

**ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ СИНТАЗЫ NO НА ВЫБРОС СЕРОТОНИНА
В МЕДИАЛЬНОЙ ПРЕФРОНТАЛЬНОЙ КОРЕ В ХОДЕ ФОРМИРОВАНИЯ
И ГЕНЕРАЛИЗАЦИИ УСЛОВНОЙ РЕАКЦИИ СТРАХА У КРЫС**

© 2023 г. Н. Б. Саульская¹*, М. А. Сусорова¹, Н. А. Трофимова¹

¹Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: saulskayanb@infran.ru

Поступила в редакцию 11.07.2023 г.

После доработки 23.08.2023 г.

Принята к публикации 01.09.2023 г.

Серотониновая и нитергическая системы медиальной префронтальной коры (мПК) вовлечены в контроль генерализации страха, но их локальное взаимодействие в ходе обеспечения этой функции исследовано мало. Целью работы было изучить влияние блокады эндогенных нитергических сигналов на выброс серотонина в мПК во время формирования условной реакции страха (УРС – модель страха) и на динамику ее генерализации. В исследованиях на самцах крыс линии Спрег-Доули методами прижизненного внутримозгового микродиализа и высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией было установлено, что введения в мПК через диализную канюлю ингибитора NO-синтазы *N*- ω -нитро-*L*-аргинина (NA, 0.5 мМ) и селективного ингибитора нейронной NO-синтазы *N*- ω -пропил-*L*-аргинина (NPLA, 2мМ) уменьшают базальный уровень внеклеточного серотонина в мПК и снижают функциональный подъем этого показателя, вызываемый выработкой УРС (сочетание условного сигнала (CS+) с неизбежным болевым раздражением). Введения NA и NPLA увеличивали замирание животных на дифференцировочный сигнал (CS–), не ассоциируемый с болевым раздражением, при первом тестировании, проводимом через 70 мин после выработки УРС на фоне введения этих препаратов, но уменьшали этот показатель при повторном тестировании через сутки после введения, не изменяя замирание тех же животных на потенциально опасный CS+. Полученные данные свидетельствуют об участии эндогенного NO в активации выброса серотонина в мПК, вызываемого формированием реакции страха. Кроме того, они показывают, что блокада эндогенных нитергических сигналов мПК, усиливающая первоначальную генерализацию реакции страха, способствует угасанию генерализованного страха, возможно, за счет торможения выброса серотонина в мПК.

Ключевые слова: медиальная префронтальная кора, прижизненный внутримозговой микродиализ, выброс серотонина, NO-серотониновое взаимодействие, генерализация реакции страха

DOI: 10.31857/S0869813923090108, EDN: ORFYAG

ВВЕДЕНИЕ

Нейромедиатор серотонин является одной из древнейших сигнальных молекул [см. 1], продуцируемых животными разных биологических типов [2]. В мозге лабораторных грызунов серотониновая система представлена девятью группами серо-

тонинергических нейронов ствола мозга, иннервирующих многие, если не все, отделы ЦНС [3]. Такая широкая иннервация, а также анатомическое, нейрохимическое и электрофизиологическое разнообразие серотониновых нейронов [4, 5] объясняют участие серотониновых сигналов в регуляции большого числа физиологических функций [6]. Важное место среди них занимают реакции на стресс и контроль различных аспектов страха [5, 7], включая генерализованный страх (страх в безопасных обстоятельствах) [8, 9] гипертрофированно усиливающийся при посттравматических стрессовых расстройствах [10]. Данные литературы и наши результаты свидетельствуют, что медиальная префронтальная кора (мПК) и ее серотониновая система, образуемая волокнами из дорсального и медианного ядер шва [7], участвуют в контроле генерализации страха [9, 11]. А именно, мы показали, что функциональный выброс серотонина в мПК, наблюдаемый во время выработки условной реакции страха (УРС – сочетание условного звукового сигнала (CS+) с неизбежным электрокожным раздражением, модель страха), является фактором, влияющим на генерализацию страха, поскольку его фармакологическое усиление селективно усиливает замирания крыс (показатель страха) на безопасные дифференцировочные сигналы (CS–) через сутки после выработки УРС [9].

Одним из возможных путей регуляции такого функционального выброса серотонина в мПК являются локальные нитрергические влияния, поскольку накапливаются сведения, что оксид азота (NO), регулирующий серотониновую нейротрансмиссию в разных отделах ЦНС [12, 13], в том числе и в мПК [14], может влиять на процессы генерализации страха в норме [15] и при психопатологии [16] через воздействие на активность серотониновой системы. В частности, по нашим данным, длительная (210 мин) инфузия в мПК во время выработки УРС донора NO диэтиламин ноноата (DEA, 1 мМ), приводящая в начале введения к кратковременному увеличению уровня внеклеточного серотонина в мПК с постепенным снижением этого показателя, тормозит функциональный выброс серотонина в мПК, вызываемый выработкой УРС, и через сутки уменьшает замирание животных на безопасный CS–, но не на потенциально опасный CS+ [15]. Эти результаты свидетельствуют о тормозном влиянии длительной экзогенной нитрергической стимуляции мПК на формирование и/или консолидацию генерализованного страха, происходящем на фоне торможения функционального выброса серотонина в мПК. Вместе с тем неизвестно, насколько такие закономерности действия донора NO являются физиологически релевантными, и может ли эндогенный NO, продукция которого, по нашим данным, увеличивается в мПК при формировании УРС [17], оказывать похожие влияния. Настоящее исследование посвящено выяснению этих вопросов.

