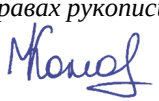
На правах рукописи



КОНОВАЛОВА СОФИЯ ПАВЛОВНА

РОЛЬ СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В РЕГУЛЯЦИИ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ И СЕНСОМОТОРНОЙ РЕОРГАНИЗАЦИИ ПОСЛЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ СПИННОГО МОЗГА

1.5.24. Нейробиология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Федеральная территория «Сириус» – 2026

Работа выполнена в Научном центре генетики и наук о жизни, направление «Нейробиология», автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус»

Научный руководитель: **Мусиенко Павел Евгеньевич,**
доктор медицинских наук

Защита состоится 21 декабря 2026 г. в 10:00 на заседании диссертационного совета НТУ.1.5.24.24 в АНОО ВО «Университет «Сириус» по адресу: 354340, Краснодарский край, федеральная территория «Сириус», Олимпийский пр., д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте АНОО ВО «Университет «Сириус» https://siriusuniversity.ru/sveden/science/obyavleniya-o-zashchitakh

Автореферат разослан «18» ноября 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук  Калинина Д. С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. Травма спинного мозга (ТСМ) остается острой медико-социальной проблемой и одной из ведущих причин стойкой инвалидизации населения. Ежегодно в мире ТСМ получают от 250 до 500 тыс. человек, при этом наиболее высокому риску подвержены молодые люди трудоспособного возраста. Современные стратегии нейрореабилитации повышают качество жизни пострадавших, однако ни один из существующих подходов не обеспечивает полного восстановления утраченных функций, а представления о молекулярных и клеточных механизмах вторичного повреждения остаются ограниченными. По данным литературы, серотонинергическая система играет фундаментальную роль в восстановлении двигательных функций конечностей после травмы, так как повышение или модуляция ее активности в центральной нервной системе (ЦНС) стимулирует нейрогенез и пластические перестройки как в головном (ГМ), так и в спинном мозге (СМ).

Роль серотонинергической системы в физиологии СМ и патогенезе его травматического повреждения изучается несколько десятилетий и к настоящему времени охарактеризована на уровне отдельных механизмов, но целостная картина их взаимодействия остается неполной. Подробно описаны нисходящие серотонинергические проекции из ядер шва, их участие в модуляции возбудимости спинальных мотонейронов и в активации центральных генераторов паттернов, а также двойственная роль 5-HT2C-рецепторов мотонейронов в восстановлении произвольных движений и развитии спастичности. Параллельно детально изучена общая картина нейровоспалительного ответа при ТСМ, включая поляризацию микроглии и макрофагов и формирование глиального рубца. Классическая бинарная модель M1/M2 в последние годы уступает место представлениям о многообразии взаимопереходящих функциональных состояний микроглии, что стимулирует поиск новых маркеров клеточной дисфункции. Одним из таких фенотипов, описанных при старении мозга и нейродегенерации, является липид-нагруженная микроглия, характеризующаяся накоплением липидных капель, сниженной фагоцитарной активностью и усиленной секрецией провоспалительных факторов. На моделях ТСМ этот фенотип начали изучать лишь недавно, а его связь с серотонинергической регуляцией нейровоспаления не рассматривалась.

Использование крыс с нокаутом гена триптофангидроксилазы 2-го типа (TPH2-KO), характеризующихся врождённым изолированным нарушением синтеза серотонина в ЦНС, представляет собой относительно новый методический подход, разработанный и валидированный главным образом для исследования эмоционального и социального поведения. Особенности сенсомоторного восстановления после травмы, а также гистологические и метаболические изменения в очаге повреждения (характер активации микроглии и накопление в ней липидных включений) у таких животных ранее не исследовались. Комплексное исследование, объединяющее анализ

сенсомоторного, нейровоспалительного и метаболического профилей восстановления в условиях врожденного дефицита серотонина, до настоящего времени не проводилось, что определяет актуальность и научную новизну настоящей работы.

Цель и задачи исследования. Цель настоящего исследования заключается в изучении роли серотонинергических механизмов в регуляции нейровоспалительных процессов и структурно-функциональной реорганизации сенсомоторной системы после повреждения СМ.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Охарактеризовать фенотип взрослых самцов и самок крыс с нокаутом гена *Tph2* для выявления различий в сенсомоторном контроле, обусловленных дефицитом центрального серотонина.

2. Изучить динамику изменения сенсомоторных функций крыс TPH2-KO обоего пола после ТСМ.

3. Исследовать влияние центрального серотонина на процессы нейровоспаления в очаге повреждения спинного мозга после ТСМ у крыс обоего пола.

4. Оценить процессы нейровоспаления в головном мозге у TPH2-KO крыс обоего пола после ТСМ.

5. Выявить особенности нейрогенеза у самцов TPH2-KO крыс после ТСМ.

Научная новизна исследования. Для изучения роли серотонинергической системы в функциональном восстановлении после ТСМ впервые использованы крысы с нокаутом гена *Tph2*. Эта модель обеспечивает врожденный изолированный дефицит центрального серотонина без затрагивания его периферического пула и позволяет изучать серотонинергическую модуляцию восстановления в условиях, принципиально отличных от острой фармакологической или нейротоксической деплеции серотонина, применявшейся в большинстве предшествующих работ.

Впервые в рамках единого экспериментального дизайна проведена комплексная оценка последствий ТСМ у животных с дефицитом серотонина, объединяющая динамику восстановления сенсомоторных функций, а также нейровоспалительные и нейропластические изменения в спинном и головном мозге. Нейровоспалительные изменения и восстановление проанализированы раздельно для самок и самцов, что позволило выделить как общие для обоих полов, так и половые особенности влияния дефицита серотонина.

Впервые исследован метаболический профиль микроглии в очаге ТСМ в условиях генетического дефицита серотонина, в частности накопление в ней липидных включений. Данный феномен, описанный для стареющего и нейродегенерирующего мозга как маркер дисфункционального провоспалительного состояния клетки, ранее не рассматривался во взаимосвязи с серотонинергической регуляцией нейровоспаления при ТСМ.

Полученные данные позволили впервые оценить, является ли характер иммуногистохимических изменений в очаге повреждения (активация микроглии, накопление липидов, экспрессия провоспалительных маркеров)

прогностически значимым в контексте серотонинергической регуляции, что создает основу для последующего поиска клеточных и молекулярных биомаркеров тяжести и прогноза восстановления после ТСМ.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость работы заключается в расширении фундаментальных представлений о роли серотонинергической системы как связующего звена между ключевыми составляющими последствий ТСМ (сенсомоторным дефицитом, системным нейровоспалительным ответом), которые в существующей литературе, как правило, рассматриваются изолированно друг от друга. Полученные данные о взаимосвязи между дефицитом центрального серотонина и метаболическим состоянием микроглии в очаге повреждения, в частности накоплением в ней липидных включений, расширяют современные представления о клеточных механизмах вторичного повреждения СМ и о роли нейромедиаторной регуляции в формировании провоспалительного или репаративного фенотипа глиальных клеток.

Практическая значимость определяется обоснованием патогенетически ориентированных подходов к терапии ТСМ. Полученные данные указывают на связь дефицита серотонинергической передачи с усилением нейровоспаления и ухудшением функциональных исходов, что открывает перспективу применения препаратов, повышающих содержание серотонина в ЦНС (предшественники синтеза, СИОЗС, агонисты рецепторов 5-HT2C и 5-HT7), в качестве адъювантной терапии отдельно или в сочетании с реабилитационными методами (локомоторные тренировки, эпидуральная и чрескожная стимуляция). Установленная связь между серотонинергическим статусом и паттернами активации микроглии (включая накопление липидных включений) создает основу для использования гистологических, а в дальнейшем визуализационных и биохимических маркеров для оценки тяжести нейровоспаления и прогноза восстановления.

Методология и методы исследования. Экспериментальные вмешательства выполняли в соответствии с Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета от 22 сентября 2010 г. и Правилами надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств (Решение ЕврАзЭС от 03.11.2016 № 81). Протоколы экспериментов с животными прошли обязательную этическую экспертизу и получили официальное одобрение Комитета по этике Санкт-Петербургского государственного университета, что подтверждается заключением № 131-03-4 от 03.04.2023.

