

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**D-СЕРИН СНИЖАЕТ УРОВЕНЬ ВНЕКЛЕТОЧНОГО СЕРОТОНИНА
В МЕДИАЛЬНОЙ ПРЕФРОНТАЛЬНОЙ КОРЕ И УСИЛИВАЕТ
ФОРМИРОВАНИЕ РЕАКЦИИ СТРАХА У КРЫС**

© 2024 г. Н. Б. Саульская^{1,*}, М. А. Сусорова¹

¹Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук,

Санкт-Петербург, Россия

**E-mail: saulskeyanb@infran.ru*

Поступила в редакцию 20.07.2024 г.

После доработки 12.08.2024 г.

Принята к публикации 14.08.2024 г.

D-серин является эндогенным агонистом глицинового сайта NMDA-рецепторов. Однако его вклад в организацию функций медиальной префронтальной коры (мПК) исследован мало. Целью работы было изучение участия D-серина в формировании и генерализации условной реакции страха (УРС – модель страха), а также в регуляции выброса серотонина в этой области. На крысах линии Спрег-Дуули методами прижизненного внутримозгового диализа и ВЭЖХ показано, что введение D-серина (1мМ) в мПК снижает в ней базальный уровень внеклеточного серотонина и уменьшает на фоне такого снижения рост данного показателя во время выработки УРС (сочетание условного сигнала (CS+) с неизбежным болевым раздражением), но не в ходе дифференцировки I (предъявление дифференцировочного сигнала (CS–) без болевого раздражения). Введение в мПК D-серина уменьшало во время выработки УРС замирание животных на CS+ (показатель пассивного ожидания болевого раздражения) и увеличивало горизонтальную двигательную активность и число стоек (попытки избежать болевого раздражения). Такое фармакологическое воздействие приводило через сутки к усилению замирания на потенциально опасный CS+, но не на безопасный CS–. Полученные данные впервые свидетельствуют, что D-сериновая стимуляция мПК, снижающая выброс серотонина в этой области, усиливает в ходе выработки УРС активную стратегию поведения животных, направленную на избегание, и тормозит пассивную стратегию ожидания болевого раздражения. Это сопровождается усилением формирования и/или консолидации УРС, но не влияет на ее генерализацию.

Ключевые слова: D-серин, NMDA-рецепторы, выброс серотонина, условная реакция страха, медиальная префронтальная кора, прижизненный внутримозговой микродиализ

DOI: 10.31857/S0869813924090095, **EDN:** AJSTYG

ВВЕДЕНИЕ

Оптический изомер серина D-серин является эндогенным агонистом глицинового сайта NMDA-рецепторов глутамата. В ЦНС млекопитающих D-серин присутствует в виде свободной аминокислоты в концентрациях, коррелирующих с плотностью

NMDA-рецепторов [1]. Высокое содержание D-серина выявлено в корковых областях, в том числе в медиальной префронтальной коре (мПК), где на его долю приходится около 20% серина [2]. D-серин продуцируется преимущественно нейронами (90%) и в меньшей степени астроцитами (10%) в результате рацемизации L-серина, катализируемой серин-рацемазой [3]. Высвобождение D-серина, участвующего в функциональной активации NMDA-рецепторов, тоже осуществляют нейроны (постсинаптические участки) [4] и астроциты [5, 6]. При этом астроциты обеспечивают захват D-серина из внеклеточного пространства и его ферментативную деградацию [7], а также являются источником L-серина, участвующего в синтезе D-серина [8].

В литературе накапливаются данные о вкладе D-серина и D-серин-зависимой активации NMDA-рецепторов ЦНС в механизмы обучения и памяти [6], включая память о страхе [9–11]. Продемонстрировано, что дисфункция D-сериновой системы ЦНС может быть вовлечена в патогенез ряда психических расстройств, характеризующихся патологическими изменениями проявлений страха [1, 3]. Одним из основных центров контроля страха является мПК, участвующая в формировании и генерализации памяти о страхе [12]. Кроме того, мПК играет важную роль в регуляции высших когнитивных процессов, в том числе в выборе стратегии поведения и в обеспечении его гибкости [13]. Следует отметить, что мПК является единственной областью коры, посылающей проекции к ядрам шва [14], что позволяет ей управлять активностью серотониновых нейронов, иннервирующих многие отделы ЦНС [15]. В частности, показано, что мПК генерирует и передает сигнал о контролируемости стресса нейронам ядер шва, снижающий выброс серотонина в ряде структур переднего мозга [15]. Это способствует усилению избегательных реакций на стресс и ослаблению пассивных форм реагирования (замирание) [15]. Вклад D-сериновых сигналов мПК в такую регуляцию не изучен.

В ряде исследований показано участие NMDA-зависимой нейротрансмиссии в прелимбическом отделе мПК в выработке и/или консолидации условной реакции страха (УРС, модель страха) [16, 17], а также в генерализации УРС [16, 18]. Вместе с тем отсутствуют сведения о роли в этих процессах D-сериновых механизмов мПК.

Ранее мы установили, что выработка УРС (сочетание условного сигнала (CS+) с неизбежным электрокожным раздражением) сопровождается выбросом серотонина в мПК, усиливающим будущую генерализацию УРС (проявления страха на безопасный дифференцировочный раздражитель (CS-)), но не влияющим на память о потенциально опасном CS+ [19]. Однако неизвестно, могут ли локальные D-сериновые сигналы изменять выброс серотонина в мПК и как это соотносится с формированием и генерализацией УРС.

Цель работы заключалась в исследовании вклада D-сериновой активации NMDA-рецепторов мПК в регуляцию выброса серотонина в этой корковой области, в выбор активной или пассивной поведенческой стратегии в ответ на неизбежный болевой стресс при выработке УРС, а также в процессы формирования и генерализации УРС. Для этого было изучено влияние введения в мПК в ходе выработки УРС D-серина (1мМ), во-первых, на изменения уровня внеклеточного серотонина в мПК; во-вторых, на активные (перемещения, стойки) и пассивные (замирание) поведенческие ответы в ходе выработки УРС; в-третьих, на проявления УРС (замирание на CS+) и на генерализацию УРС (замирание на CS-) через сутки после выработки УРС. Таких сведений в литературе нет.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали самцов крыс линии Спрег-Дуули массой 325–420 г (возраст 3–4 месяца) из ЦКП «Биоколлекция Института физиологии им. И.П. Павлова РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных сис-

тем» (Санкт-Петербург). В ходе экспериментов животных содержали индивидуально при естественном режиме освещенности. Доступ к воде и лабораторному корму был свободным.