Цель работы заключалась в изучении эффектов блокады эндогенных нитрергических сигналов на выброс серотонина в мПК в ходе формирования УРС и на генерализацию этой условнорефлекторной реакции. Для этого было исследовано, как введение в мПК в ходе выработки УРС ингибитора NO-синтазы (NOS) *N*- ω -нитро-*L*-аргинина (NA, 0.5 мМ) и селективного ингибитора нейронной NO-синтазы (nNOS) *N*- ω -пропил-*L*-аргинина (NPLA, 2 мМ) сказываются на выбросе серотонина в мПК, вызываемом выработкой УРС, а также на формировании УРС и на ее генерализации. Таких сведений в литературе нет.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментах использованы крысы-самцы линии Спрег-Доули массой 305–420 г из ЦКП “Биоколлекция ИФ РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем” (Санкт-Петербург). Живот-

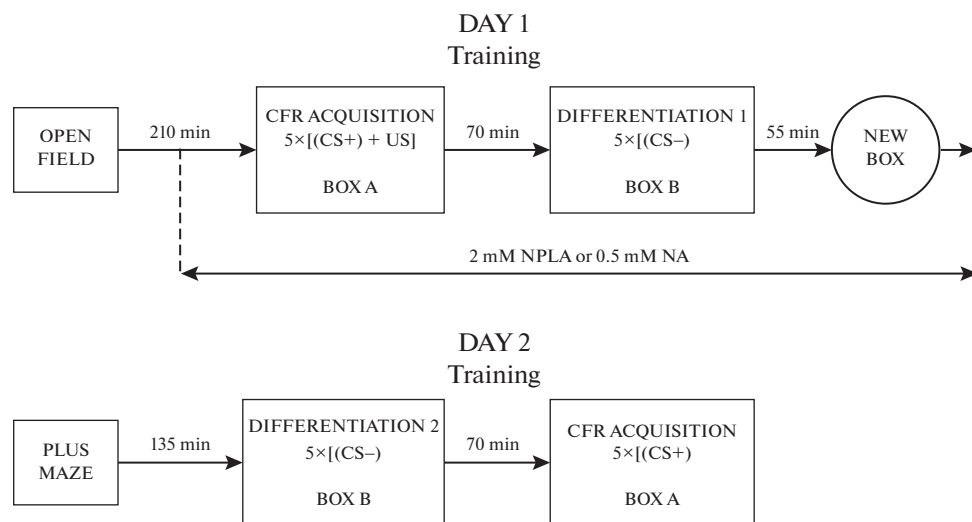


Рис. 1. Схема экспериментов. (CS+) – условный сигнал; (CS–) – дифференцировочный сигнал; US – безусловный стимул (электрокожное раздражение лап).

ных, взятых в эксперимент, содержали индивидуально в условиях свободного доступа к воде и сухому лабораторному корму.

Крысам под наркозом (рометар, Spofha, Чешская Республика, 1,4 мг/100 г и зо-летил, Virbac Sante Animale, Франция, 5 мг/100 г, внутримышечно) унилатерально в мПК вживляли микродиализные канюли концентрического типа, как описано ранее [17]. Схема экспериментов представлена на рис. 1. Через сутки (экспериментальный день 1) крыс тестировали в установке “Открытое поле” в течение 10 мин для оценки исследовательской активности животных перед экспериментами. Регистрировали амбуляцию, оцениваемую по числу пересечений границ секторов, на которые разбита установка, и вертикальную двигательную активность (по числу стоек). Далее начинали микродиализные эксперименты, сочетавшиеся с поведенческим тестированием. Детали экспериментов и используемое оборудование описаны нами ранее [9]. Вкратце, крысу помещали в дневной бокс со слоем опилок из домашней клетки и начинали диализную перфузию мПК искусственной спинномозговой жидкостью (ИСМЖ, 1 мкл/мин). Состав ИСМЖ (мМ): 147 NaCl, 4 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, pH 7.0). Спустя 1 ч начинали собирать фоновые образцы диализата (5 образцов по 15 мин). Затем крыс разделяли на 3 группы: “NA” ($n = 10$), “NPLA” ($n = 7$) и “Без введения” ($n = 10$). Крысам группы “NA” в ИСМЖ для перфузии мПК добавляли ингибитор NOS *N*- ω -нитро-*L*-аргинин (NA, 0.5 мМ, MP Biomedicals, США), а крысам группы “NPLA” – селективный ингибитор nNOS *N*- ω -пропил-*L*-аргинин (NPLA, 2 мМ, Tocris, Великобритания) и собирали по 5 образцов диализата (15 мин каждый). С учетом эффективности диализных канюль (20%) при скорости перфузии 1 мкл/мин реальная концентрация NA в мПК, создаваемая введением этого препарата, составляла 0.1 мМ, а реальная концентрация NPLA – 0.4 мМ. Затем у животных этих групп проводили выработку УРС с дискриминационным компонентом, которая включала 2 этапа. На первом этапе (выработка УРС) каждую крысу переносили в условнорефлекторную камеру А (желтые стены, решетчатый пол) на 5 мин, где предъявляли звуковой условный сигнал – непрерывный тон частотой 1000 Гц (CS+, 10 с, 5 раз, интервал 50 с), который сочетали с не-

избегаемым электрокожным раздражением лап (0.5 мА, 1 с). Регистрировали длительность замирания на CS⁺ (с), отражающую ожидание болевого раздражения, а также амбуляцию по числу пересечений границ секторов установки, и стойки, отражающие активные попытки избежать болевого раздражения. После этого крысу возвращали в дневной бокс и через 70 мин проводили второй этап обучения – дифференцировку 1. Крысу помещали в дифференцировочную камеру В (белый пол, белые стены) на 5 мин и предъявляли звуковой дифференцировочный сигнал – прерывистый тон частотой 1000 Гц (CS[–], 10 с, 5 раз, интервал 50 с) без электрокожного раздражения. Регистрировали время замирания на CS[–] (с), отражающее первоначальную генерализацию УРС. Затем животное возвращали в дневной бокс и спустя 55 мин помещали в новую круглую камеру (диаметр 30 см, высота 24 см) на 10 мин и определяли уровень исследовательской активности на фоне введения препаратов – амбуляцию (по числу пересечений границ секторов) и число стоек. После этого животное возвращали в дневной бокс и проводили “отмывку” канюли от фармакологических препаратов, как ранее описано [9]. Животные группы “Без введения” были подвергнуты таким же процедурам, но без добавления ингибиторов NO-синтазы в ИСМЖ для перфузии мПК.

