

## ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПРЕССИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ NO-СИНТАЗЫ В ЗУБЧАТОЙ ИЗВИЛИНЕ КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ДЕПРЕССИВНОГО СОСТОЯНИЯ И ВОЗМОЖНОСТЬ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ ФЕНИБУТОМ

*А.В. Смирнов<sup>1,3</sup>, М.Р. Экова<sup>1</sup>, И.Н. Тюренков<sup>2</sup>, Е.В. Волотова<sup>2</sup>*

ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации,

<sup>1</sup>кафедра патологической анатомии;

<sup>2</sup>кафедра фармакологии и фармации института НМФО;

<sup>3</sup>ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр», лаборатория патоморфологии

Депрессия является одной из ведущих причин снижения трудоспособности населения и остается одним из самых распространенных психических расстройств в мире во всех возрастных группах. Проведена оценка особенностей экспрессии эндотелиальной NO-синтазы в зубчатой извилине у крыс зрелого возраста при моделировании депрессивного состояния, а также возможность фармакологической коррекции выявленных изменений фенибутом. Оценка изменений уровня экспрессии иммунореактивного материала в зубчатой извилине определяли в гранулярном и субгранулярном слоях путем оценки интенсивности окрашивания в баллах от 0 до 3. У крыс с экспериментальным депрессивным состоянием, по сравнению с контрольной группой, отмечалось снижение степени экспрессии иммунореактивного материала в зубчатой извилине. Применение фенибута способствовало коррекции изучаемых признаков.

**Ключевые слова:** зубчатая извилина, депрессия, иммуногистохимия, eNOS, фенибут.

DOI 10.19163/1994-9480-2021-2(78)-128-131

## CHARACTERISTICS OF THE EXPRESSION OF ENDOTHELIAL NO-SYNTHASE IN THE DENTATE GYRUS OF RATS WHEN MODELING A DEPRESSIVE STATE AND THE POSSIBILITY OF PHARMACOLOGICAL CORRECTION WITH PHENIBUT

*A. V. Smirnov<sup>1,3</sup>, M. R. Ekova<sup>1</sup>, I. N. Tyurenkov<sup>2</sup>, E. V. Volotova<sup>2</sup>*

FSBEI HE «Volgograd State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation,

<sup>1</sup>Department of pathological anatomy,

<sup>2</sup>Department of pharmacology and pharmacy of the ICMPE;

<sup>3</sup>SBI «Volgograd Medical Scientific Center», Laboratory of pathomorphology

Depression is one of the leading causes of declining working capacity in the population and remains one of the most common mental disorders in the world in all age groups. The features of the expression of endothelial NO-synthase in the dentate gyrus in mature rats were assessed when simulating a depressive state, as well as the possibility of pharmacological correction of the revealed changes with phenibut. Evaluation of changes in the level of expression of immunoreactive material in the dentate gyrus was determined in the granular and subgranular layers by assessing the intensity of staining in points from 0 to 3. In rats with an experimental depression, compared with the control group, there was a decrease in the degree of expression of immunoreactive material in the dentate gyrus. The use of phenibut contributed to the correction of the studied signs.

**Key words:** dentate gyrus, depression, immunohistochemistry, eNOS, phenibut.

Депрессия является одной из ведущих причин снижения трудоспособности населения и остается одним из самых распространенных психических расстройств в мире во всех возрастных группах [5]. Этиология и патофизиология основных депрессивных расстройств до конца не изучена. Нейрогенная гипотеза предполагает, что депрессия возникает в результате нарушения нейрогенеза в зубчатой извилине гиппокампа, в то время как эффекты антидепрессантов способны к его восстановлению [4]. Исследования на людях косвенно подтверждают данную теорию:

у пациентов со стрессовыми расстройствами, включая депрессию, тревогу и посттравматическое стрессовое расстройство, наблюдаются меньшие объемы зубчатой извилины. Кроме того, у пациентов с депрессией, принимающих лекарства, наблюдается больший объем зубчатой извилины по сравнению с пациентами, которые не получали лечение [3]. Однако мало что известно о сложных механизмах, регулирующих нейрогенез у взрослых. Психоактивные соединения, стресс, возраст, физические упражнения, различные молекулы-мессенджеры, а также факторы роста и транскрипции

задействованы в нейробиологии депрессии. Молекула газообразного переносчика оксида азота (NO) синтезируется из L-аргинина семейством из трех NO-синтаз (NOS): NOS-I (нейрональная), NOS-II (индуцибельная) и NOS-III (эндотелиальная). NO выполняет несколько функций в центральной нервной системе, в том числе участвует в поведенческих процессах, таких как обучение и формирование памяти, играет важную роль в синапто- и морфогенезе головного мозга [6]. NOS локализуется в нейрогенных участках зубчатой извилины гиппокампа [2]. Хотя меньше исследований посвящено роли эндотелиальной NOS (eNOS) в процессах обучения и памяти, связанных с гиппокампом и зубчатой извилиной, известно, что eNOS может локализоваться не только в сосудах и нейронах гиппокампа [7], но и экспрессироваться в нейрональных клетках-предшественниках, оказывая влияние на нейрогенез [9].