Крысам под наркозом (рометар, «Sporha», Чешская Республика, 1,4 мг/100 г и золетил, «Virbac Sante Animale», Франция, 5 мг/100 г, внутримышечно) в правую мПК по стереотаксическим координатам черепа имплантировали микродиализные канюли [20]. Для предотвращения послеоперационного воспаления крысам вводили антибиотик бициллин-5 («Синтез», Россия, 30000 ЕД/100 г, внутримышечно). Эксперименты начинали через сутки после имплантации. Они включали два этапа (рис. 1) – этап обучения (экспериментальный день 1) и этап тестирования (экспериментальный день 2). Для детального описания см. [21].

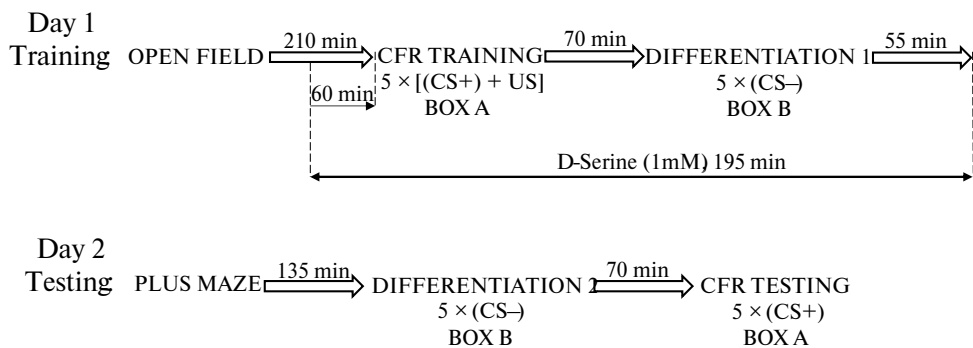


Рис. 1. Схема эксперимента. (CS+) – условный сигнал; (CS-) – дифференцировочный сигнал; US – безусловный стимул (электрокожное раздражение).

В начале экспериментального дня каждую крысу тестировали в установке «Открытое поле» в течение 5 мин для оценки изначального уровня подвижности. Регистрировали горизонтальную двигательную активность, оцениваемую по пересечениям границ секторов установки, и число стоек. Затем животное помещали в дневной бокс и начинали процедуру микродиализа мПК искусственной спинномозговой жидкостью (ИСМЖ, 1мкл/мин). После стабилизационного периода (1 ч) и сбора 5 фоновых порций диализата (по 15 мин каждая) животных разделяли на 2 группы: «D-Serine» ($n = 9$) и «Без введения» ($n = 12$). Каждой крысе группы «D-Serine» в ИСМЖ, прокачиваемую через диализную канюлю, вводили D-серин (1мМ, «MP Biomedicals», США) и собирали 4 порции диализата (по 15 мин каждая). Затем, не прерывая процедуру введения D-серина в мПК и сбора диализата, проводили выработку УРС. Крысу на 5 мин помещали в камеру А (желтые стены, решетчатый пол) и предъявляли условный сигнал (CS+, непрерывный тон, 1000 Гц, 10 с, 5 раз, интервал 50 с) в сочетании с неизбежным электрокожным раздражением, подаваемым через решетку пола (0,5 мА, 1 с). Регистрировали следующие параметры: 1) время замирания на CS+ (с), отражающее ожидание болевого раздражения; 2) время замирания в межсигнальных интервалах (с); 3) активные формы поведения – горизонтальную двигательную активность (пересечения границ секторов камеры) и стойки, отражающие попытки животного избежать болевого раздражения. После этого крысу возвращали в дневной бокс и через 70 мин проводили дифференцировку 1. Животное переносили на 5 мин в камеру В (белый пол, белые стены) и предъявляли дифференцировочный сигнал (CS-, прерывистый тон 1000 Гц, 10 с, 5 раз, интервал 50 с) без болевого раз-

дражения. Регистрировали время замирания на CS- (с), отражающее первоначальную генерализацию УРС, время замирания в межсигнальных интервалах, горизонтальную двигательную активность (пересечения) и число стоек. Затем животное возвращали в бокс на 55 мин, после чего сбор диализата завершали и отмывали канюлю от D-серина, пропуская через нее ИСМЖ (1 мкл/мин, 15 мин). Животных группы «Без введения» подвергали тем же процедурам, но без добавления D-серина в ИСМЖ для перфузии мПК.

На следующий день (экспериментальный день 2, этап тестирования) с крысами обеих групп проводили три последовательных поведенческих теста (рис. 1). Сначала животных в течение 5 мин тестировали в приподнятом крестообразном лабиринте. Регистрировали следующие параметры поведения в закрытых и открытых рукавах лабиринта: 1) горизонтальную двигательную активность (по пересечению границ секторов); 2) число стоек/свешиваний; 3) длительность пребывания (с). После этого возобновляли диализную перфузию мПК ИСМЖ и через 2 ч проводили дифференцировку 2 так же, как дифференцировку 1. Регистрировали длительность замирания (с) на CS- и в межсигнальных интервалах параметры, отражающие генерализацию УРС. Через 70 мин проводили тестирование животных на проявления УРС. Животных помещали на 5 мин в камеру А и предъявляли CS+ так же, как при выработке УРС, но без болевого раздражения. Проявления условнорефлекторного страха оценивали по замиранию животных (с) на CS+ и в межсигнальных интервалах.

Мы не можем полностью исключить влияние послеоперационного стресса и наркоза, а также самой диализной перфузии на изучаемые показатели, но животные сравниваемых групп находились в равных условиях.