На следующий день (экспериментальный день 2) животных всех групп тестировали в течение 5 мин в приподнятом крестообразном лабиринте [9], регистрируя амбуляцию (по числу пересечений границ секторов) и время пребывания (с) в закрытых и открытых рукавах. Затем возобновляли диализную перфузию мПК ИСМЖ. Через 2 ч всех крыс тестировали сначала на проявления генерализованного страха, оцениваемого по длительности замирания на CS[–] (с) в дифференцировочной камере В в ходе дифференцировки 2, которую проводили так же, как дифференцировку 1. Спустя 70 мин крыс тестировали на проявления условнорефлекторного страха, оцениваемого по замиранию на CS⁺ (с) в условнорефлекторной камере А во время реализации УРС, которую проводили так же, как выработку УРС, но без электрокожного раздражения.

Определение уровня серотонина в диализате мПК осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (Shimadzu, Германия) [9]. Использовали хроматографическую колонку для обращенно-фазной хроматографии Luna “Phenomenex”, США (150 × 2 мм, 3 мкм, C₁₈) с предколонкой 2 × 4 мм, 3 мкм, C₁₈, “Phenomenex”, США. Напряжение на рабочем электроде – +0.61 В. Подвижная фаза содержала: 0.1 М NaH₂PO₄·2H₂O; 2 мМ KCl; 0.5 мМ ЭДТА (Sigma, США); 0.26 мМ октилсульфоната натрия (“Sigma”, США); 13.5% карбинола; pH 5. Поток – 0.18 мл/мин, давление около 190 бар при температуре 35 градусов. В качестве внешнего стандарта использовали гидрохлорид серотонина (Sigma, США), в качестве внутреннего стандарта – 3,4-дигидроксибензиламин (Sigma, США). Хроматограммы регистрировали и обрабатывали в режиме реального времени (МультиХром 1.72, Амперсенд, Россия). Концентрацию серотонина в образцах диализата выражали в нМ, а после этого – в процентах к собственному среднему фону. Процедуру эвтаназии животных проводили так же, как опубликовано ранее [15]. Мозг извлекали и помещали в 10%-ный раствор формалина на неделю. Затем изготавливали фронтальные срезы мозга (40 мкм) для проведения морфологического контроля попаданий. В статистическую обработку отбирали крыс с локализацией канюль в мПК.

В отдельной серии экспериментов исследовали влияние введений в мПК NA и NPLA на чувствительность крыс к электрокожному раздражению. Животным с живленными в мПК диализными канюлями в течение 75 мин вводили 0.5 мМ NA (*n* = 6) и 2 мМ NPLA (*n* = 6), добавляемых в перфузионный раствор. Части животных (*n* = 7) перфузию мПК проводили ИСМЖ без добавления фармакологических

препаратов. Каждую крысу помещали в бокс с решетчатым полом и определяли порог возникновения реакции на ток (мкА) [9].

Для статистической обработки применяли статистический пакет SigmaStat (3.0). Данные представляли как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Сравнимые выборки проверяли на соответствие нормальному распределению (тест Колмогорова–Смирнова). Использовали однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ (F критерий, факторы время и/или группа) и t -критерий Бонферрони для множественного апостериорного сравнения. Парное сравнение поведенческих параметров животных осуществляли с помощью U критерия Манна–Уитни, если данные не соответствовали критерию нормальности распределения, и с использованием t критерия Стьюдента, если соответствовали. Использовали уровень достоверности $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Содержание серотонина в фоновых образцах диализата мПК составляло в этих экспериментах 0.22 ± 0.01 нМ ($n = 27$).

В тесте “Открытое поле” перед началом микродиализных экспериментов крысы групп “Без введения”, “NA” и “NPLA” не различались между собой по величине амбуляции ($F_{(2, 24)} = 0.2, p = 0.8$; число пересечений соответственно $49 \pm 12, 44 \pm 10, 53 \pm 12$) и по числу стоек ($F_{(2, 24)} = 0.9, p = 0.4$; значения соответственно $5 \pm 2, 9 \pm 3, 9 \pm 2$).

Выработка УРС с дискриминационным компонентом, включающая тесты “выработка УРС” и “дифференцировка 1”, приводила у животных группы “Без введения” к подъемам уровня внеклеточного серотонина в мПК в ходе обоих тестов относительно фона (рис. 2; $F_{(13, 117)} = 17.3, p < 0.001$), что соответствует нашим прежним результатам [9].

Введение в мПК животных группы “NPLA” ингибитора nNOS NPLA (2 мМ) снижало базальный уровень внеклеточного серотонина в мПК относительно этого показателя перед введением препарата (рис. 2; $F_{(9, 54)} = 6.4, p < 0.001$) и на этом фоне уменьшало подъемы уровня серотонина, вызываемые выработкой УРС и дифференцировкой 1 (рис. 2; $F_{(13, 210)} = 1.8, p = 0.04$, при сравнении с группой “Без введения” и $F_{(18, 108)} = 4.7, p < 0.001$ при сравнении с собственным фоновым уровнем). А именно, у животных группы “NPLA” наблюдался рост уровня серотонина в мПК во время выработки УРС относительно уровня серотонина перед тестом, сниженным введением NPLA ($t = 4.3, p = 0.006$), но не относительно фона перед введением NPLA ($t = 1.9, p = 1.00$). Вместе с тем у крыс группы NPLA во время дифференцировки 1 не было выявлено достоверных изменений уровня внеклеточного серотонина в мПК относительно фона перед введением NPLA ($t = 0.47, p = 1.00$), а также относительно уровня серотонина непосредственно перед тестом ($t = 2.04, p = 1.00$).