Исследование выполнено на крысах линии Dark Agouti (TPH2-KO и WT) с моделированием левосторонней латеральной гемисекции СМ на уровне Th8. Локомоторную функцию оценивали методами кинематического анализа походки (MotoRater), теста «Горизонтальная лесенка», динамометрии и балльной шкалы восстановления; сенсорную функцию – в тестах «Горячая пластина» и «Холодная пластина». Нейровоспалительные и нейропластические изменения в СМ и ГМ оценивали с помощью

иммуногистохимического окрашивания. Полученные препараты исследовали методом световой и конфокальной микроскопии.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Дефицит центрального серотонина приводит к снижению скорости восстановления после спинальной травмы. Одним из ключевых патогенетических механизмов этого является измененная микроглиальная реакция в очаге повреждения спинного мозга, нарушение элиминации продуктов деградации миелина, что создает неблагоприятную среду для компенсаторных нейропластических процессов.
2. Системное нейровоспаление в головном мозге при серотониновом дефиците сопровождается сниженным нейрогенезом в гиппокампе, что усугубляет нарушения адаптивных механизмов сенсомоторной реорганизации после повреждения спинного мозга.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационное исследование соответствует паспорту научной специальности 1.5.24. Нейробиология (биологические науки). Соответствие областям исследования подтверждается результатами работы по направлениям: 3 – нейроглия, механизмы нейро-глиальных взаимодействий; 11 – двигательные (эффекторные) системы в нормальном и экстремальных состояниях.

Степень достоверности результатов исследования. Достоверность результатов основывается на достаточном объеме выборки, использовании современных методов исследования, корректной обработке и статистическом анализе данных с применением современного программного обеспечения. Результаты получены в полном соответствии с протоколами исследований, выводы базируются на экспериментальных данных, приведенных в виде иллюстраций, включающих графики и фотографии. Достоверность подтверждается публикацией работ в рецензируемых российских и зарубежных научных изданиях.

Личный вклад автора. Личный вклад соискателя включал получение экспериментальных данных, их статистический анализ, обобщение результатов и формулирование выводов исследования. Автор подготовил научные публикации по материалам диссертации и выступил с докладами о результатах работы на специализированных научных конференциях.

Апробация материалов диссертации. Результаты работы были представлены на X Российской конференции с международным участием «Управление движением», VII Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 100-летию Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, XXV съезде Физиологического общества им. И.П. Павлова, XIII Российском форуме биотехнологий OpenBio-2026.

Публикации по теме диссертации. По теме диссертации опубликовано 3 научные статьи в журналах, входящих в Scopus/Web of Science, а также в список, рекомендованный ВАК «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные

научные результаты диссертации на соискание ученой степени доктора и кандидата наук».

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, глав «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты» и «Обсуждение», заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и 4 приложений. Работа изложена на 165 страницах без учета приложений, иллюстрирована 36 рисунками и 2 таблицами. Список литературы содержит 303 наименования на английском языке.

Финансовая поддержка работы. Работа поддержана грантом в рамках государственной программы федеральной территории «Сириус» «Научно-технологическое развитие федеральной территории «Сириус»» (Соглашение № 18-03 от 10 сентября 2024 г.).

Благодарности. Автор приносит благодарность научному руководителю Павлу Евгеньевичу Мусиенко за чуткое руководство, ценные рекомендации и внимательность на всех этапах подготовки диссертации. Особая признательность выражается Юрию Игоревичу Сысоеву за помощь и поддержку в реализации методов исследования и совместную работу. Автор благодарит Валерию Сергеевну Штоль, Дарью Дмитриевну Щиц, Кирилла Андреевича Арсентьева и Анну Ветлугину за плодотворную совместную работу, ценный вклад и поддержку в подготовке диссертации.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Животные. Исследование выполнено на крысах линии Dark Agouti в возрасте 12–16 месяцев и массой 150–250 г, которых содержали в стандартных условиях вивария (22 °C, 12-часовой световой цикл, свободный доступ к корму и воде). В экспериментах использовали самцов (TPH2-KO – 12, WT – 9) и самок (TPH2-KO – 11, WT – 15). Пилотное исследование выполнено на самцах крыс линии Wistar (группы TCM и SHAM). Генотипирование проводили методом ПЦР с рестрикцией эндонуклеазой Mln1. Общая схема эксперимента и методов оценки представлена на рисунке 1.

Моделирование ТСМ. Левостороннюю латеральную гемисекцию СМ на уровне Th8 выполняли под общей анестезией (Золетил 100, 60 мг/кг, и ксилазин, 2 мг/кг) после резекции дуги позвонка с помощью металлического направителя и микроскальпеля. В пилотном исследовании на крысах Wistar для контроля влияния хирургического вмешательства дополнительно использовали ложнооперированную группу (SHAM) с ламинэктомией без повреждения СМ. В послеоперационном периоде проводили обезболивание (кеторолак), профилактику инфекций мочевыводящих путей (энрофлоксацин) и ручное опорожнение мочевого пузыря до восстановления произвольного мочеиспускания.

Кинематический анализ локомоции. Ходьбу регистрировали системой MotoRater (TSE Systems, Германия) в двух проекциях (сбоку и снизу) с

частотой 100 кадров в секунду; для анализа отбирали по 15 последовательных локомоторных циклов от каждого животного. Анализировали 88 показателей: углы, угловые скорости и ускорения в суставах задней конечности в фазах E3 (отрыв пальцев), F (максимальное сгибание) и E1 (контакт пальцев с опорой), высоты суставных точек, ретракцию и протракцию, длительности фаз и цикла шага, длину шага, межконечностную координацию, скорость локомоции и коэффициенты корреляции высот суставов внутри одной конечности. Структуру данных описывали методом главных компонент (МГК).

Тест «Горизонтальная лесенка». Моторно-координационную функцию оценивали в системе MotoRater на лесенке длиной 170 см с расстоянием между перекладинами 1 см. Регистрировали число шагов, ошибок и соскальзываний и рассчитывали сенсомоторный дефицит (SD) по формуле: SD (%) = (N ошибок + 0,5 × N соскальзываний) / N шагов × 100.

Сенсорная функция, сила хвата и балльная шкала. Температурную чувствительность оценивали в тестах «Горячая пластина» (+48 °C) и «Холодная пластина» (+4 °C) по латентному периоду реакции в течение 60 с (Cold/Hot Plate, Bioseb, Франция). Силу хвата передних конечностей измеряли динамометром Grip Strength Meter (TSE Systems, Германия). Восстановление тонуса, произвольных движений, состояния мочевого пузыря и характера мочи оценивали ежедневно в течение 28 дней по балльной шкале.

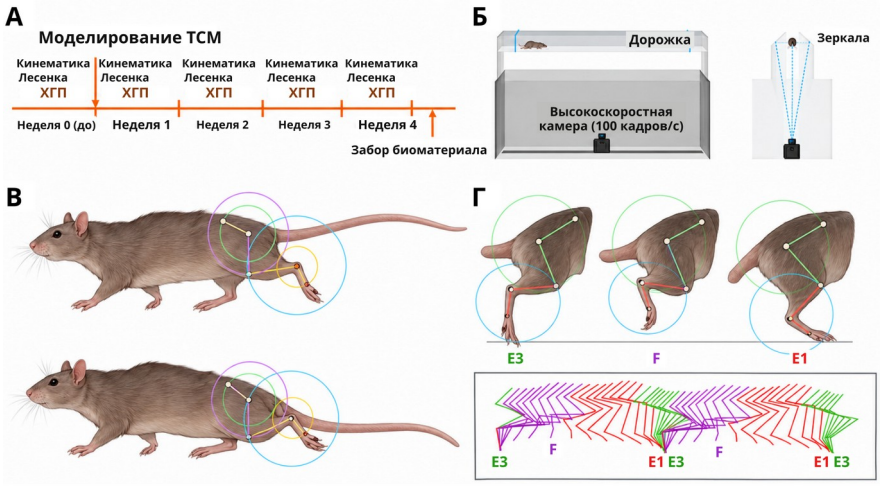


Рис. 1. Схема проведения эксперимента. ХГП – холодная/горячая пластина; система кинематического анализа MotoRater с высокоскоростной камерой (100 кадров/с), дорожкой с прозрачным дном и зеркалами; локомоторные фазы E3, F и E1 и стик-диаграмма двух локомоторных циклов.

