]_i$  в окситоцинергических нейронах. Далее мы обратили внимание на высвобождение ОХТ в зависимости от активности каналов TRPM2 и исследовали, участвуют ли CD38 и TRPM2 в иницировании высвобождения ОХТ из остро-культивируемого гипоталамуса мыши посредством тепловой стимуляции и внешней аппликации цАДФ-рибозы в присутствии (или без) ингибитора TRPM2 или ингибитора рианодиновых рецепторов у мышей дикого типа и *Cd38*<sup>-/-</sup> мышей. Мы также исследовали кинетику изменения концентрации ОХТ в инкубационной среде с интервалами 3 мин в

одном культивированном гипоталамусе от каждой мыши, принадлежащей к группе дикого типа ICR. Кинетика высвобождения ОХТ с двумя стимулами была также исследована на гипоталамусе у мышей с локальным нокдауном по CD38 и TRPM2 (трансфицированных специфическими siRNAs).

В начале экспериментов мы ожидали, что эти факторы будут значительно влиять на выброс окситоцина у всех мышей. Неожиданно мы обнаружили разную чувствительность гипоталамусов к инкубации с 100 мкМ цАДФ-рибозы и сдвигу в температуре инкубации от 35°C до 38,5°C. У большинства исследованных животных (69,6%, n=46) уровень ОХТ увеличивался незначительно. Было отмечено, что секреция ОХТ значительно различалась у индивидуумов мышей (при групповом содержании) с травмами или без них. Это указывает на то, что групповое содержание мышей-самцов ассоциировано со стрессом и формированием социальной иерархии (Long et al, 1990; Rasmussen et al., 2011). Чтобы получить более прямое свидетельство относительно дифференциального выделения ОХТ в двух классах (доминирующих и подчиненных) мышей, мы провели эксперименты по микроперфузии мозга и измерили концентрации ОХТ в микроперфузатах гипоталамуса. Чтобы прояснить связь между высвобождением ОХТ и температурой в стрессовых условиях *in vivo*, мы использовали два различных стрессовых состояния, которые повышают температуру тела: тест «открытое поле» (стресс беспокойства из-за новой окружающей среды (LeMay, Vander, Kluger, 1990); и модель с введением липополисахарида (LPS) - индуцированная лихорадка (Yirmiya, 2001). Мы измеряли ректальную температуру и концентрации ОХТ в CSF в обеих моделях. Наконец, чтобы объяснить более легкое высвобождение ОХТ у подчиненных мышей с социальным стрессом на молекулярном уровне, мы исследовали уровни экспрессии CD38 и TRPM2 в гипоталамусе, измеряя уровни мРНК и иммунореактивности CD38 и TRPM2.

### **Высвобождение ОХТ стимулируется цАДФ-рибозой и нагреванием *in vitro***

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

Увеличение кратности концентрации ОХТ, индуцированное цАДФ-рибозой и нагреванием, значительно ингибировалось неспецифическим ингибитором



TRPM2 2-APB ( $1,4 \pm 0,29$ -кратное увеличение по отношению к предшествующему уровню стимуляции,  $n=7$ ), и антагонистом рианодиновых рецепторов 8-bromo-cADPR ( $1,4 \pm 0,29$  раза относительно уровня предварительной стимуляции,  $n=7$ , двухфакторный ANOVA,  $F_{(12,78)}=6,40$ ,  $P=0,0001$ ). *Post-hoc* Bonferroni's тест показал статистически значимую разницу между группами, обработанными «цАДФ-рибоза + температура» в сравнение 2-APB ( $P=0,001$ ), и «цАДФ-рибоза + температура» по сравнению с 8-bromo-cADPR ( $P=0,01$ ) на 12 и 15 минуте.

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

Вовлечение CD38 и TRPM2 в высвобождение ОХТ было исследовано фармакологически в вышеуказанных экспериментах. Все описанные выше эксперименты были выполнены с использованием тканей гипоталамуса мышей, которые содержались в группах по генотипу,  $Cd38^{+/+}$  или  $Cd38^{-/-}$ . Таким образом, генетические доказательства участия CD38/цАДФ-рибоза ясны, но для TRPM2 это не так. Было интересно провести эксперименты по термо- и цАДФ-рибоза-зависимому высвобождению ОХТ у мышей, нокаутных по TRPM2 (Uchida et al., 2011), чтобы получить более ясное понимание участия TRPM2 в высвобождении ОХТ. Однако когда мы измерили уровни экспрессии в гипоталамусе мышей дикого типа C57BL/6, мы обнаружили, что уровень мРНК TRPM2 каналов был относительно низким. Поэтому мы не проводили экспериментов на мышах, нокаутных по TRPM2, вместо этого мы применили парадигму нокаута с помощью «мешающей» РНК при высвобождении ОХТ из гипоталамуса.

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

## **Высвобождение ОХТ *in vitro* у социально стрессированных мышей**

Чтобы подтвердить, что изменения в высвобождении ОХТ были связаны с различиями в социальном статусе, вызванными групповым содержанием, мы применили парадигму психологического стресса. Сначала двенадцать мышей из смешанных помесей испытывали парным путем 14-20 раз в тесте с трубкой, определяя мышей в доминирующие, промежуточные и подчиненные группы. Самая сильная мышь (#1) была соединена с самой сильной мышью в подчиненной группе (#9), и аналогичным образом #2, 3 и 4 мышей спаривались с #10, 11 и 12 мышами в четырех клетках. Разбитые по парам мыши испытывали стресс «смены клетки» (психологический стресс), путем перемещения их в чистые клетки каждое утро в течение 4 дней. Количество высвобожденного ОХТ измеряли в гипоталамусе, изолированном от одной трети побеждающих мышей (доминантная группа) и одной трети покорных мышей (подчиненная группа).

Подчиненная группа ( $n=25$ , однофакторный ANOVA,  $F_{(6, 168)}=2,30$ ,  $P=0,0234$ ) выделяет намного больше ОХТ в ответ на тепло-стимуляцию или в комбинации с цАДФ-рибозой ( $n=13$ , однофакторный ANOVA,  $F_{(6, 84)}=2,32$ ,  $P=0,0187$ ). Увеличение складки кривой концентрации ОХТ в ответ на воздействие теплом и цАДФ-рибозой составляло  $1,73\pm 0,64$  и  $2,08\pm 0,37$  относительно уровня предварительной стимуляции у подчиненных и доминантных мышей соответственно. Двухфакторный ANOVA продемонстрировал, что взаимодействие *Стимуляция x Время* не было статистически значимым ( $F_{(6,56)}=0,62$ ;  $P=0,7162$ ), но значительное влияние оказывает стимуляция ( $F_{(1,56)}=5,02$ ;  $P=0,0487$ ) и время ( $F_{(2, 56)}=2,54$ ;  $P=0,0139$ ) как независимые факторы.