Введение крысам группы “NA” ингибитора NOS NA (0.5 мМ) в мПК тоже сопровождалось снижением базального уровня внеклеточного серотонина в этой области (рис. 3; $F_{(9, 81)} = 17.2, p < 0.001$), что подтверждает результаты, полученные нами ранее [14]. Уровень серотонина в мПК крыс группы “NA” оставался сниженным относительно собственного фона в ходе большей части дальнейшего эксперимента по выработке УРС с дискриминационным компонентом, за исключением временных периодов, приходящихся на сами тесты (рис. 3; $F_{(18, 162)} = 13.7, p < 0.001$). А именно, во время выработки УРС и дифференцировки 1 уровень серотонина в мПК животных группы “NA” не отличался от фонового уровня перед введением NA ($t = 2.2, p = 1.00$; $t = 2.6, p = 1.00$ соответственно), но был выше уровня

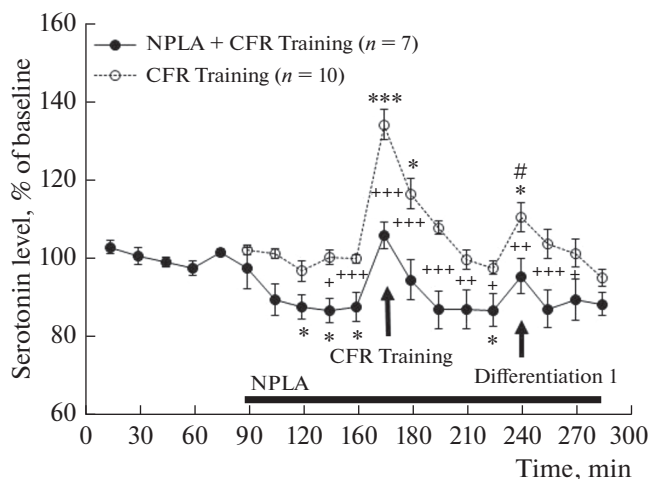


Рис. 2. Изменения уровня внеклеточного серотонина в мПК в ходе выработки УРС (CFR Training) и дифференцировки 1 (Differentiation 1) у крыс с введением (NPLA + CFR Training) в мПК 2мМ NPLA и без введения (CFR Training). По оси X – время, мин; по оси Y – уровень внеклеточного серотонина, % к фону; разброс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

серотонина перед тестами, измененного введением NA ($t = 7.0$, $p < 0.001$; $t = 7.0$, $p < 0.001$ соответственно). Двухфакторный дисперсионный анализ показал, что уровень внеклеточного серотонина в мПК животных группы “NA” был ниже относительно этого показателя крыс группы “Без введения” при сравнении во время и после выработки УРС, но не во время дифференцировки 1 (рис. 3; $F_{(13, 252)} = 3.6$, $p < 0.001$).

Межгрупповое сравнение не выявило различий в динамике изменений уровней внеклеточного серотонина в мПК в ходе выработки УРС и дифференцировки 1 между крысами групп “NPLA” и “NA” ($F_{(18, 285)} = 1.2$, $p = 0.3$).

Во время выработки УРС крысы групп “NA” и “NPLA” не различались между собой (рис. 4а; $t = 0.4$, $p = 0.7$) и не отличались от крыс группы “Без введения” (рис. 4а; соответственно $t = 0.9$, $p = 0.4$ и $t = 0.3$, $p = 0.7$) по длительности замирания на CS+ (показатель ожидания болевого раздражения). Также не было выявлено различий между крысами с введениями в мПК NA и NPLA и животными без введения препаратов по величине горизонтальной двигательной активности в ходе этого теста (рис. 4б; соответственно $U = 74.5$, $p = 0.07$ и $t = 0.9$, $p = 0.4$). Вместе с тем крысы, подвергнутые введениям NA и NPLA в мПК, совершали в ходе выработки УРС большее количество стоек (рис. 4с; $U = 77.5$, $p = 0.04$ и $U = 14.0$, $p = 0.04$ соответственно) по сравнению с крысами группы “Без введения” и не различались между собой по этому показателю ($t = 0.75$, $p = 0.47$).

Во время дифференцировки 1 (тест на первоначальную генерализацию УРС) крысы групп “NA” и “NPLA” демонстрировали больший уровень замирания на CS– (рис. 5а) по сравнению с животными группы “Без введения” (соответственно $U = 77.0$, $p = 0.045$ и $U = 11.0$, $p = 0.02$), но не различались между собой по величине этого параметра ($t = 0.7$, $p = 0.5$).

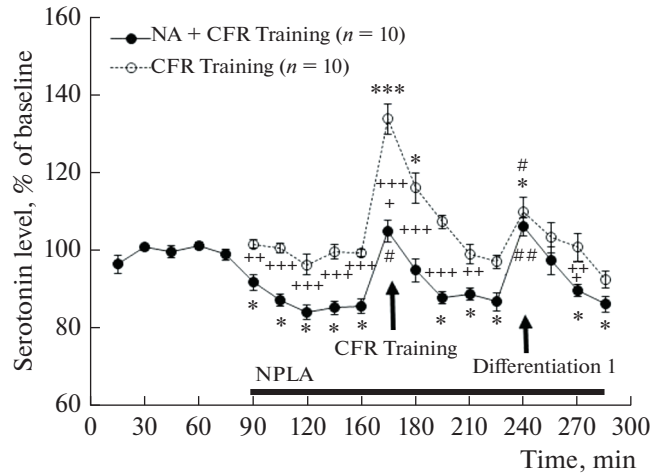


Рис. 3. Изменения уровня внеклеточного серотонина в мПК в ходе выработки УРС (CFR Training) и дифференцировки 1 (Differentiation 1) у крыс с введением (NA + CFR Training) в мПК 0.5 мМ NA и без введения (CFR Training). ## – $p < 0.001$ – при сравнении с уровнем серотонина перед тестом. Остальные обозначения, как на рис. 1. Однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ (F критерий) и t критерий Бонферрони.