Определение уровня серотонина в диализате мПК осуществляли методом ВЭЖХ (LC-10ATVP, «Shimadzu», Германия) с электрохимической детекцией (Procede «Antec Leyden», Нидерланды), как было описано ранее [21]. Для регистрации и обработки хроматограмм использовали аппаратно-программный комплекс МультиХром 1.72 («Амперсенд», Россия). Концентрацию серотонина в диализате мПК выражали в нМ, а затем – в процентах к собственному среднему фоновому уровню перед тестами. После окончания экспериментов животных забивали и проводили морфологический контроль попаданий, как описано ранее [19]. В статистическую обработку включали крыс с локализацией канюль в мПК (преимущественно прелимбический отдел).

Статистическую обработку проводили с использованием пакета SigmaStat (3.0). Данные представляли как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Сравнимые выборки проверяли на нормальность распределения методом Колмогорова – Смирнова и далее применяли методы параметрической статистики, если данные удовлетворяли критерию нормальности, или непараметрической статистики, если не удовлетворяли. Для сравнения изменений уровня внеклеточного серотонина в мПК относительно собственного фонового уровня в ходе поведенческих тестов, проводимых на фоне введения или без введения D-серина в мПК, использовали однофакторный дисперсионный анализ Фридмана для повторяющихся замеров (хи-квадрат, фактор – время) и критерий Ньюмана – Килса для апостериорного сравнения. Для выяснения влияния введения D-серина на базальный уровень внеклеточного серотонина в мПК перед поведенческими тестами (начало эксперимента) применяли однофакторный дисперсионный анализ для повторяющихся замеров (F-критерий, фактор – время). Для межгруппового сравнения изменений уровня серотонина использовали двухфакторный дисперсионный анализ (F-критерий, факторы – время и группа) и критерий Ньюмана – Килса для апостериорного сравнения. Парное сравнение параметров поведения проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента, если сравниваемые выборки соответствовали нормальному распределению, или с помощью критерия Манна – Уитни, если не соответствовали. Использовали уровень достоверности $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Перед началом микродиализных экспериментов крысы групп «D-Serine» ($n = 9$) и «Без введения» ($n = 12$) не различались между собой по величине горизонтальной двигательной активности (рис. 2, $t = 0.06$, $p = 0.95$) и числу стоек (рис. 2, $t = 1.6$, $p = 0.12$) в тесте «Открытое поле».

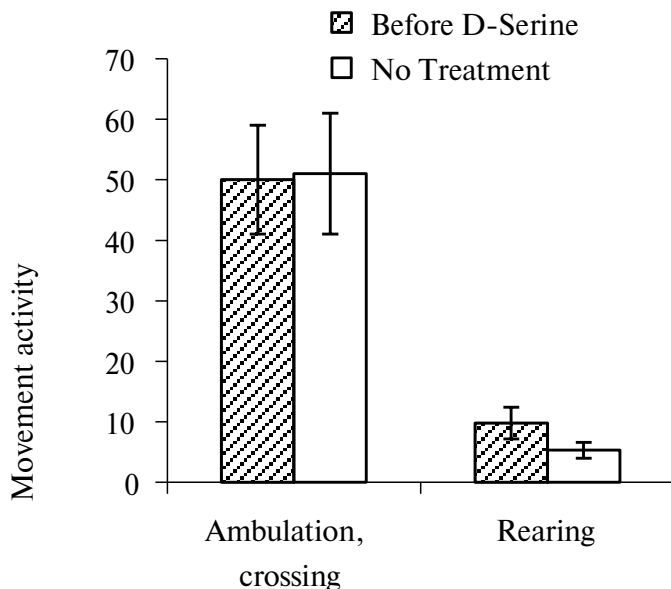


Рис. 2. Горизонтальная двигательная активность, пересечения (Ambulation, crossing) и число стоек (Rearing) в тесте «Открытое поле» у крыс до введения D-серина в мПК (Before D-Serine) и у животных без введения D-серина (No Treatment). Достоверных отличий не найдено, t -критерий Стьюдента.

По данным однофакторного дисперсионного анализа, выработка УРС у крыс группы «Без введения» сопровождалась ростом уровня внеклеточного серотонина в мПК относительно фонового уровня перед тестом (рис. 3), что соответствует ранее опубликованным нами данным [21]. Животные этой группы не демонстрировали достоверных изменений уровня серотонина в мПК в ходе дифференцировки 1 (рис. 3).

Введение D-серина (1 мМ) в мПК крыс группы «D-Serine» сопровождалось снижением базального уровня внеклеточного серотонина в этой области (рис. 3) относительно фона перед введением. Однофакторный дисперсионный анализ, охватывающий весь период введения D-серина, показал, что такое фармакологическое воздействие влияет на динамику изменений уровня внеклеточного серотонина в мПК в ходе поведенческих тестов (хи-квадрат = 66.5, $k = 17$, $p < 0.001$, критерий Фридмана). По данным апостериорного анализа, выработка УРС и дифференцировка 1 у животных группы «D-Serine» приводили к подъему уровня внеклеточного серотонина в мПК относительно этого показателя непосредственно перед тестами (соответственно $q = 8.8$, $p < 0.05$ и $q = 7.1$, $p < 0.05$, критерий Ньюмана – Килса), но не относительно фонового