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

Для демонстрации высвобождения ОХТ из гипоталамуса *in vivo* у подчиненных и доминантных мышей мы использовали двухтактный тип микроперфузионного метода головного мозга в условиях свободного передвижения пар мышей, которые подвергались повторному социальному стрессу с помощью парадигмы смены клеток. Количество ОХТ, высвобожденного в течение 60 мин у подчиненных мышей (увеличение в  $4,1\pm 0,6$  раза относительно уровня предварительной стимуляции,  $n=5$ ), было значительно больше, чем у доминантных мышей (увеличение в  $2,2\pm 0,5$  раза относительно уровня предварительной стимуляции,  $n=6$ ) при сравнении с уровнями у доминантных (увеличение в  $0,81\pm 0,32$  раз) или подчиненных (увеличение в  $1,22\pm 0,17$  раз) мышей, которых перфузировали физиологическим раствором в качестве контроля.

Анализ результатов группы методом двухфакторного ANOVA выявил существенный эффект взаимодействия *Стимуляция x Время* ( $F_{(9,288)}=5,33$ ,  $P=0,0001$ ). Также наблюдалось значительное влияние стимуляции ( $F_{(3,288)}=22,53$ ,  $P=0,0001$ ) и

времени ( $F_{(3,288)}=10,05$ ;  $P=0,0001$ ) как независимых факторов. Эти результаты позволяют предположить, что цАДФ-рибоза эффективна для высвобождения ОХТ *in vivo* при нормальной температуре тела (которая уже достаточно высока) и/или с нейрональной деполяризующей активностью, но без прайминга за счет повышения температуры тела.

### **Высвобождение ОХТ *in vivo* при гипертермии у мышей: эффекты воздействия открытого поля**

Для оценки связи высвобождения ОХТ с гипертермией в ответ на социальный стресс мышей подвергали стрессу «новой среды» в лабиринте «Открытое поле» (чтобы избежать эффектов, вызванных содержанием в группах, в этих экспериментах были использованы мыши, содержащихся индивидуально). Ректальная температура значительно повышалась до  $37,8\pm 0,1^\circ\text{C}$  от контрольного уровня  $36,4\pm 0,2^\circ\text{C}$  в течение первых 5 минут, и повышение температуры поддерживалось в течение 15 минут ( $n=9-18$ ; однофакторный ANOVA  $F_{(3,28)}=8,373$ ,  $P=0,001$ ). Уровень ОХТ в CSF также повышался через 5 мин после нахождения животного в открытом поле ( $605\pm 114$  пг/мл по сравнению с контрольным уровнем перед тестом  $251\pm 13$  пг/мл, однофакторный ANOVA с *Post hoc* Bonferroni's тестом,  $n=9-18$ ,  $F_{(4,62)}=4,60$ ,  $P=0,005$ ) и через 10 и 15 минут возвращалась на исходный уровень.

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

### **Уровень ОХТ в CSF во время гипертермии у мышей с инъекцией LPS**

Для получения дополнительных доказательств высвобождения ОХТ во время гипертермии мы использовали модель лихорадки с введением LPS. Ректальная температура у мышей  $Cd38^{+/+}$ , получивших внутрибрюшинную инъекцию 3 мг/кг LPS, снижалась в течение первых 5-6 ч, но затем поддерживалась на высоком уровне в течение 15-36 ч. Через 24 ч после инъекции LPS перед началом проведения тестов ректальная температура составляла  $36,2\pm 0,4^\circ\text{C}$  по сравнению с  $35,4\pm 0,5^\circ\text{C}$  ( $n=8$ ) со средним увеличением  $0,85\pm 0,14^\circ\text{C}$ , тогда как разница между временными точками после введения LPS, 0 и 24 ч, составляла  $-0,04\pm 0,20^\circ\text{C}$  ( $n=6$ ) у мышей, обработанных фосфатно-буферным раствором (PBS).

На основании информации о температуре мы измеряли концентрации ОХТ в CSF, которые могли отражать влияние гипертермии на ОХТ-высвобождение *in vivo*.

Концентрация ОХТ в CSF составляла  $60,1 \pm 11,6$  пг/мг у мышей-самцов, получавших LPS, что было вдвое больше ( $30,5 \pm 6,6$  пг/мл) по сравнению с контрольной группой (PBS, n=8).

Напротив, мы не наблюдали различий в концентрациях ОХТ в CSF у  $Cd38^{-/-}$  мышей с инъекциями LPS ( $26,4 \pm 9,1$  пг/мл) или PBS ( $18,1 \pm 2,5$  пг/мл). Ректальная температура значительно повысилась на  $0,62 \pm 0,16^\circ\text{C}$  при введении LPS у  $Cd38^{-/-}$  мышей. Двухфакторный ANOVA не обнаружил значительного взаимного влияния *Вводимый препарат* x *Генотип* ( $F_{(1,16)}=1,84$ ,  $P=0,1934$ ), но были обнаружены эффекты введения LPS ( $F_{(1,16)}=8,37$ ,  $P=0,0106$ ) и эффекты генотипа ( $F_{(1,16)}=5,30$ ,  $P=0,0351$ ). *Post hoc* Bonferroni's тест показал существенную разницу между введением LPS или PBS у мышей дикого типа ( $P=0,0001$ ).

### **Транскрипционный контроль центральной секреции ОХТ**

Результаты выше указанных экспериментов предполагают вклад цАДФ-рибозы и гипертермии для облегчения высвобождения ОХТ, что связано либо с активацией, либо с обилием молекул CD38 и TRPM2. Поскольку очень трудно проанализировать первый возможный фактор, мы сначала проанализировали второй - уровни мРНК CD38 и TRPM2, экспрессию TRPM2. В настоящих экспериментах экспрессия мРНК была нормализована по сравнению с экспрессией мРНК глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH). Уровни CD38 мРНК значительно снижались в гипоталамусе у мышей попарного содержания и стрессом «смена клетки» (каждое утро в течение 4 дней) по сравнению с мышами без стресса, но там не было обнаружено никакой разницы между подчиненными и доминантными группами животных. Уровни мРНК TRPM2 значительно увеличивались в гипоталамусе у подчиненной группы мышей по сравнению с доминантной группой, которые получали одинаковый стресс «смена клетки». Уровни мРНК TRPM2 у доминантных мышей были такими же, как у мышей с групповым размещением без стресса. Экспрессия TRPM2 была значительна в гипоталамусе как в окситоцинергических нейронах, так и в других клетках. Совместная локализация CD38 и TRPM2 была обнаружена в  $12,1 \pm 3,9\%$  клетках, в то время как число TRPM2 и CD38-положительно окрашенных клеток составило  $21,1 \pm 6,2\%$  и  $32,1 \pm 4,3\%$  соответственно (400-500 клеток, подсчитанных в четырех областях). Интенсивность экспрессии при совместном окрашивании CD38 и TRPM2 оказалась выше у подчиненных мышей по сравнению с доминантной группой, что, вероятно, связано с повышением активности TRPM2.

## ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

### цАДФ-рибоза-, TRPM2- и ОХТ-зависимые осцилляции внутриклеточного кальция

Мы впервые продемонстрировали, что цАДФ-рибоза действует как внутриклеточный вторичный мессенджер с негативной регуляцией ОХТ рецепторов. Поскольку удаление внеклеточного  $Ca^{2+}$  нивелировало увеличение  $[Ca^{2+}]_i$ , то этот ответ был в значительной степени результатом поступления  $Ca^{2+}$  через катионные каналы, например, каналы TRPM2 (Tominaga, Caterina, 2004). Это подтверждается присутствием мРНК TRPM2, увеличивающей возрастание  $[Ca^{2+}]_i$ , индуцированное комбинацией повышения температуры и введением цАДФ-рибозы; и подавлением цАДФ-рибоза-индуцированного возрастания  $[Ca^{2+}]_i$  с помощью неспецифического, но сильного ингибитора TRPM2 каналов (Togashi et al., 2006). Кроме того, при отсутствии каких-либо тестируемых нуклеотидов, только нагревание также вызывает увеличение  $[Ca^{2+}]_i$ , как и сообщалось ранее (Togashi et al. et al., 2006). АДФ-рибоза, которая не оказывает действия на рецепторы к риадодину, также индуцировала увеличение  $[Ca^{2+}]_i$ , которое продолжалось в течение 1-2 мин, что наблюдается и в случае TRPM2 каналов (Perraud et al., 2001; Tominaga, Caterina, 2004). Таким образом, наши результаты доказывают свойство внеклеточной цАДФ-рибозы стимулировать термочувствительное  $Ca^{2+}$ -индуцируемое высвобождение кальция через каналы TRPM2 в клетках NG108-15.

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

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

### Концентрация ОХТ в CSF и стресс

Концентрации ОХТ в CSF увеличивались в течение 5 мин от начала психологического стресса (беспокойство в новой среде) в тесте «Открытое поле».

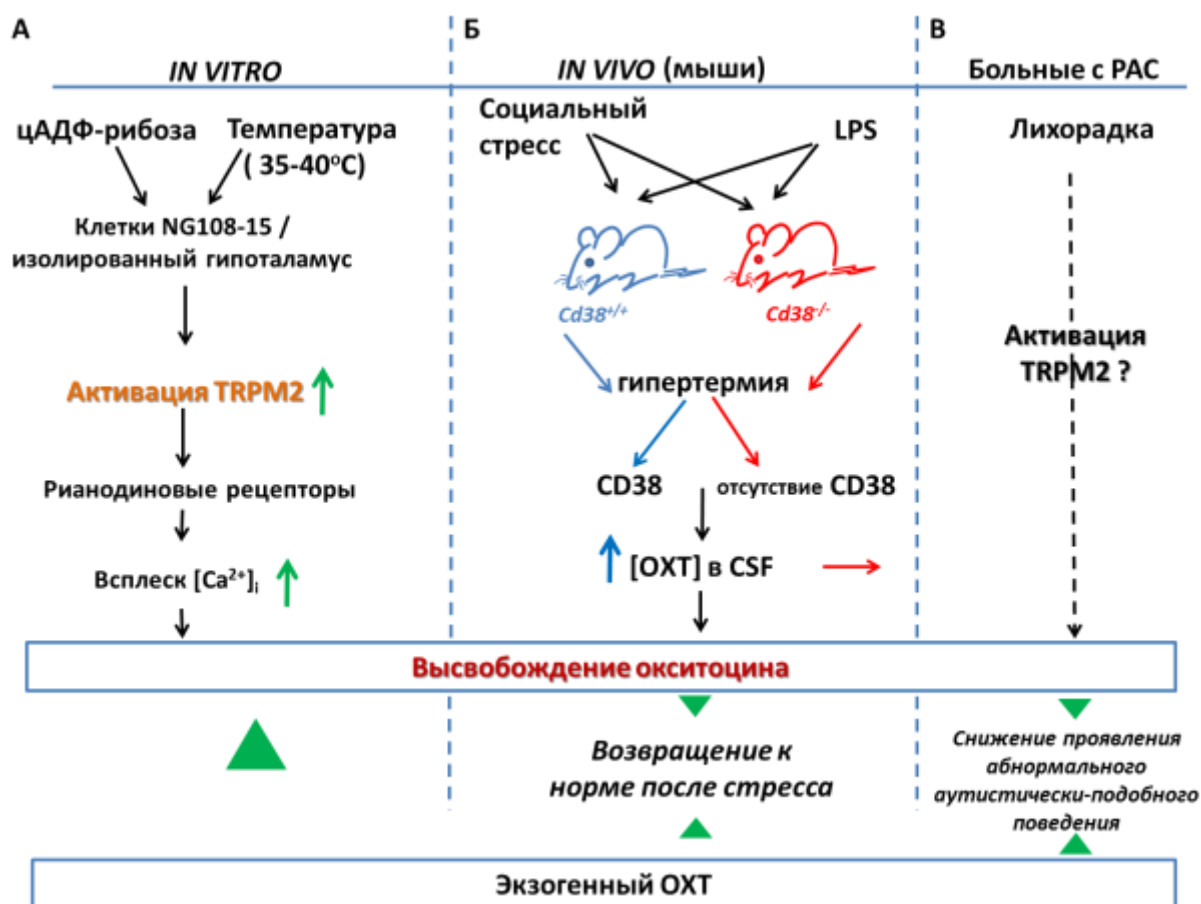
Интересно, что ректальная температура также увеличивалась одновременно в течение 5 минут с момента начала стресса, поэтому увеличение концентрации ОХТ в CSF, по-видимому, было вызвано высвобождением ОХТ из гипоталамуса в мозг, опосредованное гипертермией и цАДФ-рибозой. Тем не менее, кинетика изменения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

### **Социальные нарушения, гипертермия и аутизм**

На сегодняшний день было проведено несколько интересных исследований лихорадки у пациентов с РАС. Некоторые дети с РАС демонстрировали улучшение характерного аутистического поведения во время фебрильных инцидентов, и регрессия лихорадки может быть связана с началом РАС (Curran et al., 2007; Megremi, 2013; Naviaux et al., 2014). Было предложено несколько возможных объяснений этого мелиоративного эффекта: (1) высвобождение глутамин из скелетных мышц (Good, 2013); (2) улучшение мозгового кровотока (Good, 2011); (3) развитие лихорадки и изменения поведенческого состояния при аутизме зависят от селективной нормализации ключевых компонентов в функционировании поврежденного локуса (Mehler, Purgina, 2009).