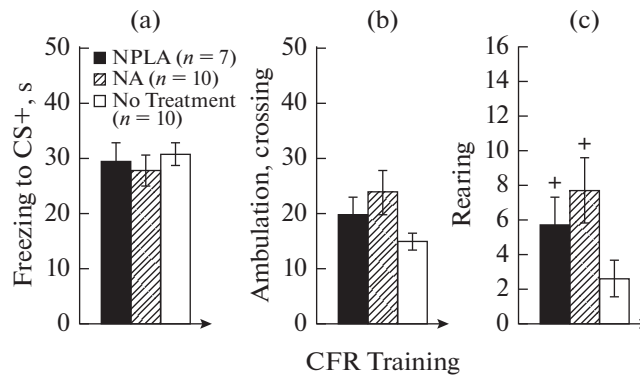


Рис. 4. (а) – Длительность замиранья на CS+, с; (б) – амбуляция (Ambulation), пересечения; (с) – число стоек (Rearing) во время выработки УРС (CFR Training) у крыс с введениями в мПК 2 мМ NPLA (NPLA), 0.5 мМ NA (NA) и у животных, не подвергавшихся введениям препаратов (No Treatment). (с) + – $p < 0.05$, – при сравнении с животными без введения препаратов (U критерий Манна–Уитни).

В ходе тестирования животных на проявления генерализованного страха через сутки после выработки УРС (дифференцировка 2, экспериментальный день 2) животные групп “NA” и “NPLA” демонстрировали меньшую длительность замиранья на CS– по сравнению с крысами группы “Без введения” (рис. 5b; соответственно $t = 2.1, p = 0.049$ и $t = 4.8, p < 0.001$). Не было выявлено достоверных различий между группами “NA” и “NPLA” по этому показателю ($t = 1.9, p = 0.07$).

При тестировании на проявления страха во время реализации УРС (экспериментальный день 2) животные групп “NA” и “NPLA” не различались между собой

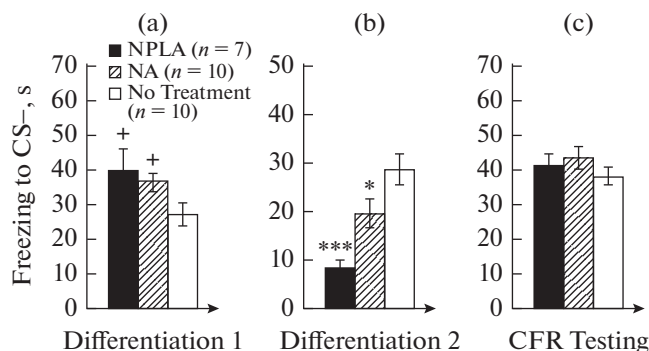


Рис. 5. Длительность замирания на CS- (а) – во время дифференцировки 1 (Differentiation 1) и (б) – во время дифференцировки 2 (Differentiation 2), а также (с) – длительность замирания на CS+ в ходе реализации УРС (CFR Testing) у крыс, подвергавшихся в первый день экспериментов введениям в мПК 2 мМ NPLA (NPLA), 0,5 мМ NA (NA) и у животных без введений препаратов (No Treatment). (а) + – $p < 0.05$ – при сравнении с животными без введения препаратов, U критерий Манна–Уитни; (б)* – $p < 0.05$; *** – $p < 0.001$ при сравнении с животными без введения препаратов, t критерий Стьюдента.

по длительности замирания на CS+ ($U = 43.0$, $p = 0.5$) и не отличались по этому показателю от крыс группы “Без введения” (рис. 5с; соответственно $t = 1.2$, $p = 0.2$ и $t = 0.7$, $p = 0.5$).

Тестирование исследовательского поведения в новой круглой камере в конце экспериментального дня 1 показало, что животные групп “Без введения”, “NA” и “NPLA” не различаются между собой по величине амбуляции, выражаемой в числе пересечений границ секторов установки ($F_{(2, 24)} = 1.1$, $p = 0.3$; значения соответственно 11 ± 2 , 15 ± 4 , 16 ± 2) и по числу стоек ($F_{(2, 24)} = 0.3$, $p = 0.8$; значения соответственно 2.7 ± 1.2 , 4.2 ± 1.8 , 3.1 ± 1.1).

Сравнение поведения животных в приподнятом крестообразном лабиринте через сутки после выработки УРС (экспериментальный день 2) тоже не выявило достоверных различий между крысами групп “NA”, “NPLA” и “Без введения” по времени пребывания (рис. 6а) в открытых ($F_{(2, 24)} = 0.81$, $p = 0.45$) и закрытых ($F_{(2, 24)} = 0.82$, $p = 0.46$) рукавах лабиринта, а также по величине амбуляции (рис. 6б) в открытых ($F_{(2, 24)} = 2.5$, $p = 0.1$) и закрытых ($F_{(2, 24)} = 2.9$, $p = 0.08$) рукавах лабиринта.

Не было обнаружено различий в порогах чувствительности к электрокожному раздражению крыс, не подвергавшихся (группа “Без введения”) и подвергавшихся (группы “NA” и “NPLA”) в течение 75 мин введениям в мПК 0,5 мМ NA и 2 мМ NPLA (рис. 6с; $F_{(2, 16)} = 0.14$, $p = 0.9$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данные литературы, полученные на лабораторных грызунах, свидетельствуют, что стресс активирует нитрергическую нейротрансмиссию в ряде мозговых структур [18], включая дорсальное ядро шва [16] и мПК [17, 19, 20]. При этом сильные стрессовые воздействия, используемые в моделях тревожных и посттравматических стрессовых расстройств, приводят к долгосрочному усилению экспрессии nNOS и к увеличению базальной продукции NO в обоих этих отделах [16, 19, 20], а умеренный стресс характеризуется краткосрочной активацией нитрергической системы мПК [17]. Так, по нашим прежним данным, электрокожное раздражение в ходе выработки УРС вызывает кратковременный (25 мин) подъем продукции NO в