Иммуногистохимия. Для мечения пролиферирующих клеток в гиппокампе вводили 5-бром-2'-дезоксиуридин (BrdU, 50 мг/кг) в течение 3 дней после операции. Животных перфузировали 4 % параформальдегидом; из СМ готовили поперечные криосрезы толщиной 10–20 мкм, ГМ нарезали на вибратоме (свободно плавающие срезы 50 мкм). Степень повреждения СМ

оценивали на срезах, окрашенных толуидиновым синим по Нисслю; липидные включения выявляли Нильским красным. Определяли маркеры микроглии/макрофагов (Iba-1), астроглии (GFAP, S100β), фагоцитарной активности (CD68), провоспалительные маркеры (iNOS, TNF-α), липидные включения (Nile Red) и BrdU-позитивные клетки. Препараты, окрашенные по Нисслю, анализировали на световом микроскопе ZEISS Axio ScopeA1, флуоресцентные – на конфокальном микроскопе ZEISS LSM 980 Airyscan; долю площади позитивного сигнала в области интереса (СМ; поля CA1, CA3 и зубчатая извилина гиппокампа) определяли в программе Fiji оператором, не знавшим о группах образцов.

Статистический анализ. Обработку проводили в Python (SciPy, statsmodels) и GraphPad Prism 10; данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего (SEM). Дооперационные показатели анализировали двухфакторным дисперсионным анализом (генотип × пол) с апостериорным тестом Сидака, динамику после ТСМ – линейной смешанной моделью (генотип × неделя), валидацию повреждения и иммуногистохимические показатели – U-критерием Манна–Уитни.

Результаты исследования

Сенсомоторный фенотип интактных животных. Метод главных компонент, примененный к 88 кинематическим показателям до операции (n = 38; WT♂ = 6, TPH2-KO♂ = 6, WT♀ = 15, TPH2-KO♀ = 11), выделил четыре компоненты (рисунок 2). PC1 (29,6 % дисперсии) формировалась пространственно-временными характеристиками локомоции и длиной шага; PC2 (20,1 %) – межсуставными корреляциями, отражающими внутриконечностную координацию; PC3 (13,6 %) – углами суставов, угловыми скоростями и ускорениями; PC4 (6,9 %) – постуральными параметрами.

По PC1 выявлено значимое влияние генотипа ($F(1,34) = 18,64$; $p = 0,001$) и пола ($F(1,34) = 15,17$; $p = 0,004$). Значения PC1 были выше у самок WT, чем у самцов WT и самок TPH2-KO ($p < 0,01$ и $p < 0,0001$). Средняя скорость локомоции была выше у самцов WT и самок TPH2-KO по сравнению с самками WT ($p < 0,001$ и $p < 0,0001$), а у самцов TPH2-KO – выше, чем у самцов WT и самок TPH2-KO ($p < 0,01$). У самок TPH2-KO цикл шага и фаза опоры были короче, чем у самок WT ($p < 0,0001$). По PC2 выявлены влияние генотипа ($F(1,34) = 21,96$; $p < 0,0001$) и взаимодействие «генотип × пол» ($F(1,34) = 6,30$; $p = 0,017$): значения были ниже у самцов WT по сравнению с самцами TPH2-KO и самками WT ($p < 0,001$ и $p < 0,05$). По PC3 и PC4 выявлено влияние пола ($F(1,34) = 14,93$; $p < 0,0005$ и $F(1,34) = 11,39$; $p = 0,0019$) без влияния генотипа.

Повышенная скорость локомоции является одной из ключевых особенностей крыс TPH2-KO. Для оценки ее вклада в кинематические различия проведен ковариационный анализ (ANCOVA) со скоростью в качестве ковариаты. После поправки на скорость различия между генотипами исчезли для длительностей фаз переноса и опоры, углов тазобедренного

сустава в точках E3, F и E1, величины ретракции, высоты тазобедренного сустава и подвздошного гребня и ряда показателей внутриконечностной координации. Единственным показателем, различие по которому сохранилось, была корреляция траекторий подвздошного гребня и голеностопного сустава в фазе разгибания у самцов ($F(1,34) = 8,196$; $p < 0,01$): у самцов TPH2-KO она выше, чем у самцов WT.

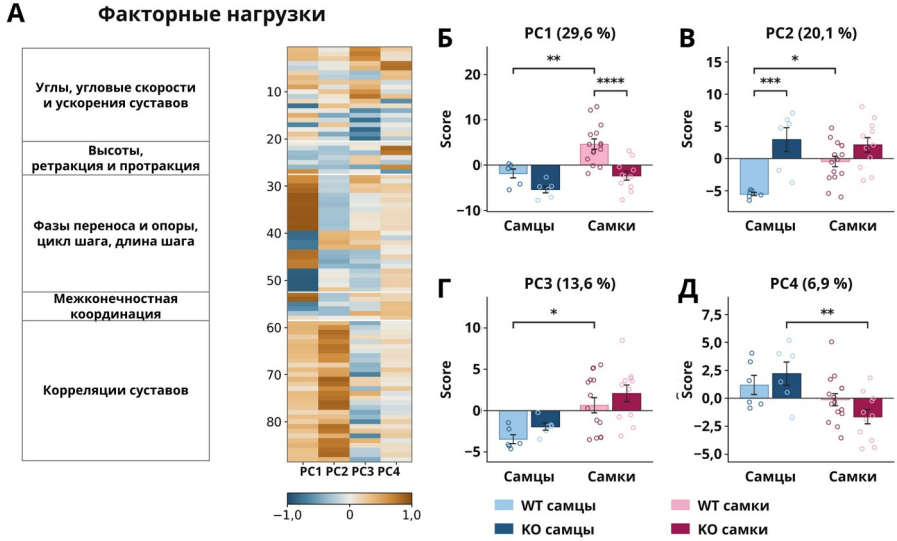


*Рис. 2. Метод главных компонент для кинематических характеристик локомоции крыс до операции. (А) Факторные нагрузки 88 кинематических показателей на компоненты PC1–PC4. (Б–Д) Значения PC1 (Б), PC2 (В), PC3 (Г) и PC4 (Д) у самцов и самок WT и TPH2-KO. Данные: среднее ± SEM, точки – индивидуальные значения. n: WT♂ = 6, TPH2-KO♂ = 6, WT♀ = 15, TPH2-KO♀ = 11. Двухфакторный ANOVA (генотип × пол) + пост-хок тест Сидака, * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.*

Масса тела, длины тазовой кости, бедра, голени и площадь стопы зависели главным образом от пола ($p < 0,0001$); длины костных сегментов тесно коррелировали с массой тела ($R = 0,58–0,86$; $p \leq 0,0001$), что подтверждает корректность размещения кинематических маркеров. В тесте «Горизонтальная лесенка» выявлен лишь общий эффект генотипа для передних конечностей ($F(1,43) = 10,30$; $p = 0,0025$) без значимых попарных различий. Латентные периоды реакции в тестах «Горячая пластина» и «Холодная пластина» не различались между генотипами; в тесте «Горячая пластина» выявлено влияние пола ($F(1,42) = 7,10$; $p = 0,011$). Сила хвата внутри каждого пола не зависела от генотипа при выраженном половом диморфизме (влияние пола $p < 0,0001$).

Таким образом, нокаут *Tph2* не приводит к грубым нарушениям локомоции, чувствительности и мышечной силы, но изменяет показатели, связанные со скоростью ходьбы и изменениями внутриконечностной координации у самцов.

Восстановление сенсомоторных функций после гемисекции. Для валидации модели каждый участок СМ, окрашенный по Нисслю (рисунок 3, А), делили на 8 квадрантов (рисунок 3, В) и оценивали повреждение в каждом квадранте по 4-балльной шкале в зависимости от доли пораженной зоны: 0 баллов – повреждения отсутствуют, 1 – повреждена меньшая часть зоны, 2 – большая часть зоны, 3 – вся зона (рисунок 3, Г). Суммарный балл на стороне воздействия значимо превышал значение на противоположной стороне в обеих группах (WT: 11,0 против 1,0; $p = 0{,}004$; TPH2-KO: 8,0 против 2,0; $p = 0{,}016$). Индекс латерализации ($p = 0{,}121$) и суммарные баллы ($p > 0{,}4$) не различались между генотипами, т.е. тяжесть травмы была сопоставимой. Гемисекция приводила к утрате тонуса и движений задних лап с постепенным неполным восстановлением в течение 4 недель; достоверных различий между генотипами по балльной шкале не получено.