Однако эффекты ОХТ никогда ранее не рассматривались в качестве возможного механизма. В этом исследовании мы предполагаем, что во время лихорадки усиливается высвобождение ОХТ, что приводит к редуцированию аутистического поведения (**рисунок 8**).

Гипертермия, вероятно, также ассоциирована с социальным стрессом (Adriaan Bouwknecht, Olivier, Paylor, 2007; Bouwknecht et al., 2007; Kluger et al., 1987; LeMay, Vander, Kluger, 1990; Oka et al., 2003; Singer et al., 1986), который оказывает гораздо большее воздействие на подчиненные группы в социальной иерархии (Кудрявцева Н.Н., Бондарь Н.П., Августинович Д.Ф., 2003; Меркулов В.М., Меркулова Т.И., Бондарь Н.П., 2017; Wang, Kessels, Hu, 2014). Результаты настоящего исследования показали, что большее количество ОХТ высвобождается, когда испытывается большее напряжение, и в подчиненной группе высвобождение большего количества ОХТ, по-видимому, позволяет восстановить напряжение и достичь равновесия [Миронова В.И., Рыбникова Е.А., 2010; Самойлов М.О., Рыбникова Е.А., 2012].



**Рисунок 8** Обобщающая схема восстановления после стресса и снижения выраженности проявлений аутистического поведенческого фенотипа за счет высвобождения ОХТ. (А) Внутриклеточные концентрации кальция увеличиваются одновременной стимуляцией цАДФ-рибозой и температурой *in vitro*. (Б) Разница в выбросе ОХТ у мышей дикого типа и дефицитных по гену *Cd38*, стимулированных социальным стрессом или LPS. (В) Гипертермия у человека временно способствует снижению проявления аутистически-подобного поведения.

Канал TRPM2 или однонуклеотидные полиморфизмы в гене *TRPM2* могут быть новыми молекулами-мишенями для модуляции социального стресса и психических расстройств с нарушениями в социальном поведении, и ген *TRPM2* должен быть экранирован для оценки его связи с аутизмом (рисунок 9).

### Тревожное и депрессивное поведение у взрослых мышей с делецией гена *CD157/BST1*

Наши результаты показывают, что молодые взрослые (8 до 10 недель) самцы мужского пола с делецией *Cd157 (BST1)* (фактор риска развития болезни Паркинсона) демонстрируют устойчивый и хорошо воспроизводимый эмоциональный фенотип: тяжелое беспокойство (тревога), связанное с новой окружающей средой; депрессивно-подобное поведение; сниженный интерес к общению с новыми социальными объектами и социальное избегание. Однако не было обнаружено какого-либо видимого физического дефицита у молодых

взрослых *Cd157<sup>-/-</sup>* мышей, а также нарушений в движении, координации, в процессах обучения и формирования моторной памяти, в циркадных ритмах.

Интересно, что в нескольких геномных ассоциациях и мета-анализах болезни Паркинсона были идентифицированы интронные однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) в гене CD157 на хромосоме 4p15 человека как новые локусы восприимчивости (Liu et al., 2013b; Noyce et al., 2012), хотя можно утверждать, что общие SNP CD157 обеспечивают небольшой риск.

Насколько эти поведенческие нарушения у *Cd157<sup>-/-</sup>* мышей могут быть ассоциированы с функционированием миндалина (Harding, 2002; Surdhar et al., 2012)? Нет прямых доказательств того, что CD157 играет роль в миграции нейронов во время нейрогенеза, хотя CD157 связывает интегрины в моноцитах человека (Lo Buono, 2014) и играет роль в миграции нейтрофилов (Quarona et al., 2013). Наши предварительные результаты показали, что CD157 экспрессируется в Nestin-позитивных нервных стволовых клетках вблизи зоны желудочка головного мозга. Таким образом, вероятно, что дефицит CD157 может привести к аномалиям в миндалине вследствие нарушения миграции в этот регион нейронов из субгранулярной зоны гиппокампа.

В настоящее время мы не можем объяснить расхождение между уровнями ОХТ в плазме крови и гипоталамусе. Так как большинство ОХТ нейронов выделяет ОХТ в кровь, мы предполагаем, что высвобождение ОХТ из терминалов аксонов в гипофизе может быть ослаблено у *Cd157* нокаутных мышей без видимых изменений содержания ОХТ в ядрах гипоталамуса, которые обогащены ОХТ. Окситоцинергические нейроны одновременно функционируют и в заднем отделе гипофиза, и в других отделах головного мозга (за счет проекций ОХТ нейронов), например, в миндалине, которая участвует в процессах реакции на страх (Knobloch et al., 2012; Knobloch, Grinevich, 2014). Таким образом, CD157 может прямо или косвенно влиять на центральное аксональное высвобождение ОХТ. Наблюдаемое изменение системы ОХТ (концентрации в плазме) и компенсаторное воздействие ОХТ на поведение обеспечивают терапевтически релевантные выводы.

Альтернативный сценарий, лежащий в основе вклада ОХТ в развитие нокаутных мышей CD157, заключается в нарушении передачи сигналов ОХТ в головном мозге. Чтобы исследовать эту проблему, необходимы данные относительно экспрессии рецепторов к ОХТ в соответствующих областях головного мозга. В предварительном эксперименте мы измеряли уровни мРНК рецептора к ОХТ в миндалине. К сожалению, нам не удалось обнаружить каких-либо различий в уровне мРНК рецепторов к ОХТ в обоих генотипах. Необходимы дальнейшие подробные анализы для определения уровней мРНК и белка молекул, связанных с ОХТ-сигнальной трансдукцией в каждой подобласти миндалевидного тела.

Таким образом, становится очевидным, что CD157 играет важную роль в клетках головного мозга в норме и при патологии, и его можно определить как



мультисистемный регулятор, что важно при рассмотрении биологического значения продуктов его каталитической активности, включая цАДФ-рибозу. Отсутствие различий в активности ADP-рибозилциклазы в двух различных областях головного мозга, наблюдаемые у взрослых особей, может быть результатом взаимной суррогатной роли, которую играют другие члены одной и той же семьи. Поэтому дальнейшие эксперименты с использованием мышей, дефицитных одновременно по *Cd38/Cd157*, необходимы для решения ряда оставшихся открытыми вопросов.