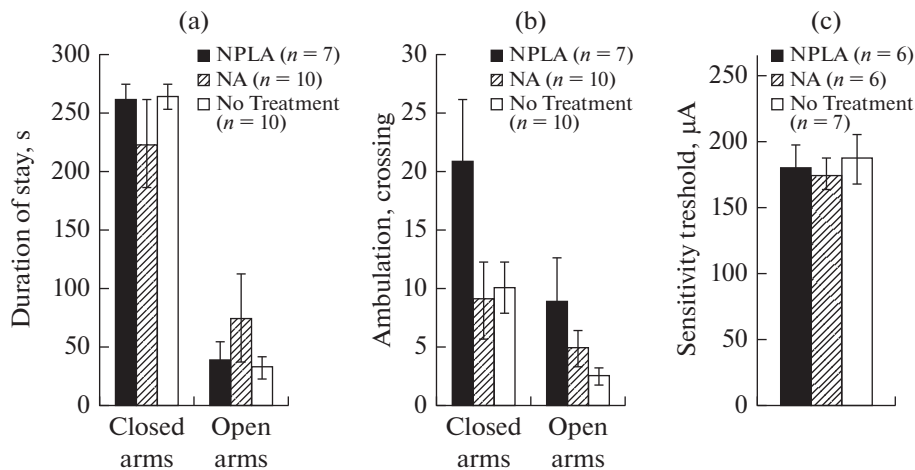


Рис. 6. (a) – Время пребывания, с, (b) – амбуляция, пересечения, в закрытых и открытых рукавах крестообразного лабиринта, (c) – порог чувствительности к электрокожному раздражению, μ A, у крыс с введениями в мПК 2 мМ NPLA (NPLA), 0,5 мМ NA (NA) и у животных без введений препаратов (No Treatment). *U* критерий Манна–Уитни и *t* критерий Стьюдента.

мПК, оцениваемый по NO-синтаза-зависимому увеличению уровня внеклеточно-цитруллина (сопродукта синтеза NO) в этой области [17].

Роль такой функциональной нитрергической активации мПК, предположительно, связана с тормозной регуляцией нитрергическими сигналами мПК первоначальной генерализации УРС, поскольку ее величина отрицательно коррелировала с замиранием животного на дифференцировочный сигнал (CS–) при первом тестировании, проводимом через 120 мин после выработки УРС [17]. Результаты настоящей работы подтверждают это предположение, демонстрируя, что блокада нитрергической нейротрансмиссии в мПК во время выработки УРС локальными введениями ингибитора NOS NA (0,5 мМ) и ингибитора nNOS NPLA (2 мМ) усиливает первоначальную генерализацию УРС. Это проявляется в усилении замирания животных на CS– при первом тестировании, проводимом в день выработки УРС на фоне введения ингибиторов NOS и nNOS (рис. 5а; дифференцировка 1). Показанный эффект не является следствием изменения под действием NA и NPLA подвижности животных или чувствительности к болевым сигналам, поскольку крысы с введениями и без введений в мПК этих препаратов не различались по показателям двигательной активности в новой камере и по порогу чувствительности к электрокожному раздражению (рис. 6с). С учетом сведений об участии NO в синаптической пластичности в мПК [21], эти данные позволяют говорить о тормозном влиянии эндогенных нитрергических сигналов этой области коры на самоформирование генерализованного страха, запускаемое в ЦНС во время выработки УРС и контролируемое мПК [см. 22].

В работе показано, что первоначальное усиление генерализации УРС, вызываемое блокадой нитрергической передачи в мПК, происходило на фоне снижения базального и функционального выброса серотонина в этой области (рис. 1–2). Этот факт, с учетом недавних литературных данных о том, что усиление генерализации страха обстановки в модели посттравматического стрессового расстройства сопровождается торможением базальной активности серотониновых нейронов ядер шва [16], позволяет предполагать возможный вклад серотониновых механиз-

мов мПК в показанную в работе NO-зависимую регуляцию первоначальной генерализации УРС.

Вместе с тем животные, подвергнутые во время выработки УРС введениям в мПК NA и NPLA, не только не сохраняли через сутки после введений высокий уровень генерализации УРС (замирание на безопасный CS–), но демонстрировали снижение данного показателя по сравнению с крысами, не подвергавшимися фармакологическим воздействиям (рис. 4b; дифференцировка 2). При этом показатели тревожности (рис. 6a) и двигательной активности (рис. 6b) в приподнятом крестообразном лабиринте, а также проявления условнорефлекторного страха (замирание на CS+) при реализации УРС (рис. 5c) у таких животных значимо не изменялись. Все это показывает, что отсроченные эффекты NA и NPLA связаны с ускоренным угасанием генерализованных проявлений УРС, что, возможно, вызвано нарушением консолидации памяти о генерализованном страхе под воздействием этих препаратов. Эта точка зрения опирается на данные литературы об участии NO в ЦНС в консолидации угасания памяти о страхе [см. 23] и о вовлечении мПК [24] и ее НМДА-рецепторов [25, 26] в эти процессы.

По нашему мнению, продемонстрированные в работе отсроченные тормозные эффекты локальной блокады нитрегической передачи в мПК во время выработки УРС на ее последующую генерализацию опосредованы торможением выброса серотонина в мПК под влиянием этих препаратов. Этот вывод поддерживают наши прежние данные, упомянутые во введении, показавшие, что активация серотониновой системы мПК во время выработки УРС является фактором, усиливающим через сутки проявления генерализованного страха [9], а также данные литературы о том, что крысы, нокаутные по гену транспортера серотонина (и, как следствие, обладающие повышенным уровнем серотонина в ЦНС) характеризуются дефицитом угасания памяти о страхе по сравнению с животными дикого типа [27]. Следует подчеркнуть, что в работе получены только косвенные подтверждения участия серотонина мПК в регуляции генерализации УРС нитрегическими сигналами этой области, и нужны дополнительные исследования, чтобы выявить точные мишени NO, вовлекаемые в эти процессы.