После травмы МГК рассчитывали заново для каждого пола по всем временным точкам, так как структура ковариаций показателей изменилась. У самок (n: WT = 12, TPH2-KO = 9) PC1 (длина шага передних конечностей, относительные длительности фаз опоры и переноса) зависела от генотипа ($F(1; 23{,}1) = 13{,}34$; $p = 0{,}0013$) и недели ($p < 0{,}0001$) и была ниже у TPH2-KO на 2–4-й неделях ($p = 0{,}010$; 0,021; 0,009). PC2 (корреляции суставов, внутриконечностная координация) у самок WT не отклонялась от исходного уровня, тогда как у самок TPH2-KO выросла на 3-й и 4-й неделях ($p = 0{,}0034$; 0,0024); межгрупповые различия также проявились на 3-й и 4-й неделях ($p = 0{,}0001$; 0,0017), взаимодействие «генотип × неделя» значимо ($F(4; 60{,}9) = 3{,}13$; $p = 0{,}021$). PC3 (угловые параметры плюснефалангового сустава в фазах F и E3, высота подвздошного гребня и тазобедренного сустава) резко возрастала на 1-й неделе в обеих группах, а начиная со 2-й недели оставалась выше у TPH2-KO ($p = 0{,}033$; 0,019; 0,0033). Для PC4 выявлено только влияние недели (рисунок 4).

У самцов (n: WT = 9, TPH2-KO = 8) PC1 зависела от генотипа ($F(1; 15{,}4) = 6{,}14$; $p = 0{,}025$) и недели; на 1-й неделе значения у TPH2-KO были ниже ($p = 0{,}0041$). PC2 (корреляции суставов в фазах опоры и разгибания) была выше у самцов TPH2-KO до операции ($p = 0{,}0012$) и на 2–4-й неделях ($p = 0{,}0059$; 0,0070; 0,0006), т.е. отражала исходные различия, а не динамику восстановления. Для PC3 и PC4 выявлено только влияние недели. Среди отдельных показателей влияние недели значимо для 69 показателей у самок и 58 у самцов, влияние генотипа – для 34 и 37, взаимодействие «генотип × неделя» – для 11 и 18 показателей соответственно.

В тесте «Горизонтальная лесенка» сенсомоторный дефицит поврежденной (левой) задней конечности у самок зависел от генотипа ($F(1; 17{,}4) = 6{,}46$; $p = 0{,}021$), недели ($F(4; 65{,}1) = 40{,}10$; $p < 0{,}0001$) и их взаимодействия ($F(4; 65{,}1) = 3{,}56$; $p = 0{,}011$). До операции дефицит отсутствовал; на 1-й неделе он был сопоставим (71,0 ± 5,4 % у WT и 64,2 ± 6,5 % у TPH2-KO). У самок WT он последовательно снижался до 36,2; 26,6 и 21,9 % на 2–4-й неделях, у самок TPH2-KO – существенно медленнее (60,3; 50,3 и 47,1 %); различия между генотипами значимы на всех трех сроках ($p < 0{,}01$;

рисунок 5). У самцов значимым было только влияние недели ($F(4; 51,6) = 22,02$; $p < 0,0001$): дефицит на 1-й неделе составил 41,3 ± 12,8 % у WT и 41,2 ± 6,9 % у TPH2-KO, к 4-й неделе – 7,3 и 12,0 % соответственно без межгрупповых различий. На интактной (правой) конечности у обоих полов значимым было только влияние недели.

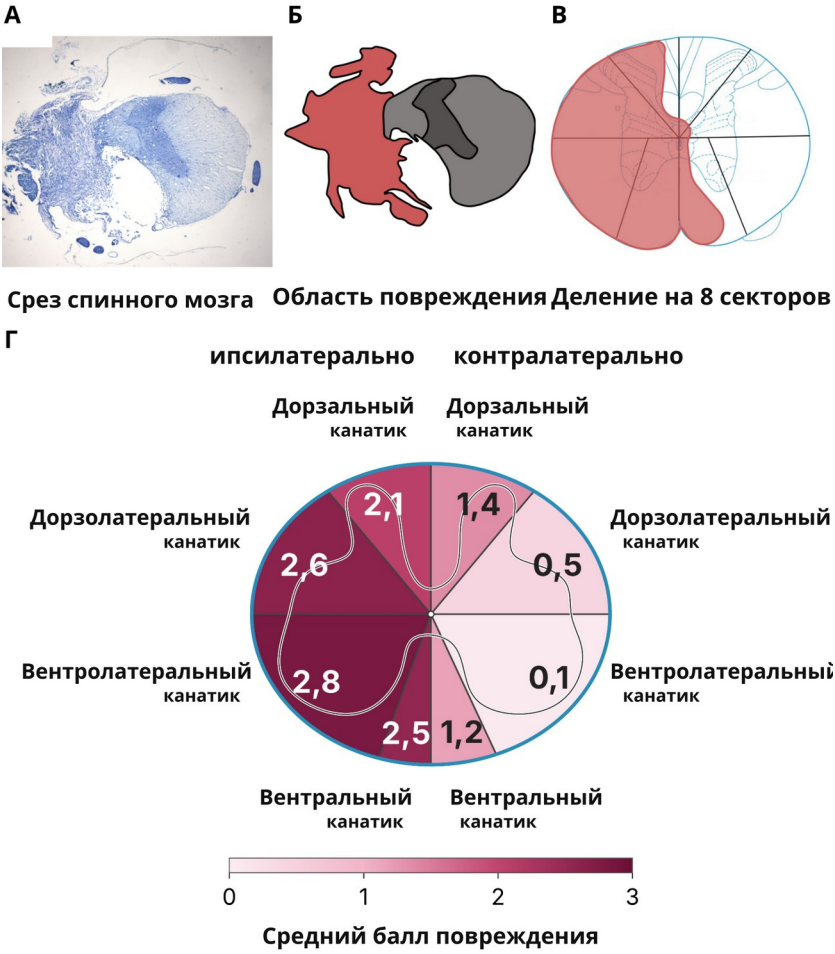


Рис. 3. Оценка степени повреждения спинного мозга по квадрантам. (А) Репрезентативный срез спинного мозга в области повреждения, окраска толуидиновым синим по Нисслю; (Б) контуры очага повреждения (красный) и сохранной ткани (серый); (В) схема поперечного среза, разделенного на 8 квадрантов, с наложением области повреждения; (Г) средний балл повреждения в каждом квадранте на ипсилатеральной (левой) и контралатеральной сторонах. Степень повреждения оценивали по шкале от 0 до 3 баллов: 0 – повреждения отсутствуют, 1 – повреждена меньшая часть зоны, 2 – большая часть зоны, 3 – вся зона; интенсивность окраски соответствует среднему баллу.