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

Структура и организация языка активно изучается у пациентов с РАС. Бедный словарный запас (Edmunds et al., 2016) и активное его использование у пациентов с РАС кажется ассоциированным со сниженной мотивацией к общению (Arunachalam, Luyster, 2016). Регистрация USV, продуцируемых детенышами мышей при социальной изоляции, можно выделить как индекс социальной мотивации детенышей для стимулирования родительской заботы и как маркер полученных ранних дефицитов коммуникации в моделях РАС у мышей в ожидании других, отдаленных, изменений (Hamilton et al., 2011; Homberg et al., 2016; Mosienko et al., 2015; Romano et al., 2013; Roy, Watkins, Heck, 2012). Снижение вокализации после PND 3, которую мы наблюдали у *Cd157<sup>-/-</sup>* мышей, может быть рассмотрена как отсроченное нарушение коммуникативных навыков, что может быть частично ассоциировано с ранее отмеченным аутистически- (тревожно- и беспокойно-) подобным поведением у *Cd157<sup>-/-</sup>* мышей.

Потенциальный положительный эффект введения ОХТ заключается в повышении мотивации для целенаправленного поведения (Nawijn et al., 2016) и содействию фундаментальным психофизиологическим функциям при реализации социального поведения, что в свою очередь, способствует социальной активности (Kemp et al., 2012). Введение экзогенного ОХТ может улучшать функционирование головного мозга у детей с РАС (Gordon et al., 2013). С учетом всех полученных нами данных и ранее опубликованных научных исследований, мы предполагаем, что введение ОХТ активизирует потенциальную гибкость функций нейронов, которая не напрямую стимулирует косвенную мотивацию и, возможно, способствует развитию лексики и увеличению словарного запаса.

В целом, это первое исследование, демонстрирующее связь *CD157* с ранним постнатальным развитием и коммуникативными способностями (которые могут быть восстановлены с помощью введения экзогенного ОХТ). Ген *CD157* может быть геном-кандидатом и фактором риска развития состояний тревожности и социального избегания (социальной боязни). Наши данные могут внести большой вклад в

изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе нарушений социальных взаимодействий, в особенности, коммуникативных дефицитов при РАС.

### **CD157/BST-1 – новый нейрорегулятор**

Наиболее важным результатом настоящего исследования было обнаружение того, что функция CD157 опосредована только вторичным мессенджером цАДФ-рибозой, а не NAADP. Это первая демонстрация дифференциального действия CD157 в отношении вторичных мессенджеров, вызывающих флуктуации внутриклеточного  $[Ca^{2+}]_i$ . Известно, что CD38 обладает способностью катализировать образование цАДФ-рибозы, а также NAADP во многих тканях организма, включая островки Лангерганса (Higashida et al., 2012a; Jin et al., 2007; Kim, 2014; Lee, 2012b; Lo Buono et al., 2011; Okamoto, Takasawa, Sugawara, 2014). NAADP, как мессенджер сигнализации  $Ca^{2+}$ , играет важную роль в секреции инсулина (Kim, 2014). Однако это поднимает критический вопрос о CD157, опосредующем его функции в нервной системе через цАДФ-рибозу, но не NAADP. Хорошим примером является ключевая роль цАДФ-рибозы и CD157 в кишечных клетках Панета (Igarashi, Guarente, 2016; Yilmaz et al., 2012).

Другая важная находка заключается в том, что иммунореактивность CD157 локализована в Nestin-иммунопозитивных клетках в субвентрикулярной зоне эмбрионов. Наши результаты показали, что CD157 является функциональной молекулой или, по крайней мере, присутствует в стволовых клетках, как показано в клетках Панета в пищеварительном тракте (Igarashi, Guarente, 2016; Yilmaz et al., 2012), клетках легких (Wu et al., 2013) и мезенхимальных клетках (Tao et al., 2011). Однако в нервной системе CD157 может также играть роль в миграции нейронов при нейрогенезе. Например, известно, что CD157 связывается с белками семейства интегринов, а интегрин  $\beta 3$  и переносчик серотонина взаимодействуют для модуляции захвата серотонина в мозге мыши (Whyte et al., 2014). Поэтому было бы интересно изучить, способствует ли цАДФ-рибоза самообновлению нервных стволовых клеток, и активен ли комплекс «CD157-интегрин - транспортер серотонина» в мозге мыши.

CD157 является родственной молекулой клеточного поверхностного антигена CD38 с активностью ADP-рибозилциклазы (Kim, 2014; Lee, 2012b; Malavasi et al., 2006), но фенотипы мышей линий  $Cd157^{-/-}$  и  $Cd38^{+/+}$  значительно отличаются (Higashida et al., 2012a; Jin et al., 2007). CD38 опосредует продукцию цАДФ-рибозы, активацию TRMP2 и ERK1/2, мобилизацию внутриклеточного кальция и высвобождение ОХТ (Tao et al., 2011). Кроме того, CD38 участвует в высвобождении ОХТ путем активации молекулярных каскадов ауторегуляции ОХТ. Напротив, CD157 связывается с транспортером серотонина и интегрином  $\beta$  и вызывает множественные эффекты, чтобы управлять поведением, вызывающим тревогу и депрессию (Ortolan et al., 2002; Quarona et al., 2013). CD157 играет роль в

индуцированном цАДФ-рибозой высвобождении ОХТ, который может не совпадать с CD38. CD157 экспрессируется в эмбриональном мозге в большом количестве, и может участвовать в процессах развития нейронов, нарушения которых актуальны при ряде нейропсихических расстройств, например, при РАС и шизофрении. Дефицит CD157 приводит к дефициту поведенческих функций и повышенной тревожности. Уменьшение объема миндалины, важной составляющей «социального мозга», может быть вызвано утратой экспрессии CD157 в нейрональных стволовых клетках. Таким образом, становится очевидна роль CD157 в нервной системе в дополнение к его известным функциям в пищеварительной и иммунной системах, и CD157 можно называть мультисистемным регулятором.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования были выявлены новые механизмы регуляции активности НАД<sup>+</sup>-конвертирующего фермента CD38 в клетках нейрональной природы, нейротрансмиттер-регулируемую активность АДФ-рибозилциклазы/CD38 в клетках головного мозга, продемонстрировано участие CD38 в (ауто)регуляции секреции окситоцина, регуляции нейропластичности и в развитии аутистических форм поведения у экспериментальных животных.