Значимый результат работы – в ней впервые продемонстрированы активационные влияния эндогенного NO нейронного происхождения на базальный и вызываемый выработкой УРС выброс серотонина в мПК. Об этом свидетельствует снижение обоих этих показателей при введении в мПК в ходе выработки УРС ингибитора nNOS NPLA (рис. 2). Ранее с использованием введений в мПК донора NO DEA (0.1–1 мМ) мы показали, что экзогенный NO тоже увеличивает базальный уровень внеклеточного серотонина в мПК, но такие эффекты являются дозозависимыми только в самом начале введений [14]. А далее при введении 1 мМ DEA уровень серотонина в мПК постепенно снижается [15], что, возможно, связано с десенситизацией растворимой гуанилатциклазы [28], мишени NO. Причем на фоне такого снижения функциональный выброс серотонина в мПК, вызванный выработкой УРС, тоже снижается, и это приводит через сутки к торможению проявлений генерализованного страха [15], то есть происходят изменения, совпадающие по направленности с показанными в настоящей работе эффектами локальной блокады нитрегической нейротрансмиссии в мПК. Сопоставление этих данных показывает, что длительная экзогенная нитрегическая стимуляция мПК высокими концентрациями донора NO, видимо, не всегда может быть использована в качестве модели нитрегической активации, отражающей NO-серотониновое взаимодействие в мПК в непатологических условиях, характеризующихся кратковременной и умеренной активацией нитрегической нейротрансмиссии. Косвенно подтверждают такую точку зрения данные литературы о контрастных эффектах высоких и низких

концентраций доноров NO на выброс серотонина в ядрах шва [29], ключевой структуре серотониновой системы мозга.

В целом, полученные в работе новые данные свидетельствуют об активационных влияниях эндогенного NO нейронного происхождения на базальный и вызываемый выработкой УРС выброс серотонина в мПК. Кроме того, они показывают, что блокада эндогенных нитрергических сигналов мПК во время выработки УРС, усиливающая первоначальную генерализацию этой условнорефлекторной реакции, способствует последующему угасанию проявлений генерализованного страха, возможно, за счет торможения выброса серотонина в мПК.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, проводимые с животными, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и одобрены комиссией по содержанию и использованию животных в Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН (протокол № 04/19 от 19.04.2021 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Госпрограммы 47 ГП “Научно-технологическое развитие Российской Федерации” (2019–2030), тема 0134-2019-0004.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы, планирование экспериментов (Н.Б.С.), сбор данных (М.А.С., Н.А.Т., Н.Б.С.), статистическая обработка и анализ данных (Н.Б.С., М.А.С.), написание и редактирование статьи (Н.Б.С., М.А.С., Н.А.Т.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mercurio S, Bozzo M, Pennati A, Candiani S, Pennati R (2023) Serotonin receptors and their involvement in melanization of sensory cells in *Ciona intestinalis*. 12: 1150. <https://doi.org/10.3390/cells12081150>
2. Rao STRB, Turek I, Irving HR (2023) Phylogenetic analysis of 5-hydroxytryptamine 3 (5-HT₃) receptors in Metazoa. *PloS One* 18(3): e0281507. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281507>
3. Okaty BW, Commons KG, Dymecki SM (2019) Embracing diversity in the 5-HT neuronal system. *Nature Reviews Neurosci* 20: 395–424. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0151-3>
4. Prouty EW, Chandler DJ, Waterhouse BD (2017) Neurochemical differences between target-specific populations of rat dorsal raphe projection neurons. *Brain Res* 1675: 27–40. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.08.031>
5. Ren J, Friedmann D, Xiong J, Liu CD, Ferguson BR, Weerakkody T, DeLoach KE, Ran C, Pun A, Sun Y, Weissbourd B, Neve RL, Huguenaud J, Horowitz MA, Luo L (2018) Anatomically defined and functionally distinct dorsal raphe serotonin sub-systems. *Cell* 175: 472–487.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.043>
6. Vasudeva RK, Lin RCS, Simpson KL, Waterhouse BD (2011) Functional organization of the dorsal raphe efferent system with special consideration of nitrergic cell groups. *J Chem Neuroanat* 41: 281–293. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2011.05.008>
7. Bauer EP (2015) Serotonin in fear conditioning processes. *Beh Brain Res* 277: 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.07.028>
8. Asok A, Kandel ER, Rayman JB (2019) The neurobiology of fear generalization. *Front Behav Neurosci* 12: 329. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00329>