Кроме того, доступные в настоящее время антидепрессанты не эффективны для значительного процента пациентов [5].

Таким образом, исследование роли NO-ергической системы в морфофункциональных изменениях зубчатой извилины необходимо для обнаружения новых молекулярных мишеней для лечения депрессии.

### ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Выявить особенности экспрессии эндотелиальной NO-синтазы в зубчатой извилине у крыс зрелого возраста при моделировании депрессивного состояния, а также установить возможность фармакологической коррекции выявленных изменений фенибутом.

### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа была выполнена на крысах-самцах в возрасте 12 месяцев. Животные были получены из ФГУП «Питомник лабораторных животных "Рапполово"» РАМН, Ленинградская область. Крысы были разделены на 3 группы: первая группа – контрольные животные ( $n = 10$ ), вторая группа – группа «депрессия», то есть животные с экспериментальным депрессивным состоянием ( $n = 10$ ), третья группа – «депрессия + фенибут», то есть крысы с экспериментальным депрессивным состоянием, получавшие фенибут ( $n = 10$ ). Фенибут вводили внутривентриально за час до моделирования депрессивного состояния в дозе 25 мг/кг. Первая и вторая группы животных получали соответственно массу эквивалентный объем физиологического раствора. При содержании животных, выполнении эксперимента и выведении их из эксперимента руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», Хельсинкской

декларации (1975 г., 2000 г.). Депрессивное состояние у крыс моделировали путем мягкого стрессового воздействия в течение 7 дней (ежедневно по 30 мин). Действие стрессоров (вибрация, громкий звук, пульсирующий яркий свет) было непредсказуемым и осуществлялось в специальной камере, состоящей из 6 изолированных отсеков, в которые были помещены животные. Мягкое стрессовое воздействие приводит к формированию у животных стойкого депрессивного состояния, которое имеет феноменологическое сходство с клинической картиной депрессии [10]. Выведение животных из эксперимента осуществлялось с использованием «Гильотины для крыс» (AE0702, производитель Open Science, Россия). Для иммуногистохимического исследования головной мозг был фиксирован в нейтральном забуференном 10%-м формалине, изготовленные во фронтальной плоскости серийные парафиновые срезы толщиной 4 мкм изучали на уровне от -2,40 мм до -3,96 мм относительно брегмы. Для иммуногистохимического исследования использовали первичные поликлональные кроличьи антитела к eNOS (разведение 1 : 50; GeneTex, Inc., США). В качестве визуализации применяли полимерную систему N-Histofine Simple Stain MAX PO (Nichirei Biosciences, Inc., Япония) и субстратную систему N-Histofine DAB-3S kit (Nichirei Biosciences, Inc., Япония). Оценку изменений уровня экспрессии eNOS в зубчатой извилине определяли в гранулярном и субгранулярном слоях путем оценки интенсивности окрашивания в баллах от 0 до 3 (0 – иммунонегативная реакция; 1 – слабо выраженное окрашивание; 2 – умеренно выраженное окрашивание; 3 – максимально выраженное окрашивание). Исследование микропрепаратов проводилось с помощью микроскопа Axio Lab. A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия), фотодокументирование осуществлялось камерой AxioCam 105 color (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия). Статистическую обработку данных проводили с использованием пакетов программ Statistica 6.0 (StatSoft, USA). Различия между группами оценивали по критерию Хи-квадрат ( $\chi^2$ ) и считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При оценке результатов иммуногистохимической реакции у крыс контрольной группы в цитоплазме перикарионов нейронов гранулярного слоя зубчатой извилины определялась максимально выраженная цитоплазматическая экспрессия eNOS-иммунореактивного материала (ИРМ) (3 балла), в нейропиле гранулярного слоя экспрессия имела умеренно

выраженный характер (2 балла). В цитоплазме нервных клеток и нейропиле субгранулярного слоя

отмечалась умеренно выраженная экспрессия eNOS-ИРМ (2 балла) (рис. А).