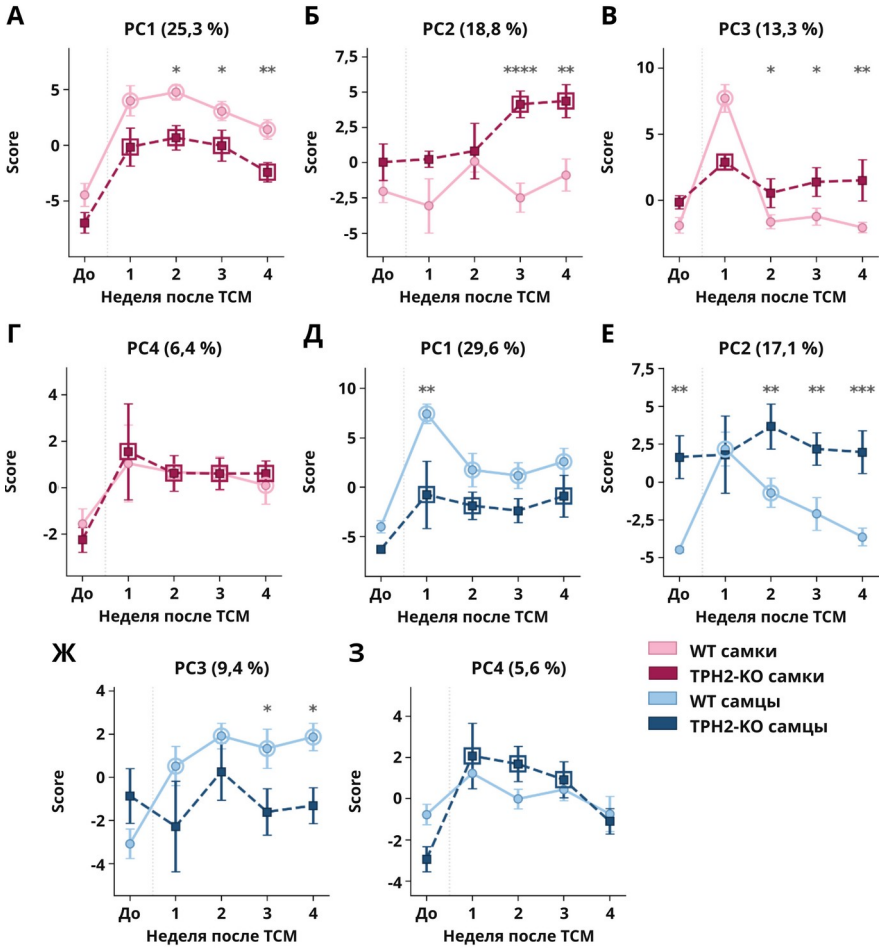


*Рис. 4. Динамика значений главных компонент локомоции после ТСМ у самок (А–Г) и самцов (Д–З). (А, Д) PC1; (Б, Е) PC2; (В, Ж) PC3; (Г, З) PC4. Компоненты рассчитаны отдельно для каждого пола по совокупности всех временных точек; доля объясненной дисперсии указана в заголовке каждой панели. Смешанная модель (генотип × неделя) с поправкой степеней свободы по Кенворду–Роджеру. n: WT♂ = 9, ТРН2-КО♂ = 8, WT♀ = 12, ТРН2-КО♀ = 9. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.*

Динамика температурной чувствительности после ТСМ определялась сроком наблюдения у обоих полов, но не генотипом: латентный период реакции возрастал в течение 1–2 недель (снижение болевой чувствительности в острой фазе), к 3-й неделе снижался ниже дооперационного уровня и к 4-й неделе нормализовался, что наиболее выражено у самок. Таким образом, постоянный дефицит центрального серотонина замедляет восстановление функции поврежденной конечности, причем этот эффект хорошо различим

только у самок; у самцов восстановление по лесенке не зависит от генотипа, а различия по МГК отражают в основном исходную организацию координации.

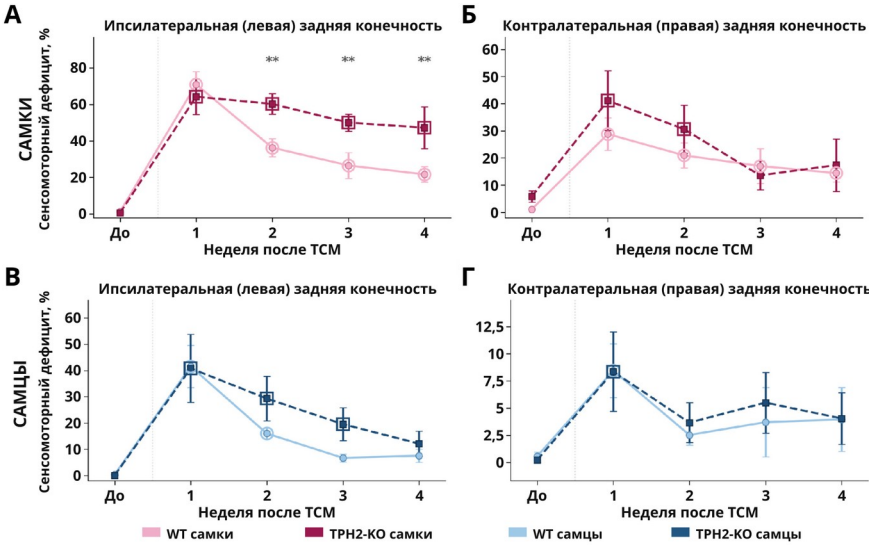


*Рис. 5. Динамика сенсомоторного дефицита в тесте «Горизонтальная лесенка» после ТСМ у самок (А, Б) и самцов (В, Г). (А, В) Поврежденная (левая) задняя конечность; (Б, Г) интактная (правая) задняя конечность. SD (%) = (N ошибок + 0,5 × N соскальзываний) / N шагов × 100. Данные: среднее ± SEM. Самки: WT n = 11, TPH2-KO n = 8; самцы: WT n = 9, TPH2-KO n = 8. ** p < 0,01.*

Нейровоспаление в очаге повреждения СМ. Данные самок и самцов анализировали раздельно. Площадь, занятая Iba-1-позитивными клетками (микроглия и инфильтрирующие макрофаги), и площадь GFAP-позитивного окрашивания (реактивный астроглиоз) не различались между генотипами ни у самок (Iba-1: 6,57 ± 0,64 % у WT и 8,01 ± 0,75 % у TPH2-KO, p = 0,165; GFAP: 18,21 ± 1,25 % и 22,56 ± 2,36 %, p = 0,132), ни у самцов (Iba-1: 7,89 ± 0,85 % и 7,51 ± 0,54 %, p = 0,711; GFAP: 21,26 ± 1,87 % и 21,54 ± 4,25 %, p = 0,953). У самок TPH2-KO отмечена лишь не достигшая значимости тенденция к более высоким значениям обоих маркеров.

Маркеры функциональной активации были повышены у TPH2-KO обоего пола (рисунки 6, 7). Площадь CD68, маркера фагоцитарной активности, была выше у самок в 1,5 раза (7,34 ± 0,45 % против 4,92 ± 0,48 %; p = 0,002) и у самцов в 2,2 раза (8,54 ± 0,74 % против 3,85 ± 1,21 %; p = 0,005). Накопление липидных включений (Nile Red) возрастало у самок с 0,69 ± 0,19 до 1,81 ± 0,17 % и у самцов с 1,02 ± 0,25 до 2,54 ± 0,24 % (p < 0,001 в обоих случаях). Площадь TNF-α увеличилась у самок в 1,5 раза (6,01 ± 0,39 % против 4,00 ± 0,30 %; p = 0,001) и у самцов в 1,9 раза (7,24 ± 1,24 % против 3,85 ± 0,25 %; p = 0,029), площадь iNOS – более чем вдвое у самок (10,88 ± 0,54 % против 5,10 ± 0,48 %; p < 0,001) и почти вдвое у самцов (12,45 ± 1,24 % против 6,58 ± 1,23 %; p = 0,004).