9. *Saulskaya NB, Marchuk OE* (2020) Inhibition of serotonin reuptake in the medial prefrontal cortex during acquisition of a conditioned reflex fear reaction promotes formation of generalized fear. *Neurosci Behav Physiol* 50: 432–438.
<https://doi.org/10.1007/s11055-020-00918-x>
10. *Morrey RA, Dunsmoor JE, Haswell CC, Brown VM, Vora A, Weiner J, Stjepanovic D, Wagner HR* (2015) Fear learning circuitry is biased toward generalization of fear associations in posttraumatic stress disorders. *Transl Psychiatry* 5: e700.
<https://doi.org/10.1038/tp.2015.196>
11. *Xu W, Sudhof TC* (2013) A neural circuit for memory specificity and generalization. *Science* 339: 1290–1295.
<https://doi.org/10.1126/science.1229534>
12. *Ghasemi M, Claunch J, Niu K* (2019) Pathologic role of nitrenergic neurotransmission in mood disorders. *Prog Neurobiol* 173: 54–87.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.06.002>
13. *Sun N, Qin Y-J, Chu C, Xia T, Du Z-W, Zheng L-P, Li A-A, Meng F, Zhang Y, Zhang J, Liu X, Li T-Y, Zhu D-Y, Zhou Q-G* (2022) Design of fast-onset antidepressant by dissociating SERT from nNOS in the DRN. *Science* 378: 390–398.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00329>
14. *Saulskaya NB, Burmakina MA, Trofimova NA* (2022) Effect of activation and blockade of nitrenergic neurotransmission on serotonin system activity of the rat medial prefrontal cortex. *J Evol Biochem Physiol* 58: 500–507.
<https://doi.org/10.1134/S0022093022020181>
15. *Saulskaya NB, Burmakina MA, Trofimova NA* (2021) Nitric oxide inhibits the functional activation of the medial prefrontal cortex serotonin system during fear formation and decreases fear generalization. *Neurochem J* 15: 266–272.
<https://doi.org/10.1134/s1819712421030107>
16. *Sun N, You Y, Yang D, Jiang Z-X, Xia T, Zhou Q-G, Zhu D-Y* (2021) Neuronal nitric oxide synthase in dorsal raphe nucleus mediates PTSD-like behaviors induced by single-prolonged stress through inhibiting serotonergic neurons activity. *Biochem Biophys Res Communicat* 585: 139e145.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.11.048>
17. *Saul'skaya NB, Sudorgina PV* (2016) Activity of the nitrenergic system of the medial prefrontal cortex in rats with high and low levels of generalization of a conditioned reflex fear reaction. *Neurosci Behav Physiol* 46: 964–970.
<https://doi.org/10.1007/s11055-016-0338-2>
18. *Zhou QG, Zhu XH, Nemes AD, Zhu DY* (2018) Neuronal nitric oxide synthase and affective disorders. *IBRO Rep* 5: 116–132.
<https://doi.org/10.1016/j.ibror.2018.11.004>
19. *Campos AC, Piorino EM, Ferreira FR, Guimaraes FS* (2013) Increased nitric oxide-mediated neurotransmission in the medial prefrontal cortex is associated with the long lasting anxiogenic-like effect of predator exposure. *Behav Brain Res* 256: 391–397.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.08.006>
20. *Villa-Verde C, Marinho ALZ, Lisboa SF, Guimaraes FS* (2016) Nitric oxide in the prelimbic medial prefrontal cortex is involved in the anxiogenic-like effect induced by acute restraint stress in rats. *Neuroscience* 320: 30–42.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.01.040>
21. *Noriega-Prieto JA, Maglio LE, Gallero-Salas Y, de Sevilla DF* (2019) Nitric oxide-dependent LTD at infralimbic cortex. *Neuroscience* 418: 149–156.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.08.029>
22. *Саульская НБ* (2018) Генерализация страха в моделях на животных: нейрофизиологические механизмы и возможные мишени коррекции. *Успехи физиол наук* 49: 12–29 [*Saul'skaya NB* (2018) Fear generalization in animal models: neurophysiological mechanisms and possible targets for correction. *Uspekhi fiziol nauk* 49: 12–29. (In Russ)].
<https://doi.org/10.7868/S0301179818040021>
23. *Sadeghi MA, Hemmati S, Nassireslami E, Zoshk MY, Hosseini Y, Abbasian K, Chamanara M* (2022) Targeting neuronal nitric oxide synthase and the nitrenergic system in post-traumatic stress disorder. *Psychopharmacology* 239: 3057–3082.
<https://doi.org/10.1007/s00213-022-06212-7>
24. *Bayer H, Bertoglio LJ* (2020) Infralimbic cortex controls fear memory generalization and susceptibility to extinction during consolidation. *Scient Rep* 10: 15827.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-72856-0>
25. *Vieira PA, Corches A, Lovelace JW, Westbrook KB, Mendoza M, Korzus E* (2015) Prefrontal NMDA receptors expressed in excitatory neurons control fear discrimination and fear extinction. *Neurobiol Learn and Memory* 119: 52–62.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.12.012>

26. Vanvossen AC, Portes MAM, Scoz-Silva R, Reichmann HB, Stern CAJ, Bertoglio LJ (2017) Newly acquired and reactivated contextual fear memories are more intense and prone to generalize after activation of prelimbic cortex NMDA receptors. *Neurobiol Learn Mem* 137: 154–162. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.12.002>
27. Brivio P, Gallo MT, Karel P, Cogi G, Fumagalli F, Homberg JR, Calabrese F (2022) Alterations of mitochondrial dynamics in serotonin transporter knockout rats: A possible role in the fear extinction recall mechanisms. *Front Behav Neurosci* 16: 957702. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.957702>
28. Sayed N, Baskaran P, Ma X, van den Akker F, Beuve A. (2007) Desensitization of soluble guanylyl cyclase, the NO receptor, by S-nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 12312–12317. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703944104>
29. Smith JCE, Whitton PS (2000) Nitric oxide modulates N-methyl-d-aspartate-evoked serotonin release in the raphe nuclei and frontal cortex of the freely moving rat. *Neurosci Letters* 29: 5–8.

Influence of NO Synthase Inhibitors on Serotonin Release in the Medial Prefrontal Cortex during the Formation and Generalization of the Conditioned Fear Response in Rats

N. B. Saulskaya^{a, *}, M. A. Susorova^a, and N. A. Trofimova^a

^a*Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia*

**e-mail: saulskayanb@infran.ru*

Serotonergic and nitrenergic systems of the medial prefrontal cortex (mPFC) are involved in the control of fear generalization, but their local interaction during this function has been little studied. The aim of the work was to study the effect of blockade of endogenous nitrenergic signals on serotonin release in the mPFC during the acquisition of a conditioned fear response (CFR – a fear model) and on the dynamics of its generalization. In male Sprague-Dawley rats using intracranial microdialysis *in vivo* and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, we found that the intra-mPFC infusion through the dialysis probe of the NO synthase inhibitor *N*- ω -nitro-*L*-arginine (NA, 0.5 mM) and selective neuronal NO synthase inhibitor *N*- ω -propyl-*L*-arginine (NPLA, 2mM) decreased the basal level of extracellular serotonin in the mPFC and reduced its rise, caused by the CFR acquisition (a paired presentation of a conditioned cue (CS+) and inescapable footshock). The intra-mPFC infusion of NA and NPLA increased animals' freezing to a differential cue (CS–) not associated with footshock, during the first test, carried out 70 minutes after the CFR acquisition, but reduced it during repeated testing a day after the infusion, without changing freezing of the same animals to the potentially dangerous CS+. The data obtained indicate the involvement of endogenous NO in the activation of serotonin release in the mPFC, caused by the CFR acquisition. In addition, they show that the blockade of endogenous nitrenergic signals of the mPFC, which enhances the initial generalization of the fear reaction, contributes to the extinction of the generalized fear, possibly due to inhibition of the serotonin release in the mPFC.

Keywords: medial prefrontal cortex, *in vivo* intracranial microdialysis, serotonin release, NO-serotonin interaction, fear generalization