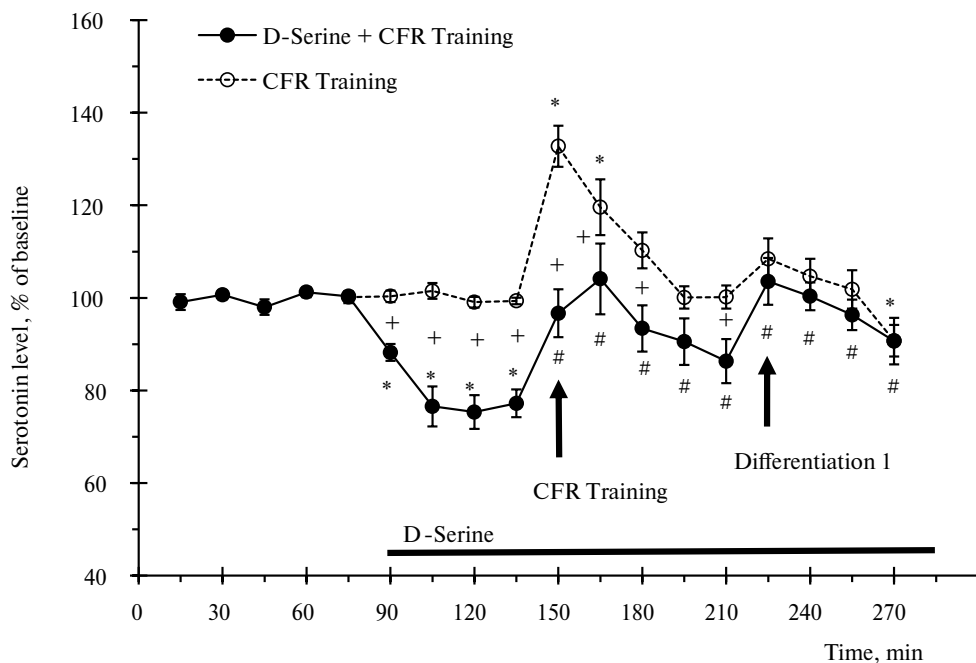


Рис. 3. Изменения уровня внеклеточного серотонина в мПК в процессе выработки УРС (CFR Training) и дифференцировки 1 (Differentiation 1) у крыс, подвергавшихся (D-Serine + CFR Training) и не подвергавшихся (CFR Training) введению в мПК D-серина. Выработка УРС приводила к подъему уровня серотонина в мПК (хи-квадрат = 57.5, $k = 13$, $p < 0.001$, критерий Фридмана, однофакторный дисперсионный анализ). Введение 1мМ D-серина снижало базальный уровень серотонина в мПК ($F_{(8, 64)} = 27.4$, $p < 0.001$, F-критерий, однофакторный дисперсионный анализ) и на этом фоне уменьшало его подъем во время выработки УРС ($F_{(13, 266)} = 3.8$, $p < 0.001$, F-критерий, двухфакторный дисперсионный анализ). Ось X – время, мин; ось Y – уровень внеклеточного серотонина, % к фону; разброс на графике – ошибка среднего; стрелки – поведенческие тесты; горизонтальная линия – период введения D-серина. * – $p < 0.05$ – при сравнении с фоном (критерий Ньюмана – Килса); + – $p < 0.05$ – при межгрупповом сравнении (критерий Ньюмана – Килса); # – $p < 0.05$ – при сравнении с уровнем серотонина, измененным введением D-серина перед тестом (критерий Ньюмана – Килса).

уровня перед введением препарата (соответственно $q = 3.8$, $p > 0.05$ и $q = 0.7$, $p > 0.05$, критерий Ньюмана – Килса).

Межгрупповое сравнение выявило влияние группы на изменения уровня серотонина в ходе выработки УРС относительно фонового уровня (рис. 3). А именно, крысы группы «D-Serine» во время выработки УРС характеризовались меньшим уровнем внеклеточного серотонина в мПК по сравнению с животными группы «Без введения» ($q = 9.4$, $p < 0.001$, критерий Ньюмана – Килса). Группы не различались между собой по уровню серотонина в мПК во время дифференцировки 1 ($q = 1.1$, $p = 0.4$, критерий Ньюмана – Килса).

Введение в мПК D-серина во время выработки УРС уменьшало в ходе этого теста замирание животных на CS+ (рис. 4а) и в межсигнальных интервалах (рис. 4б) по сравнению с соответствующими показателями крыс группы «Без введения». При этом во время дифференцировки 1 животные с введением и без введения D-серина в мПК не

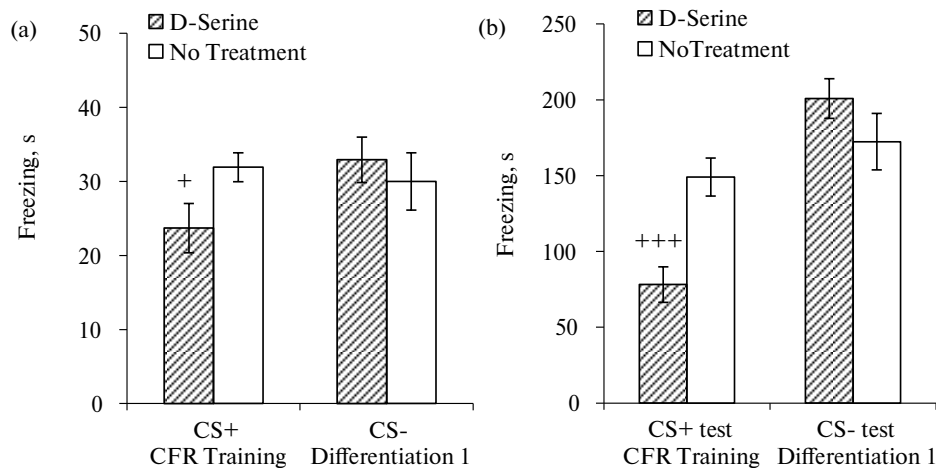


Рис. 4. (а) – Длительность замирания на звуковые сигналы (CS+, CS-, с) и (б) в межсигнальных интервалах (CS+ test, CS- test, с) во время выработки УРС (CFR Training) и дифференцировки 1 (Differentiation 1) у крыс с введением в мПК 1мМ D-серина (D-Serine) и у животных, не подвергавшихся введению препарата (No Treatment). Введение D-серина уменьшало замирание на CS+ и в межсигнальных интервалах во время выработки УРС. + – $p = 0.04$, $t = 2.3$; +++ – $p < 0.001$, $t = 3.9$ – при межгрупповом сравнении (t -критерий Стьюдента).