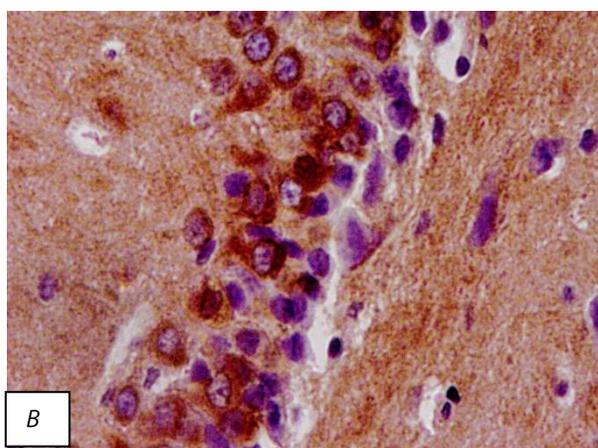
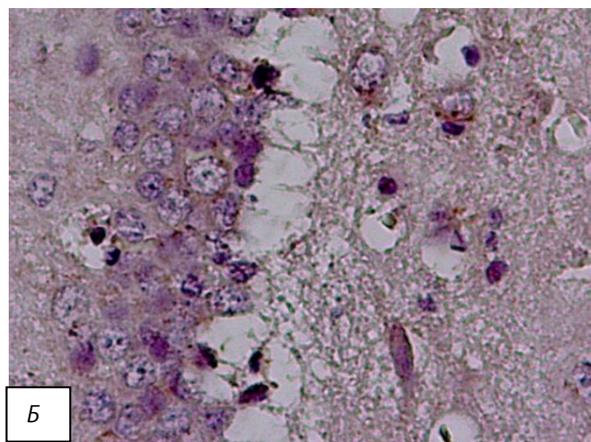
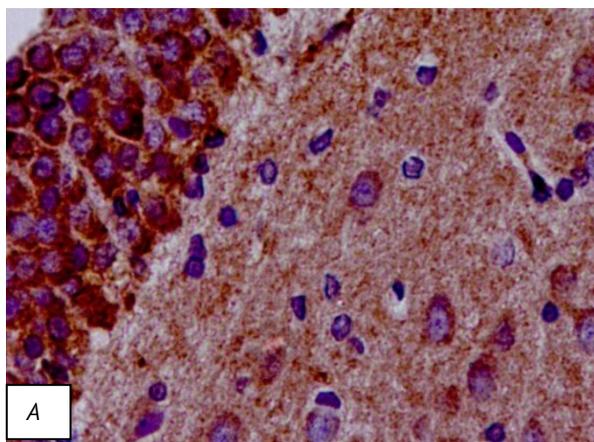


Рис. Гистологическое строение зубчатой извилины крыс в возрасте 12 месяцев.

А – 1-я группа, «контроль»; Б – 2-я группа, «депрессия»; В – 3-я группа, «депрессия + фенибут».

Иммуногистохимическое исследование, антитела против eNOS, окрашивание гематоксилином. Ув. × 400

У животных группы «депрессия», по сравнению с контрольной группой, отмечалось снижение экспрессии eNOS-ИРМ. Слабо выраженное окрашивание (1 балл) определялось в цитоплазме перикарионов нейронов гранулярного слоя, а также в нейропиле субгранулярного слоя. Иммунонегативная реакция (0 баллов) отмечалась в нейропиле гранулярного слоя и в нервных клетках субгранулярного слоя (рис. Б).

При фармакологической коррекции депрессивного состояния у крыс фенибутом наблюдалось увеличение экспрессии eNOS-ИРМ по сравнению с группой «депрессия». Умеренно выраженная экспрессия (2 балла) определялась в цитоплазме перикарионов, нейропиле гранулярного слоя, а также в нейропиле субгранулярного слоя. В нервных клетках субгранулярного слоя экспрессия eNOS-ИРМ отсутствовала (0 баллов) (рис. В).