Продемонстрирована роль гликопротеина CD157 (чья aberrантная экспрессия ранее рассматривалась лишь в контексте болезни Паркинсона) в регуляции сложных форм поведения и развитии тревожности. Выявлено, что у нокаутных мышей самцов (*CD157<sup>-/-</sup>*) не наблюдается моторной дисфункции, но эти животные проявляют тревожное и депрессивно-подобное поведение, что компенсировалось введением окситоцина. Миндалины головного мозга является тем регионом, где нарушения экспрессии CD157 наиболее очевидны с точки зрения поведенческих эффектов. Таким образом, становится очевидным, что CD157 играет роль нейрорегулятора и является потенциально значимым для проявления симптомов, предшествующих двигательным нарушениям при болезни Паркинсона.

Изучены новые механизмы нейропластичности применительно к реализации сложных форм поведения, обусловленные эффектами центральной секреции окситоцина. Впервые идентифицированы новые механизмы регуляции секреции окситоцина, определяющие характер социальных взаимодействий, а также влияние окситоцина на процессы синаптогенеза и функциональной активности клеток головного мозга в норме и при повреждении головного мозга на ранних этапах развития организма. Получены принципиально новые данные о влиянии окситоцина на пластичность лимбико-гипоталамо-гипофизарно системы на разных этапах развития головного мозга в норме и при патологии.

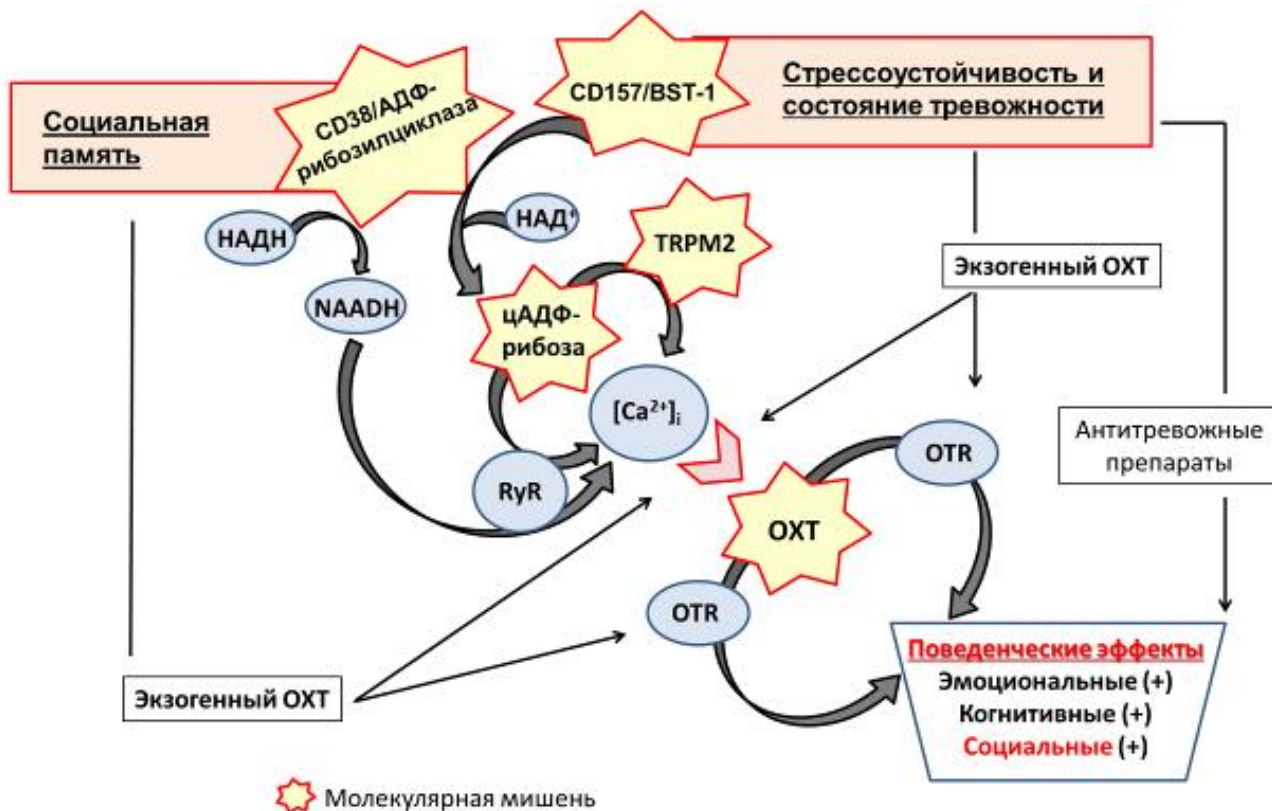
Эти данные позволяют идентифицировать новые молекулы-мишени (**рисунок 9**) для фармакологической модуляции процессов секреции окситоцина и

коррекции нарушенных форм социального поведения при заболеваниях центральной нервной системы различного генеза. Полученные результаты формируют новое представление о процессах, ответственных за секрецию и биологическую активность окситоцина, в контексте его регуляторного влияния на процессы социального распознавания и социального поведения в целом, в норме и при развитии заболеваний аутистического спектра, а также иных видов патологии головного мозга, ассоциированной с нарушением социальных взаимодействий и эмоциональной сферы (хроническая нейродегенерация).

В более широком смысле, нами сформулированы новые представления о физиологической основе регуляции социального поведения (социальные взаимодействия, социальная память), тревожности, молекулярных механизмах реализации эффектов окситоцина в головном мозге, а также сформированы и научно обоснованы принципиально новые подходы к коррекции нарушений социального поведения и пластичности головного мозга.

## ВЫВОДЫ

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



**Рисунок 9 Новые молекулярные мишени регуляции социального поведения и тревожных состояний.**

6. Экспрессия CD157 влияет на центральное аксональное высвобождение ОХТ, что определяет эффективность раннего постнатального развития головного мозга и «вербальной» коммуникации между особями. Линия *Cd15<sup>7/-</sup>* мышей является релевантной моделью для изучения психических расстройств, ассоциированных с развитием тревожности.
7. Секретия эндогенного ОХТ определяет особенности социального поведения и обеспечивает анксиолитический эффект при стрессе. Экзогенный ОХТ обеспечивает анксиолитический эффект, стимулирует мотивацию к социальной активности, способствует увеличению эффективности «вербальной» коммуникации и компенсирует нарушения социального поведения у *Cd157<sup>-/-</sup>* мышей.

### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Определение уровня окситоцина в плазме периферической крови может быть рекомендовано при диагностике состояний, связанных с нарушениями социального поведения, и при мониторинге эффективности проводимой терапии.
2. Определение полиморфизмов гена CD157 может быть рекомендовано в качестве дополнительного диагностического критерия при болезни Паркинсона (прогнозирование ранних признаков нарушений социализации и возникновения

предмоторных проявлений) и нейропсихической патологии, сопровождающейся развитием тревожности.

3. Определение экспрессии CD38 и CD157 в ткани головного мозга может быть рекомендовано для оценки эффективности нейрогенеза и синаптогенеза в норме и при хронической нейродегенерации альцгеймеровского типа.
4. Применение экзогенного окситоцина (или его аналогов) и направленная модуляция экспрессии молекул, определяющих эффективность секреции окситоцина или реализации его биологических эффектов (CD38, CD157, TRPM2, PKC, RyR) оправдано при терапии заболеваний, ассоциированных с нарушением стрессоустойчивости, развитием тревожности, ограничением социальных контактов и нарушением социальной памяти.

### Список основных работ по теме диссертации

#### В журналах перечня ВАК:

1. Панина Ю.А., Малиновская Н.А., Салмина А.Б., **Лопатина О.Л.**, Рябоконт Р.В., Герцог Г.Е., Антонова С.К. Оценка социального взаимодействия и эмоционального поведения крыс с моделью аутизма. // Забайкальский медицинский вестник. - 2015. - № 3. - С. 102-105.
2. Салмина А.Б., Комлева Ю.К., Кувачева Н.В., **Лопатина О.Л.**, Инжутова А.И., Черепанов С.М., Язуина Н.А., Морозова Г.А., Малиновская Н.А., Пожиленкова Е.А., Моргун А.В., Таранушенко Т.Е., Петрова М.М. // Молекулярные механизмы нарушения развития мозга в пре- и неонатальном периоде. Вопросы современной педиатрии. - 2012. - Т. 11, № 6. - С. 15-20.
3. Akther S., Huang Z., Liang M., Zhong J., Fakhrul A.A., Yuhi T., **Lopatina O.**, Salmina A.B., Yokoyama S., Higashida C., Tsuji T., Matsuo M., Higashida H. Paternal retrieval behavior regulated by brain estrogen synthetase (Aromatase) in mouse sires that engage in communicative interactions with pairmates. // Front Neurosci. - 2015. – V. 9, article 450.
4. Akther S., Korshnova N., Zhong J., Liang M., Cherepanov S.M., **Lopatina O.**, Komleva Y.K., Salmina A.B., Nishimura T., Fakhrul A.A., Hirai H., Kato I., Yamamoto Y., Takasawa S., Okamoto H., Higashida H. CD38 in the nucleus accumbens and oxytocin are related to paternal behavior in mice. Mol Brain. - 2013. – V. 6, article 41.
5. Amina S., Hashii M., Ma W.J., Yokoyama S., **Lopatina O.**, Liu H.X., Islam M.S., Higashida H. Intracellular calcium elevation induced by extracellular application of cyclic-ADP-ribose or oxytocin is temperature-sensitive in rodent NG108-15 neuronal cells with or without exogenous expression of human oxytocin receptors. // J Neuroendocrinol. - 2010. – V. 22, N5. – P.460-466.

6. Fujimoto H., Liu H.X., **Lopatina O.**, Brown D.A., Higashida H. Scopolamine modulates paternal parental retrieval behavior in mice induced by the maternal mate. *Neurosci Lett.* - 2013. – V. 546. – P.63-66.
7. Higashida H., Kamimura S.Y., Inoue T., Hori O., Islam M.S, **Lopatina O.**, Tsuji C. Cyclic ADP-ribose as an endogenous inhibitor of the mTOR pathway downstream of dopamine receptors in the mouse striatum. // *J Neural Transm (Vienna)*. - 2016 Dec 26. [Epub ahead of print]
8. Higashida H., Liang M., Yoshihara T., Akther S., Fakhrul A., Stanislav C., Nam T.S., Kim U.H., Kasai S., Nishimura T., Al Mahmuda N., Yokoyama S., Ishihara K., Gerasimenko M., Salmina A., Zhong J., Tsuji T., Tsuji C., **Lopatina O.** An immunohistochemical, enzymatic, and behavioral study of CD157/BST-1 as a neuroregulator. // *BMC Neurosci.* – V.18(1), article 35.
9. Higashida H., **Lopatina O.**, Yoshihara T., Pichugina Y.A., Soumarokov A.A., Munesue T., Minabe Y., Kikuchi M., Ono Y., Korshunova N., Salmina A.B. Oxytocin signal and social behaviour: comparison among adult and infant oxytocin, oxytocin receptor and CD38 gene knockout mice. // *J Neuroendocrinol.* - 2010. – V. 22, N5. – P.373-379.
10. Higashida H., Yokoyama S., Munesue T., Kikuchi M., Minabe Y., **Lopatina O.** CD38 gene knockout juvenile mice: a model of oxytocin signal defects in autism. *Biol Pharm Bull.* - 2011. V.34, N9. - P.1369-1372.
11. Kasai S., Yoshihara T., **Lopatina O.**, Ishihara K., Higashida H. Selegiline ameliorates depression-like behavior in mice lacking the CD157/BST1 gene, a risk factor for Parkinson's disease. // *Front Behav Neurosci.* – V. 11, article 75.
12. Liang M., Zhong J., Liu H.X., **Lopatina O.**, Nakada R., Yamauchi A.M., Higashida H. Pairemate-dependent pup retrieval as parental behavior in male mice. // *Front Neurosci.* - 2014. – V. 8, article 186.
13. Liu H.X., **Lopatina O.**, Amina S., Higashida C., Islam M.S., Graeff R., Lee H.C., Hashii M., Higashida H. Intracellular calcium concentrations regulated by cyclic ADP-ribose and heat in the mouse hypothalamus. // *Messenger* – 2012. – V. 1, N2. – P.1–10.
14. Liu H.X., **Lopatina O.**, Higashida C., Fujimoto H., Akther S., Inzhutova A., Liang M., Zhong J., Tsuji T., Yoshihara T., Sumi K., Ishiyama M., Ma W.J., Ozaki M., Yagitani S., Yokoyama S., Mukaida N., Sakurai T., Hori O., Yoshioka K., Hirao A., Kato Y., Ishihara K., Kato I., Okamoto H., Cherepanov S.M., Salmina A.B., Hirai H., Asano M., Brown D.A., Nagano I., Higashida H. Displays of paternal mouse pup retrieval following communicative interaction with maternal mates. *Nat Commun.* - 2013. – V. 4, article 1346.
15. Liu H.X., **Lopatina O.**, Higashida C., Tsuji T., Kato I., Takasawa S., Okamoto H., Yokoyama S., Higashida H. Locomotor activity, ultrasonic vocalization and oxytocin levels in infant CD38 knockout mice. // *Neurosci Lett.* - 2008. – V.448, N1. – P.67-70.