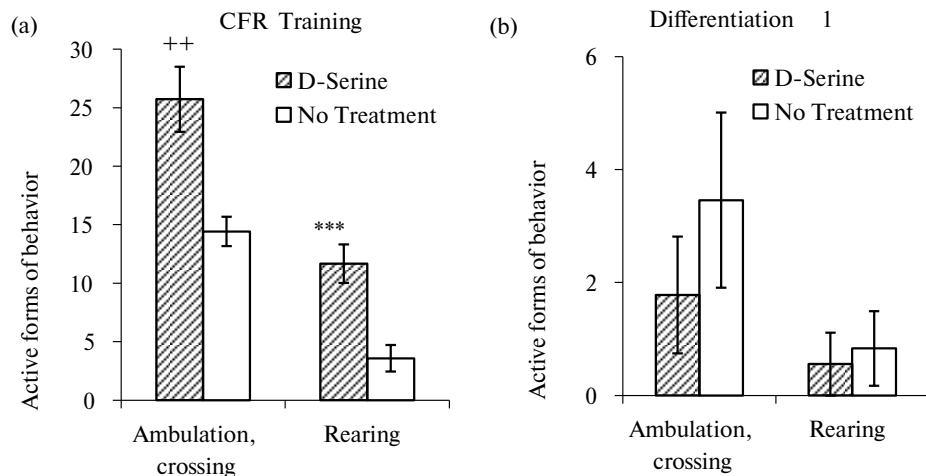


Рис. 5. Увеличение горизонтальной двигательной активности (пересечения), (Ambulation, crossing lines) и числа стоек (Rearing) (а) во время выработки УРС (CFR Training), (б) но не во время дифференцировки 1 (Differentiation 1) у крыс с введением D-серина (D-Serine) в мПК при сравнении с крысами без введения D-серина (No Treatment). ++ – $p = 0.02$ (критерий Манна – Уитни); *** – $p < 0.001$, $t = 4.2$ (t -критерий Стьюдента) – при межгрупповом сравнении. Остальные обозначения, как на рис. 3.

различались между собой по замиранию на CS- (рис. 4а, $t = 0.6$, $p = 0.6$) и в межсигнальных интервалах (рис. 4б, $t = 1.2$, $p = 0.3$).

Сравнение активных форм поведения животных на этапе обучения, отражающих активные попытки избежать болевого раздражения, показало, что у крыс группы «D-серин» во время выработки УРС наблюдалось увеличение горизонтальной двигательной активности и числа стоек (рис. 5а) по сравнению с величиной этих параметров у крыс группы «Без введения». Вместе с тем во время дифференцировки 1 не было обнаружено различий между животными с введением и без введения D-серина в мПК по этим показателям (рис. 5б, $p = 0.51$ и $p = 0.50$ соответственно, критерий Манна – Уитни).

Через сутки после выработки УРС в ходе дифференцировки 2 животные, подвергнутые накануне введению D-серина в мПК, не отличались от крыс группы «Без введения» по замиранию на безопасный CS- (рис. 6а, $t = 1.1$, $p = 0.3$, t -критерий Стьюдента) и в межсигнальных интервалах (рис. 6а, $p = 0.8$, критерий Манна – Уитни). Однако во время тестирования УРС животные группы «D-серин» демонстрировали большее замирание на потенциально опасный CS+ (рис. 6б) и в интервалах между CS+ (рис. 6б) по сравнению с крысами группы «Без введений».

При тестировании в крестообразном лабиринте через сутки после выработки УРС мы не обнаружили достоверных различий между крысами групп «D-серин» и «Без введения» по следующим параметрам: по времени пребывания в закрытых и в открытых рукавах лабиринта (рис. 7а, соответственно $p = 0.45$ и $p = 0.5$); по горизонтальной двигательной активности в закрытых и открытых рукавах лабиринта (рис. 7б, соответственно $p = 0.3$ и $p = 0.5$). У крыс группы «D-серин» наблюдалась тенденция к увеличению числа стоек в закрытых рукавах лабиринта (рис. 7с; $p = 0.06$, критерий Манна – Уитни).

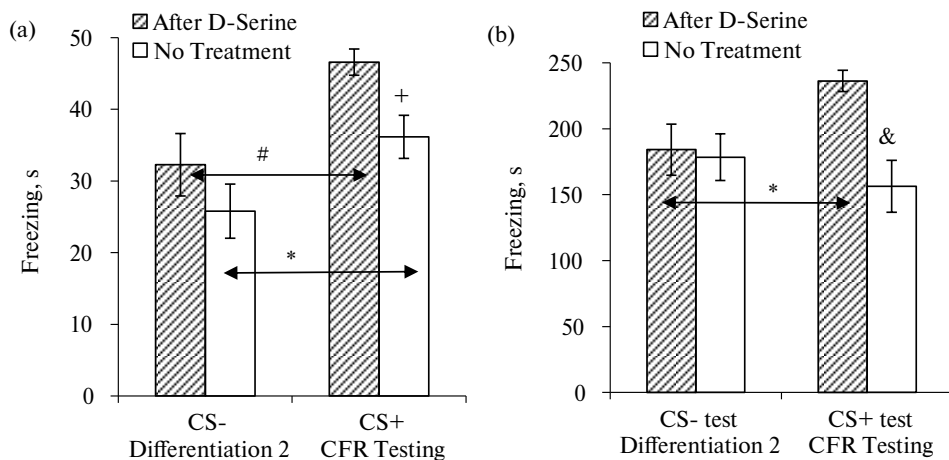


Рис. 6. (а) – Длительность замирания на звуковые сигналы (CS- или CS+, с) и (б) – Длительность замирания в межсигнальных интервалах (CS+ test, CS- test, с) во время дифференцировки 2 (Differentiation 2) и при тестировании УРС (CFR Testing) у крыс, ранее подвергавшихся (After D-Serine) и не подвергавшихся (No Treatment) введению в мПК 1мМ D-серина. Введение D-серина увеличивало замирание на CS+ (+ $p = 0.01$, $t = 2.7$, t -критерий Стьюдента) и в межсигнальных интервалах & $p = 0.004$, (критерий Манна – Уитни) во время тестирования УРС. * $-p < 0.05$, (t -критерий Стьюдента) и # $-p < 0.05$ (критерий Манна – Уитни) – при сравнении между тестами.