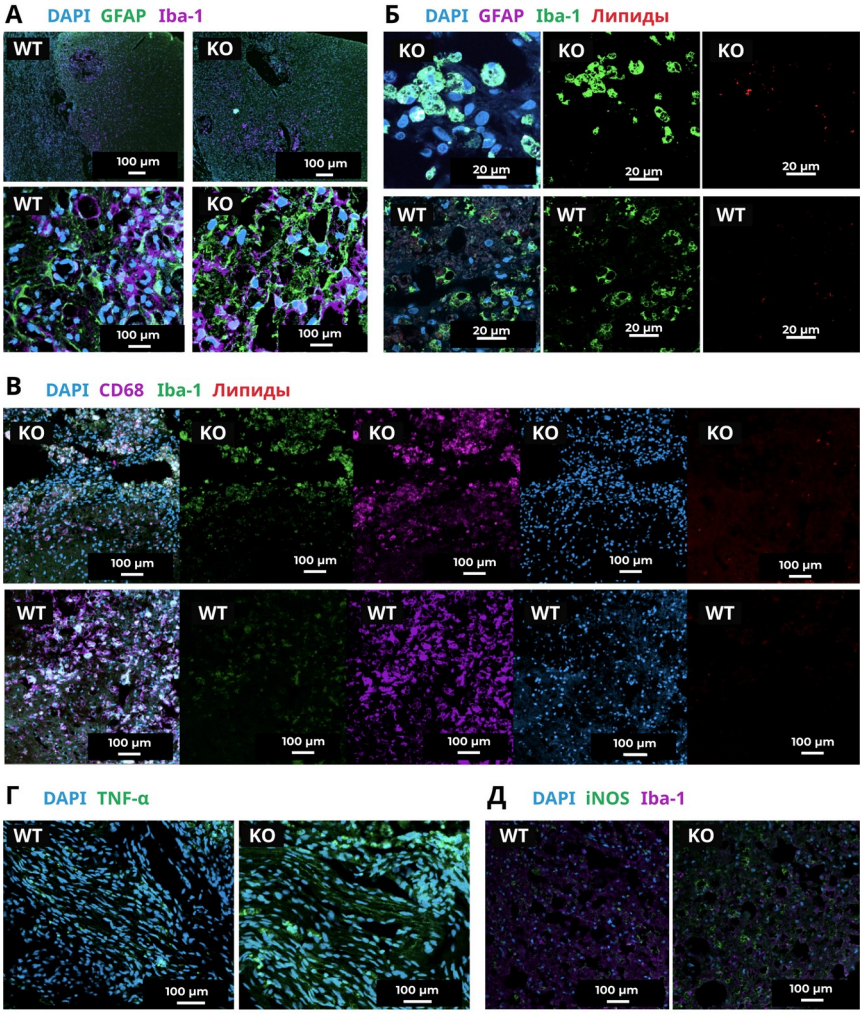


Рис. 6. Репрезентативные фотографии комбинированного окрашивания срезов СМ на маркеры: (А) астроглии (GFAP) и микроглии (Iba-1); (Б) GFAP, Iba-1 и липидных включений (Nile Red); (В) CD68, Iba-1 и липидных включений (Nile Red); (Г) TNF-α; (Д) iNOS и Iba-1. Масштабная линейка 100 мкм, на (Б) – 20 мкм. WT – дикий тип, KO – нокаутные животные.

Таким образом, у TPH2-KO обоего пола в очаге повреждения не меняется число микроглиальных и астроглиальных клеток (по площади Iba-1 и GFAP), но возрастает фагоцитарная активность микроглии, накапливаются липидные включения и повышаются маркеры провоспалительных медиаторов (iNOS и TNF-α). Поскольку площадь, занятая Iba-1-позитивными клетками, при этом не менялась, повышение CD68 отражает, вероятно, не пролиферацию или миграцию микроглии, а изменение ее функционального состояния. Эти

данные согласуются с представлением о нарушении переработки продуктов распада миелина и о формировании неблагоприятного воспалительного микроокружения при дефиците серотонина.

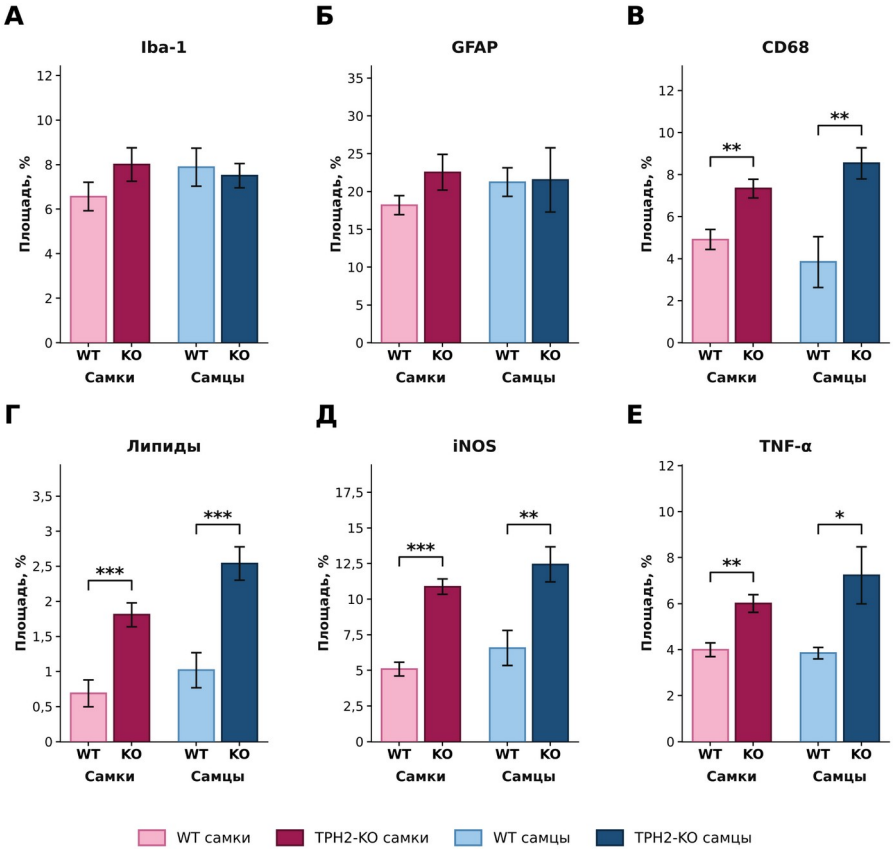


*Рис. 7. Иммуногистохимическая оценка маркеров нейровоспаления и липидных включений в очаге повреждения СМ у животных WT и TPH2-KO. Площадь иммунопозитивного материала (Area, %) для Iba-1, GFAP, CD68, липидных включений, iNOS и TNF-α. U-критерий Манна–Уитни; n: WT♂ = 9, TPH2-KO♂ = 8, WT♀ = 12, TPH2-KO♀ = 9, * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.*

Нейровоспаление и нейрогенез в гиппокампе. В гиппокампе площадь Iba-1 в поле CA1 не различалась между генотипами (самки: 8,87 ± 1,23 % у TPH2-KO и 9,85 ± 1,25 % у WT, p = 0,584; самцы: 10,25 ± 0,98 % и 9,08 ± 2,36 %, p = 0,655). В поле CA3 у самок TPH2-KO площадь Iba-1 была выше в 1,8 раза (9,85 ± 1,24 % против 5,52 ± 1,24 %; p = 0,025); у самцов различия (11,21 ± 2,65 % против 4,98 ± 2,54 %) значимости не достигли (p = 0,110) на фоне высокой вариабельности. В зубчатой извилине площадь Iba-1 у TPH2-KO была выше у обоих полов: у самок 12,85 ± 0,25 % против 7,89 ± 1,25 % (p = 0,003), у самцов 15,85 ± 1,24 % против 8,74 ± 2,24 % (p = 0,015), т.е. в 1,6 и 1,8 раза (рисунок 8).

По маркерам астроглии GFAP и S100β значимых различий не выявлено ни у самок, ни у самцов; при визуальной оценке во всех группах, перенесших операцию, отмечена реактивная перестройка астроцитов независимо от генотипа.

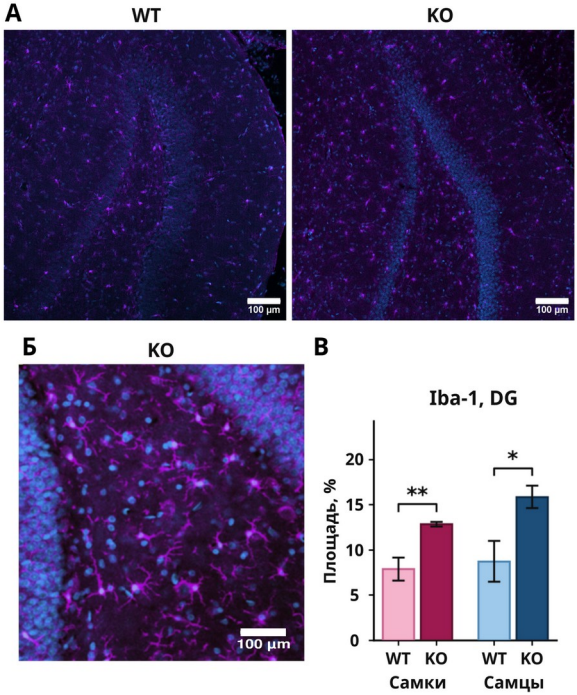


*Рис. 8. Иммуногистохимическое окрашивание на маркер микроглии Iba-1 в зубчатой извилине гиппокампа. (А) Репрезентативные микрофотографии животных WT и TPH2-KO, увеличение 10×; (Б) животное TPH2-KO, увеличение 20×; (В) площадь Iba-1. U-критерий Манна–Уитни; n: WT♂ = 9, TPH2-KO♂ = 8, WT♀ = 12, TPH2-KO♀ = 9. Масштабные линейки 100 мкм. * p < 0,05; ** p < 0,01.*

Через четыре недели после травмы спинного мозга у самцов с нокаутом гена *Tph2* и самцов дикого типа сравнили плотность BrdU-меченых клеток в субгранулярной зоне зубчатой извилины. BrdU вводили в течение первых трех дней после операции. Дооперационную плотность меченых клеток в этой серии не определяли. У самцов с нокаутом гена *Tph2* плотность меченых клеток составила 11 179 ± 2 329 клеток/мм³, у самцов дикого типа – 32 063 ± 5 635 клеток/мм³ ($p < 0,001$, рисунок 9). Таким образом, после травмы плотность клеток с меткой у нокаутных самцов была примерно в 2,9 раза ниже.