16. **Lopatina O.**, Furuhara K., Ishihara K., Salmina A.B., Higashida H. Communication impairment in ultrasonic vocal repertoire during the suckling period of Cd157 knockout mice: transient improvement by oxytocin. // *Front Neurosci.* – V. 11, article 266.
17. **Lopatina O.**, Inzhutova A., Salmina A.B., Higashida H. The roles of oxytocin and CD38 in social or parental behaviors. // *Front Neurosci.* - 2013. – V. 6, article 182.
18. **Lopatina O.**, Yoshihara T., Nishimura T., Zhong J., Akther S., Fakhrol A.A., Liang M., Higashida C., Sumi K., Furuhara K., Inahata Y., Huang J.J., Koizumi K., Yokoyama S., Tsuji T., Petugina Y., Sumarokov A., Salmina A.B., Hashida K., Kitao Y., Hori O., Asano M., Kitamura Y., Kozaka T., Shiba K., Zhong F., Xie M.J., Sato M., Ishihara K., Higashida H. Anxiety- and depression-like behavior in mice lacking the CD157/BST1 gene, a risk factor for Parkinson's disease. // *Front Behav Neurosci.* - 2014. – V. 8, article 133.
19. Salmina A.B., **Lopatina O.**, Ekimova M.V., Mikhutkina S.V., Higashida H. CD38/cyclic ADP-ribose system: a new player for oxytocin secretion and regulation of social behaviour. // *J Neuroendocrinol.* - 2010. – V.22, N5. – P.380-392.
20. Salmina A.B., **Lopatina O.**, Kuvacheva N.V., Higashida H. Integrative neurochemistry and neurobiology of social recognition and behavior analyzed with respect to CD38-dependent brain oxytocin secretion. // *Curr Top Med Chem.* - 2013. – V.13, N23. – P. 2965-2977.
21. Zhong J., Amina S., Liang M., Akther S., Yuhi T., Nishimura T., Tsuji C., Tsuji T., Liu H.X., Hashii M., Furuhara K., Yokoyama S., Yamamoto Y., Okamoto H., Zhao Y.J., Lee H.C., Tominaga M., **Lopatina O.**, Higashida H.. Cyclic ADP-ribose and heat regulate oxytocin release via CD38 and TRPM2 in the hypothalamus during social or psychological stress in mice. // *Front Neurosci.* - 2016. – V. 10, article 304.

#### **В других изданиях:**

1. Комлева Ю.К., Малиновская Н.А., Горина Я.В., **Лопатина О.Л.**, Волкова В.В., Салмина А.Б. Экспрессия молекул CD38 И CD157 в ольфакторных луковицах головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера. *Сибирское медицинское обозрение.* - 2015. – Т. 95, № 5. - С. 45-49.
2. Малиновская Н.А., Моргун А.В., **Лопатина О.Л.**, Панина Ю.А., Волкова В.В., Гасымлы Э.Д., Таранушенко Т.Е., Салмина А.Б. Стресс раннего периода жизни: последствия для развития головного мозга. // *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова.* - 2016. - Т. 66, № 6. - С. 643-668.
3. Салмина А.Б., Инжутова А.И., Моргун А.В., Окунева О.С., Малиновская Н.А., **Лопатина О.Л.**, Петрова М.М., Таранушенко Т.Е., Фурсов А.А., Кувачева Н.В. НАД<sup>+</sup>-конвертирующие ферменты в клетках нейрональной и глиальной природы: CD38 как новая молекула-мишень для нейропротекции. // *Вестник Российской академии медицинских наук.* - 2012. - № 10. - С. 29-37.



### **Монография на русском языке:**

Комлева Ю. К., Малиновская Н. А., Горина Я. В., **Лопатина О. Л.**, Волкова В. В., Пожиленкова Е. А., Жуков Е. Л., Медведева Н. Н., Салмина А. Б. Молекулярные механизмы нейровоспаления и нейрогенеза при болезни Альцгеймера. [Электронный ресурс]: монография. Красноярский медицинский университет. - Красноярск: КрасГМУ, 2015. ISBN 9785942851439. - 165 с

### **Главы в монографиях на английском языке:**

1. Higashida H., Jin D., Liu H.X., **Lopatina O.**, Yokoyama S., Koizumi K., Hashii M., Islam M.S., Hayashi K., Munesue T. Social memory, maternal care, and oxytocin secretion, but not vasopressin release, require CD38 in mice. In Neurobiology of the Parental Brain // Edited by Robert S. Bridges. - Boston .Academic press, 2008. – P.361-375.
2. Higashida H., **Lopatina O.**, Amina S. Regulation of oxytocin and vasopressin secretion: involvement of the calcium amplification pathway through cyclic ADP-ribose and CD38. In Oxytocin, Vasopressin and Related Peptides in the Regulation of Behavior // Edited by Choleris E, Pfaff DW, Kavaliers M. - Cambridge. Cambridge University Press, 2013. – P.44-56.

## Обозначения и сокращения

**АДФ** – аденозиндифосфат

**цАДФ-рибоза** — циклическая АДФ-рибоза

**ФГБОУ ВО** - федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

**БА** – болезнь Альцгеймера

**БП** – болезнь Паркинсона

**НАД+** - никотинамидадениндинуклеотид

**РАС** - расстройства аутистического спектра

**ЦНС** – центральная нервная система

**cADPR** - cyclic ADP-ribose – циклическая АДФ-рибоза

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

**CD38** – НАД+-гликогидролаза/CD38

**CSF**- cerebrospinal fluid - цереброспинальная жидкость

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

**i.p.** – intraperitoneal - интраперитонеально

**Mean** – среднее значение

**ОХТ** – окситоцин

**ОХТ<sub>R</sub>** – окситоциновые рецепторы

**NAADP** – nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate - адениндинуклеотидфосфат никотиновой кислоты

**PBS** - phosphate-buffered saline - фосфатно-солевой буферный раствор

**PND** – postnatal day - день постнатального развития

**S100β** – кальций-связывающий белок

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

**USV** – ultrasonic vocalization - ультразвуковая вокализация

---

Типография КрасГМУ  
Подписано в печать 26.10.17. Заказ № 6384  
Тираж 100 экз.  
660022, г.Красноярск, ул.П.Железняка, 1