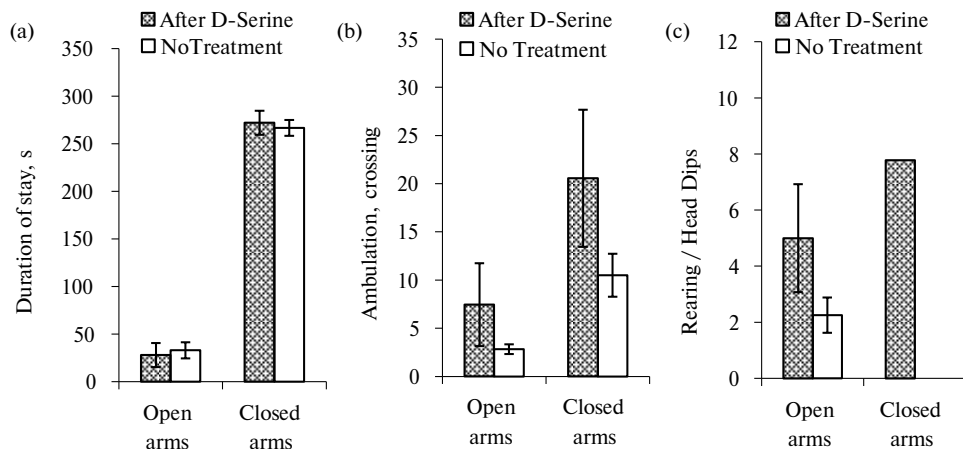


Рис. 7. (а) – Длительность пребывания, с, (b) – Горизонтальная двигательная активность (Ambulation), пересечения, (с) – Стойки/свешивания в открытых (Open arms) и закрытых (Closed arms) рукавах крестообразного лабиринта у крыс, ранее подвергавшихся (After D-Serine) и не подвергавшихся (No Treatment) введению в мПК 1мМ D-серина. Достоверных отличий не найдено, критерий Манна – Уитни.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

NMDA-зависимая нейропластичность играет важную роль в обеспечении функций мПК, в том числе связанных с формированием и регуляцией памяти о страхе [18, 22, 23]. В частности, на крысах продемонстрировано, что активация NMDA-рецепторов мПК после выработки УРС локальным введением NMDA способствует консолидации условнорефлекторного страха обстановки [16], что проявляется в усилении замирания животных (показатель страха) в камере, ранее сочетавшейся с болевым раздражением.

Основным результатом настоящей работы являются данные, впервые показавшие, что стимуляция мПК D-серином, агонистом глицинового сайта NMDA-рецепторов, может вносить весомый вклад в формирование и/или консолидацию памяти о страхе. Об этом свидетельствует тот факт, что введение в мПК во время и после выработки УРС D-серина увеличивает через сутки замирание крыс на условный (CS+) и обстановочный (камера А в интервалах между CS+) сигналы (рис. 6а, б). Этот результат, во-первых, подтверждает данные литературы, продемонстрировавшие, что стимуляция глицинового сайта NMDA-рецепторов мозга циклосерином, частичным агонистом этого сайта, усиливает консолидацию УРС на звуковые и обстановочные сигналы [24]. Во-вторых, он показывает, что влияние такого системного воздействия на NMDA-рецепторы может быть опосредовано D-серин-зависимыми механизмами мПК.

Следует отметить, что показанное в работе влияние D-серина на замирание, вызываемое потенциально опасными стимулами, не является следствием отсроченного действия препарата на подвижность и тревожность животных, так как крысы с введением и без введения D-серина в мПК не различались между собой через сутки по длительности пребывания (рис. 6а) и подвижности (рис. 7б, с) в закрытых и открытых рукавах крестообразного лабиринта, а также по замиранию на безопасные раздражители (CS- и камеру В) во время дифференцировки 2 (рис. 6а, б). Последнее, кроме того, свидетельствует, что D-сериновые механизмы мПК не вносят заметный вклад в генерализацию реакции страха в этих экспериментах.

Вместе с тем в нескольких работах, использующих методы активации и генетического удаления NMDA-рецепторов мПК, показано вовлечение NMDA-зависимых процессов в этой корковой области в генерализацию УРС, проявляющуюся в замирании животных на безопасные сигналы [16, 18]. Сопоставление этих данных с результатами настоящей работы позволяет сделать вывод, что D-сериновый компонент активации NMDA-рецепторов мПК, видимо, в большей степени связан с формированием УРС, в то время как общая активация NMDA-рецепторов мПК важна и для формирования УРС, и для ее генерализации.

Такая избирательность действия D-серина, возможно, вызвана разной функциональной ролью подтипов NMDA-рецепторов [22] в сочетании с их различиями в чувствительности к коагонистам, D-серину и глицину [25]. Об этом свидетельствует следующее. Во-первых, есть данные, что в синаптических (NR2A-содержащих) NMDA-рецепторах в качестве коагониста преимущественно используется D-серин, а в несинаптических (NR2B-содержащих) NMDA-рецепторах – глицин [25]. Во-вторых, продемонстрировано вовлечение NR2A-содержащих, но не NR2B-содержащих NMDA-рецепторов мПК в формирование УРС на обстановочные и на отсроченные звуковые сигналы [22]. Взятые вместе эти литературные данные предполагают возможное участие регулируемых D-серином NMDA-рецепторов мПК в формировании УРС на звуковые и обстановочные стимулы. Результаты настоящей работы, приведенные выше, подтверждают это предположение.

В работе показан ранее неизвестный факт, что выработка УРС на фоне введения D-серина в мПК сопровождается уменьшением замирания животных на CS+ и камеру А во время этого теста с параллельным усилением активных форм поведения (горизонтальная двигательная активность, стойки), отражающих безуспешные попытки животных избежать болевого раздражения (рис. 5а). Причем такие изменения поведения не связаны с общей двигательной активацией животных под действием препарата, поскольку не наблюдаются при дифференцировке 1 (рис. 5б). Этот результат перекликается с литературными данными, что увеличение уровня D-серина в ЦНС мышей в следствии приема D-серина с питьевой водой или в результате усиления экспрессии серин-рацемазы уменьшает периоды неподвижности в тесте «Вынужденное плавание» без изменения двигательной активности в тесте «Открытое поле» [26], то есть мобилизует ресурсы мозга на активные поиски выхода, хотя и в другой поведенческой ситуации. Наши результаты позволяют предположить, что D-сериновые механизмы мПК могут опосредовать эту важную функцию.