В отдельной серии на самцах крыс линии Wistar оценивали изменения в гиппокампе после повреждения спинного мозга.

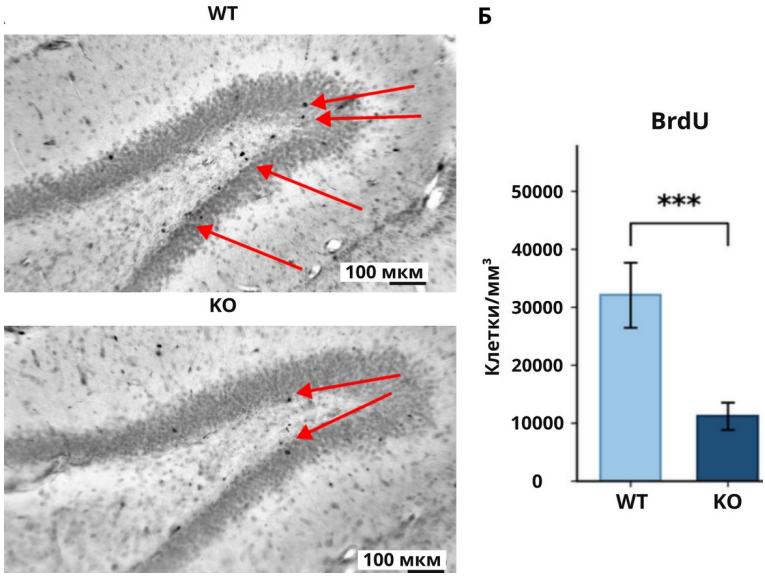


*Рис. 9. Количественный анализ BrdU-меченых клеток в субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа. (А) Репрезентативные микрофотографии; (Б) плотность BrdU-позитивных клеток. U-критерий Манна–Уитни; n: WT♂ = 6, TPH2-KO♂ = 5, *** p < 0,001.*

Через четыре недели после операции сопоставили животных, перенесших левостороннюю латеральную гемисекцию, с ложнооперированными животными той же линии (SHAM), которым выполняли ламинэктомию без повреждения спинного мозга. Это сравнение характеризует ответ на травму у самцов Wistar. После левосторонней гемисекции площадь Iba-1 возрастала в поле CA3 ($p < 0,01$) и в зубчатой извилине ($p < 0,05$), но не в поле CA1; усиливалась реактивность астроцитов (GFAP) в stratum oriens и stratum radiatum полей CA1 и CA3. Через четыре недели после операции у самцов Wistar доля площади GFAP-позитивного окрашивания в молекулярном слое зубчатой извилины и хилусе была выше после гемисекции, чем после ложной операции ($p < 0,05$ для каждого сравнения). Плотность BrdU-позитивных клеток оценивали в двух группах: SHAM и ТСМ. Статистический анализ выявил достоверное снижение числа BrdU-позитивных клеток в гиппокампе после ТСМ ($p < 0,001$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе на крысах линии Dark Agouti с нокаутом гена *Tph2* (TPH2-KO) и животных дикого типа (WT) обоего пола изучено, как врожденный дефицит центрального серотонина (5-HT) влияет на сенсомоторный фенотип в норме, на восстановление локомоции после левосторонней латеральной гемисекции спинного мозга (СМ), на нейровоспаление и нейрогенез. Использовали количественный кинематический анализ (88 показателей, система MotoRater;

метод главных компонент: PC1 – пространственно-временные параметры, PC2 – внутриконечностная координация, PC3 – углы суставов, угловые скорости и ускорения, PC4 – постуральные параметры), тесты «Горизонтальная лесенка», «Горячая пластина» и «Холодная пластина», оценку силы хвата, балльную оценку восстановления и иммуногистохимию.

У интактных крыс нокаут *Tph2* не вызывает грубых нарушений локомоции, но изменяет показатели, связанные со скоростью ходьбы. Повышена средняя скорость локомоции и сокращены длительности цикла шага и фазы опоры (PC1, 29,8 % дисперсии; эффект генотипа $p = 0{,}001$): у самок TPH2-KO цикл и фаза опоры короче, чем у WT ($p < 0{,}0001$), у самцов TPH2-KO скорость выше, чем у самцов WT ($p < 0{,}01$). Различия между генотипами по длительности фаз переноса и опоры, углам тазобедренного сустава в точках E3, F и E1, ретракции конечности, высоте тазобедренного сустава и подвздошного гребня и ряду коэффициентов внутриконечностной координации после поправки на скорость (ANCOVA) исчезают, то есть, вероятно, обусловлены более быстрой ходьбой, а не нарушением структуры движения. Единственным показателем, различие по которому сохранилось после поправки, оказалась корреляция траекторий подвздошного гребня и голеностопного сустава в фазе разгибания у самцов (выше у TPH2-KO, $p < 0{,}01$). Внутриконечностная координация (PC2) выше у самцов TPH2-KO ($p < 0{,}001$), у самок генотипы по ней не различаются; углы суставов (PC3) и поза (PC4) от генотипа не зависят.

Чувствительность в тестах «Горячая пластина» и «Холодная пластина» и сила хвата внутри каждого пола не изменены; в тесте «Горизонтальная лесенка» отмечен только общий эффект генотипа для передних конечностей ($p = 0{,}0025$) без значимых попарных различий. Независимо от генотипа самки и самцы различаются по массе тела, длине таза и бедра, силе хвата ($p < 0{,}0001$), высоте тазобедренного сустава и ретракции конечности, а также по компонентам PC1, PC3 и PC4; при этом генотип проявляется по-разному: у самок – в скоростно-временных параметрах, у самцов – в скоростно-временных параметрах и координации (PC2).

Результаты работы обобщены на рисунке 10: нокаут *Tph2* сохраняет базовые сенсомоторные функции, но замедляет восстановление поврежденной конечности и изменяет динамику координации, а в очаге повреждения и в гиппокампе сопровождается сдвигом микроглии в сторону провоспалительного состояния.