Проведенное нами иммуногистохимическое исследование продемонстрировало, что при мягком

стрессовом воздействии, которое выражается у животных депрессивноподобной симптоматикой, отмечается снижение экспрессии eNOS в нервных клетках и нейропиле зубчатой извилины у крыс зрелого возраста, по сравнению с контрольной группой. Полученные нами морфологические данные подтверждают значимость наличия определенного базального уровня eNOS, который необходим в NO-ергическом механизме долговременной потенциации (LTP) в гиппокампе [8]. Chen и соавт. обнаружили, что количество образованных нейросфер при изучении тканевых культур, выделенных из субвентрикулярной зоны (SVZ) у животных с дефицитом eNOS, заметно снижается, а включение BrdU в SVZ нокаутных мышей по eNOS снижается после инсульта, что позволяет предположить, что eNOS, подобно nNOS, играет важную роль в пролиферации нейрональных клеток-предшественников (NSC). Кроме того, нокаут eNOS может также подавлять миграцию NSC и рост нейритов в культуре

тканевых эксплантатов SVZ. Результаты этих исследований подтверждают мнение о том, что eNOS и nNOS играют одинаковую роль в росте NSC, но только eNOS вносит вклад в миграцию NSC [1].

В данном исследовании нами было продемонстрировано, что применение фенибута у крыс зрелого возраста во время мягкого стрессового воздействия оказывает профилактический эффект и способствует увеличению экспрессии eNOS в нейронах гранулярного слоя, а также нейропиле гранулярного и субгранулярного слоев зубчатой извилины, что, по-видимому, связано с его анксиолитической активностью. Согласно нейрогенной теории, различные препараты, уменьшающие депрессию и тревогу, также повышают нейрогенез в зубчатой извилине [4].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют, что при моделировании депрессивного состояния у крыс зрелого возраста наблюдается снижение экспрессии eNOS в нервных клетках и нейропиле зубчатой извилины. Применение фенибута оказывает корректирующее воздействие на компоненты NO-ергической системы, поскольку способствует увеличению уровня экспрессии eNOS.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Волгоградской области в рамках научного проекта № 19-415-340004\20.*

### REFERENCES

1. Chen J., Zacharek A., Zhang C., et al. Endothelial nitric oxide synthase regulates brain-derived neurotrophic factor expression and neurogenesis after stroke in mice. *J Neurosci*, 2005, no. 25 (9), pp. 2366–2375. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5071-04.2005.

2. Cheung A., Newland P.L., Zaben M., et al. Intracellular nitric oxide mediates neuroproliferative effect of neuropeptide Y on postnatal hippocampal precursor cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, no. 287 (24), pp. 20187–20196. DOI: 10.1074/jbc.m112.346783.

3. Koch S.B.J., Morey R.A., Roelofs K. The role of the dentate gyrus in stress-related disorders. *Molecular Psychiatry*, 2020, no. 25, pp. 1361–1363. DOI: 10.1038/s41380-019-0572-4

4. Miller B.R., Hen R. The current state of the neurogenic theory of depression and anxiety. *Current Opinion in Neurobiology*, 2015, no. 30, pp. 51–58. DOI: 10.1016/j.conb.2014.08.012.

5. Ni S., Huang H., He D., et al. Adeno-associated virus-mediated over-expression of CREB-regulated transcription coactivator 1 in the hippocampal dentate gyrus ameliorates lipopolysaccharide-induced depression-like behaviour in mice. *Journal of Neurochemistry*, 2019, no. 1 (149), pp. 111–125. DOI: 10.1111/jnc.14670.

6. Reif A., Schmitt A., Fritzen S., et al. Differential effect of endothelial nitric oxide synthase (NOS-III) on the regulation of adult neurogenesis and behaviour. *European Journal of Neuroscience*, 2004, no. 20 (4), pp. 885–895. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2004.03559.x.

7. Smirnov A.V., Tyurenkov I.N., Shmidt M.V., et al. Effect of combined stress on morphological changes and expression of NO synthases in rat ventral hippocampus. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2015, no. 1 (160), pp. 96–99.

8. Steinert J.R., Chernova T., Forsythe I.D. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. *The Neuroscientist*, 2010, no. 16 (4), pp. 435–452. DOI: 10.1177/1073858410366481.

9. Trujillo C.A., Negraes P.D., Schwindt T.T., et al. Kinin-B2 receptor activity determines the differentiation fate of neural stem cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, no. 287 (53), pp. 44046–44061. DOI: 10.1074/jbc.m112.407197.

10. Tyurenkov I.N., Bagmetova V.V., Chernysheva Y.V., Borodin D.D. A depressive state in rats in chronic combined stress induced by combined stresses of different modalities. *Neuroscience and behavioral physiology*, 2015, no. 5 (45), pp. 542–549.

### Контактная информация

**Экова Мария Рафаэлевна** – к. м. н., доцент кафедры патологической анатомии, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: maria.ekova@mail.ru