Вероятным механизмом, запускающим такие изменения поведения, может быть стимуляция D-серином группы пирамидных нейронов мПК, вовлекаемых, по данным литературы [15], в передачу сигнала о контролируемости стресса ГАМКергическим интернейронам ядер шва и через них – серотониновым нейронам (рис. 8). мПК генерирует такой сигнал в естественных условиях, если животное может избежать или ограничить болевой стресс [15]. Его назначение – затормозить вызываемую стрессом активацию серотониновых нейронов, снизить выброс серотонина в связанных с реакцией на стресс областях мозга, включая мПК [27], и переключить за счет этого стратегию поведения животных с пассивной (замирание) на активную (поиски выхода) [15]. Введение D-серина в мПК может имитировать такой сигнал за счет стимуляции NMDA-рецепторов на пирамидных нейронах этой области, что и вызывает, как мы думаем, перечисленные выше поведенческие и нейрохимические эффекты. А именно, локальное введение D-серина в мПК приводило в наших экспериментах к снижению базального уровня внеклеточного серотонина в этой области и на этом фоне ограничивало его функциональный подъем во время выработки УРС (рис. 3), подавляло пассивные (рис. 4а, б) и усиливало активные (рис. 5а) формы поведения. Следует отметить, что в литературе есть сведения о вовлечении NMDA-рецепторов в тормозную регуляцию базального выброса серотонина в мПК [28]. Значимый результат работы – в ней впервые

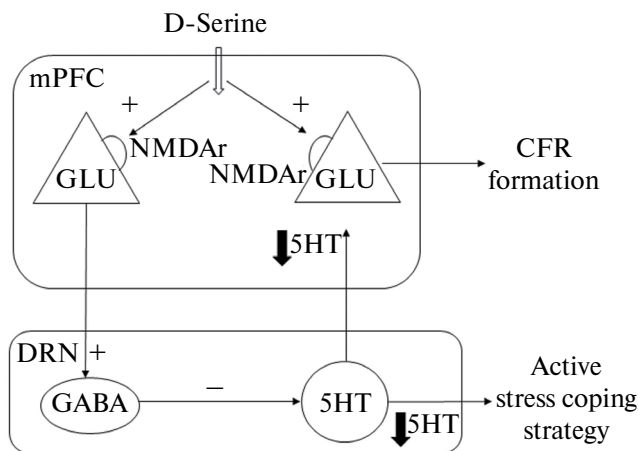


Рис. 8. Предполагаемый механизм влияния D-серина на выброс серотонина в мПК и на поведение животных во время выработки и тестирования УРС, базирующийся на результатах данной статьи и на анализе Maier [15]. mPFC – мПК, DRN – дорсальное ядро шва, GLU – глутамат, GABA – ГАМК, 5HT – серотонин, NMDAr – NMDA-рецептор, CFR formation – выработка УРС, + – активация, – – торможение. Черная стрелка – снижение уровня серотонина в ответ на неизбежный стресс.

продемонстрирована модуляция данной функции NMDA-рецепторов мПК D-серином и показано, что такая модуляция может иметь функциональные последствия, выражающиеся в активизации попыток животного предотвратить болевое раздражение.

Таким образом, полученные в работе новые данные свидетельствуют, что D-сериновая стимуляция мПК в ходе выработки УРС, снижающая выброс серотонина в этой области, усиливает попытки животного избежать болевого раздражения, являющегося неизбежным в данном поведенческом тесте. Это, возможно, усиливает аверсивность болевого подкрепления и, как следствие, приводит к усилению формирования и/или консолидации УРС.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность м.н.с. Надежде Анатольевне Трофимовой за помощь в проведении экспериментов.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Планирование работы (Н. Б. С.), проведение экспериментов (М. А. С., Н. Б. С.), статистическая обработка и анализ данных (Н. Б. С., М. А. С.), написание и редактирование статьи (Н. Б. С., М. А. С.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств федерального бюджета в рамках государственного задания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (№ 1021062411629–7–3.1.4). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по этике Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (протокол № 04/19 от 19.04.2021 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Nishikawa T* (2011) Analysis of free D-serine in mammals and its biological relevance. *J Chromatogr B* 879: 3169–3183.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.08.030>
2. *Umino A, Ishiwata S, Iwama H, Nishikawa T* (2017) Evidence for tonic control by the GABA_A receptor of extracellular D-Serine concentrations in the medial prefrontal cortex of rodents. *Front Mol Neurosci* 10: 271–338.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00240>
3. *Guercio GD, R Panizutti* (2018) Potential and challenges for the clinical use of D-serine as a cognitive enhancer. *Front Psychiatry* 9: 14.
<https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00014>
4. *Wong JM, Folorunso OO, Barragan EV, Berciu C, Harvey TL, Coyle JT, Balu DT, Gray JA* (2020) Postsynaptic Serine Racemase Regulates NMDA Receptor Function. *J Neurosci* 40: 9564–9575.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1525-20.2020>
5. *Abreu DS, Gomes JJ, Ribeiro FF, Diógenes MJ, Sebastião AM, Vaz SH* (2023) Astrocytes control hippocampal synaptic plasticity through the vesicular-dependent release of D-Serine. *Front Cell Neurosci* 17: 1282841.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1282841>
6. *Koh W, Park M, Chun YE, Lee J, Shim HS, Park MG, Kim S, Sa M, Joo J, Kang H, Oh S-J, Woo J, Chun H, Lee SE, Hong J, Feng J, Li Y, Ryu H, Cho J, Lee CJ* (2021) Astrocytes render memory flexible by releasing D-serine and regulating NMDA receptor tone in the hippocampus. *Biol Psychiatry* 91: 740–752.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2021.10.012>
7. *Krishnan KS, Billups B* (2023) ASC Transporters mediate D-serine transport into astrocytes adjacent to synapses in the mouse brain. *Biomolecules* 13: 819.
<https://doi.org/10.3390/biom13050819>
8. *Neame S, Safoory H, Radzishevsky I, Wolosker H* (2019) The NMDA receptor activation by D-serine and glycine is controlled by an astrocytic Phgdh-dependent serine shuttle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116: 20736–20742.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1909458116>
9. *Balu DT, Presti KT, Huang CCY, Muszynski K, Radzishevsky I, Wolosker H, Guffanti G, Ressler KJ, Coyle JT* (2018) Serine racemase and D-serine in the amygdala are dynamically involved in fear learning. *Biol Psychiatry* 83: 273–283.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.08.012>
10. *Inoue R, Ni X, Mori H* (2023) Blockade of D-serine signaling and adult hippocampal neurogenesis attenuates remote contextual fear memory following multiple memory retrievals in male mice. *Front Neurosci* 16: 1030702.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2022.1030702>
11. *Inoue R, Talukdar G, Takao K, Miyakawa T, Mori H* (2018) Dissociated role of D-serine in extinction during consolidation vs. reconsolidation of context conditioned fear. *Front Mol Neurosci* 11: 161.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00161>
12. *Xu W, Sudhof TC* (2013) A neural circuit for memory specificity and generalization. *Science* 339: 1290–1295.
<https://doi.org/10.1126/science.1229534>
13. *Pastor V, Medina JH* (2021) Medial prefrontal cortical control of reward- and aversion-based behavioral output: Bottom-up modulation. *Eur J Neurosci* 53: 3039–3062.
<https://doi.org/10.1111/ejn.15168>