У самок нокаут замедляет восстановление. Так, сенсомоторный дефицит поврежденной задней конечности в тесте «Горизонтальная лесенка» к 4-й неделе снизился до 21,9 % у WT и только до 47,1 % у TPH2-KO (на 1-й неделе 71,0 % и 64,2 %; различия на 2–4-й неделях значимы, $p < 0{,}01$). В кинематике изменились три компоненты: PC1 (длина шага передних конечностей, относительные длительности фаз опоры и переноса) отличалась от WT на 2–4-й неделях ($p = 0{,}010$; $0{,}021$; $0{,}009$); PC2 (корреляции колена с плюснефаланговым и голеностопным суставами в фазах опоры и сгибания) у TPH2-KO отклонилась от исходного уровня на 3–4-й неделях ($p = 0{,}0034$;

0,0024) и отличалась от WT (p = 0,0001; 0,0017), тогда как у WT не менялась; PC3 (угол плюснефалангового сустава в точках F и E3, высота подвздошного гребня и тазобедренного сустава) была выше, чем у WT, со 2-й по 4-ю неделю (p = 0,033; 0,019; 0,0033). Эффект генотипа оказался значимым для 34 из 88 показателей, причем сильнее всего он проявился для длительности цикла, длительности фазы опоры и скорости (F = 24,9; 24,7; 24,0 соответственно). Наибольшее взаимодействие с фактором времени было выявлено для максимальной угловой скорости голеностопного сустава и корреляции между голеностопным и плюснефаланговым суставами в фазе опоры. У самцов восстановление по «Лесенке» от генотипа не зависит (к 4-й неделе 7,3 % у WT и 12,0 % у TPH2-KO), PC1 различалась только на 1-й неделе (p = 0,0041), а PC2 (корреляции суставов в фазах опоры и разгибания) была выше у TPH2-KO уже до операции (p = 0,0012) и оставалась выше на 2–4-й неделях (p = 0,0059; 0,0070; 0,0006). Эффект генотипа значим для 37 показателей, наибольший – для длительности фазы переноса, длительности цикла и корреляции коленного и плюснефалангового суставов в фазе опоры; взаимодействие со временем наибольшее для максимального углового ускорения коленного сустава и корреляции тазобедренного и голеностопного суставов в фазе разгибания. Таким образом, по полученным в исследовании данным, у самок дефицит 5-HT проявляется в ходе восстановления (у WT PC2 не отклонялась от исходного уровня, у TPH2-KO выросла на 3–4-й неделях), а у самцов определяет исходную организацию координации и мало влияет на динамику восстановления. Ноцицептивная чувствительность после травмы зависит от срока наблюдения (повышение латентности в острой фазе, снижение ниже исходного уровня к 3-й неделе), но не от генотипа.

В очаге повреждения спинного мозга у крыс TPH2-KO уровень экспрессии маркеров микроглии/макрофагов (Iba-1: 6,00 % против 6,57 %) и астроглии (GFAP: 20,23 % против 18,13 %) не изменялся, однако были увеличены площади CD68 (в 1,5 раза), TNF-α (в 1,7 раза) и iNOS (в 2,1 раза), во всех случаях $p < 0,001$; кроме того, в микроглии/макрофагах в центре очага повреждения накапливаются липидные включения. Таким образом, изменяется функциональное состояние микроглии, а не число клеток, что согласуется с представлением о более сильной активации микроглии и худшей переработке продуктов распада миелина при дефиците серотонина.

В гиппокампе у TPH2-KO площадь Iba-1 выше, чем у WT, в CA1 (в 1,5 раза), CA3 (в 1,6 раза) и зубчатой извилине (в 1,4 раза) при отсутствии различий по GFAP и S100β, а плотность BrdU+ клеток в субгранулярной зоне ниже в 2,9 раза (11 179 против 32 063 клеток/мм³; $p < 0,001$).

Полученные данные показывают, что серотониновая система участвует в регуляции восстановления после повреждения СМ, влияя на нейровоспаление и нейрогенез, причем этот эффект зависит от пола.

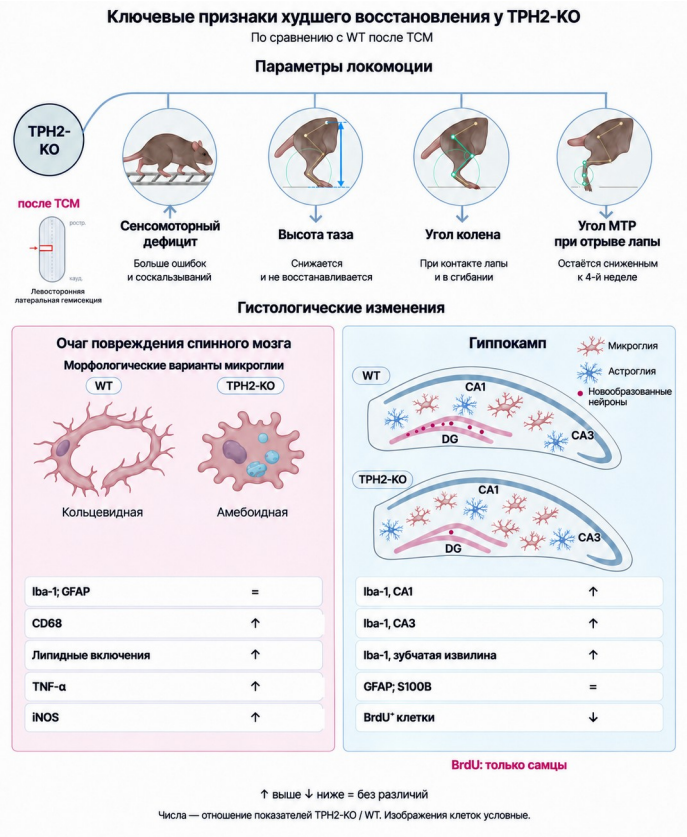


Рис. 10. Обобщенная схема сенсомоторных и гистологических изменений при дефиците TPH2 (сопоставление TPH2-KO и WT) после ТСМ.

Эти результаты обосновывают необходимость учета пола при планировании терапии, направленной на серотониновую систему, и делают перспективным изучение воздействия на серотониновые рецепторы микроглии.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что нокаут гена *Tph2* не приводит к нарушению базовой моторной функции, температурной чувствительности конечностей и мышечной силы. При этом локомоторное поведение TPH2-KO крыс по сравнению с животными WT отличается особенностями координации движения у самцов и более высокой скоростью передвижения у самок.

2. На модели TPH2-KO крыс установлено, что дефицит 5-HT влияет на восстановительную динамику после спинальной травмы: на 8–9-е сутки после латеральной гемисекции восстановление двигательной функции значимо выше в группе WT по сравнению с TPH2-KO преимущественно у самок.

3. Одним из ключевых механизмов худшего восстановления животных TPH2-KO обоего пола является нарушение элиминации продуктов распада миелина в очаге повреждения спинного мозга, признаком чего является преобладание в популяции микроглии липид-нагруженных клеток.

4. В очаге повреждения спинного мозга у нокаутных крыс обоего пола иммунореактивность по индуцибельной синтазе оксида азота и фактору некроза опухоли альфа была выше, чем у крыс дикого типа, что указывает на более выраженный провоспалительный ответ.

5. При иммуногистохимическом исследовании гиппокампа после травмы спинного мозга обнаружено, что нокаутные крысы обоего пола имеют более выраженную микроглиальную реакцию по сравнению с животными WT. Это подтверждает системный характер нейровоспалительной реакции, распространяющейся в удаленные от очага поражения отделы нервной системы.

6. Отличий в реакции астроцитов в спинном мозге и гиппокампе у крыс TPH2-KO и крыс дикого типа обоего пола не было обнаружено, что указывает на избирательное влияние дефицита серотонина на микроглиальное звено нейровоспаления.

7. Системное нейровоспаление при серотониновом дефиците сопровождается сниженным нейрогенезом в гиппокампе, что в комплексе свидетельствует о важнейшей роли центрального 5-HT в механизмах пластичности после повреждения спинного мозга.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

По теме диссертации опубликовано 3 научные работы в журналах, индексируемых базами данных РИНЦ, Web of Science и Scopus и рекомендуемых ВАК при Минобрнауки России:

1. Konovalova S.P., Sysoev Yu.I., Vetlugina A., Arsentiev K.A., Musienko P.E. Role of the Serotonergic System in Functional Recovery after Spinal Cord Injury // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. – 2024. – Vol. 60. – P. 1943–1959. https://doi.org/10.1134/S0022093024050235

2. Konovalova S.P., Sysoev Yu.I., Shkorbatova P.Yu., Vetlugina A., Shtol V.S., Arsentiev K.A., Stepanichev M.Y., Okovityi S.V., Musienko P.E. Neuroplastic and Neuroinflammatory Alterations in the Hippocampus after Spinal Cord Injury // Cell and Tissue Biology. – 2025. – Vol. 19. – P. S127–S137. https://doi.org/10.1134/S1990519X25600383

3. Konovalova, S.P.; Shitc, D.D.; Sysoev, Yu.I.; Vetlugina, A.; Puchik, M.M.; Okovityi, S.V.; Gainetdinov, R.R.; Musienko, P.E. Sensorimotor Phenotyping of Adult Male and Female Tph2-Knockout Rats. Vavilov J. Genet. Breed. 2026, 30, 1076–1087. https://doi.org/10.18699/vjgb-2