14. *Peyron C, Petit JM, Rampon C, Jouvet M, Luppi PH* (1998) Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. *Neuroscience* 82: 443–468.
[https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00268-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00268-6)
15. *Maier SF* (2015) Behavioral control blunts reactions to contemporaneous and future adverse events: medial prefrontal cortex plasticity and a corticostriatal network. *Neurobiol Stress* 1: 12–22.
<https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2014.09.003>
16. *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>
17. *Heroux NA, Horgan CJ, Stanton ME* (2021) Prefrontal NMDA-receptor antagonism disrupts encoding or consolidation but not retrieval of incidental context learning. *Behav Brain Res* 405: 113175.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113175>
18. *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 Mem* 119: 52–62.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.12.012>
19. *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>
20. *Saul'skaya NB, Sudorgina PV* (2016) Activity of the nitrergic 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>
21. *Saulskaya NB, Susorova MA, Trofimova NA* (2023) Effect of nitric oxide synthase inhibitors on serotonin release in medial prefrontal cortex during conditioned fear response acquisition and generalization in rats. *J Evol Biochem Physiol* 59: 1700–1709.
<https://doi.org/10.1134/S0022093023050204>
22. *Gilmartin MR, Kwapis JL, Helmstetter FJ* (2013) NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in the prelimbic medial prefrontal cortex differentially mediate trace, delay, and contextual fear conditioning. *Learn Mem* 20: 290–294.
<https://doi.org/1101/lm.053894.123>
23. *Chen QY, Li XH, Zhuo M* (2021) NMDA receptors and synaptic plasticity in the anterior cingulate cortex. *Neuropharmacology* 197: 108749.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108749>
24. *Handford CE, Tan S, Lawrence AJ, Kim JH* (2014) The effect of the mGlu5 negative allosteric modulator MTEP and NMDA receptor partial agonist D-cycloserine on Pavlovian conditioned fear. *Int J Neuropsychopharmacol* 17: 1521–1532.
<https://doi.org/10.1017/S1461145714000303>
25. *Papouin T, Ladepêche L, Ruel J, Sacchi S, Labasque M, Hanini M, Groc L, Pollegioni L, Mothet J-P, Oliet SHR* (2012) Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell* 150: 633–664.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.029>
26. *Otte D-M, Barcena de Arellano ML, Bilkei-Gorzo A, Albayram O, Imbeault S, Jeung H, Alferink J, Zimmer A* (2013) Effects of Chronic D-Serine Elevation on Animal Models of Depression and Anxiety-Related Behavior. *Plos One* 8: e67131
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067131>
27. *Bland ST, Hargrave D, Pepin JL, Amat J, Watkins LR, Maier SF* (2003) Stressor controllability modulates stress-induced dopamine and serotonin efflux and morphine-induced serotonin efflux in the medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 28: 589–596.
<https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300206>
28. *Ceglia I, Carli M, Baviera M, Renoldi G, Calcagno E, Invernizzi RW* (2004) The 5-HT_{2A} receptor antagonist M100,907 prevents extracellular glutamate rising in response to NMDA receptor blockade in the mPFC. *Neurochem J* 91: 189–199.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02704.x>

D-Serine Reduces Extracellular Serotonin Level in the Medial Prefrontal Cortex and Enhances the Formation of Fear Response in Rats

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

^aPavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

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

D-serine is an endogenous agonist of the glycine site of NMDA receptors. However, its contribution to the medial prefrontal cortex (mPFC) functions has been little studied. The purpose of the work was to study the involvement of D-serine in the mPFC in the formation and generalization of the conditioned fear response (CFR – a fear model), as well as in the regulation of serotonin release in this area. In Sprague-Dawley rats by means of *in vivo* microdialysis and HPLC analysis, we showed that the intra-mPFC infusion of D-serine (1 mM) reduces the basal level of extracellular serotonin in this area and decreases its rise during CFR acquisition (paired presentation of a conditioned cue (CS+) and inescapable footshock but not during differentiation 1 (presentation of a differentiation cue (CS-) alone). The intra-mPFC D-serine infusion reduced animals' freezing to CS+ (a measure of passive footshock anticipation) during the CFR acquisition and increased ambulation and the number of rearing (attempts to escape footshock). This pharmacological treatment, a day after it, increased animals' freezing to the potentially dangerous CS+, but did not affect freezing to the safe CS-. The data obtained indicate for the first time that, with a decrease in the release of serotonin in the mPFC, stimulation of the mPFC by D-serine enhances the animals' active strategy of avoiding shock and suppresses the passive strategy of anticipating it.

This is accompanied by increased acquisition and/or consolidation of the CFR, but does not affect its generalization.

Keywords: D-serine, NMDA receptors, serotonin release, conditioned fear response, medial prefrontal cortex, *in vivo* intracranial microdialysis