На правах рукописи



КОЧНЕВА АНАСТАСИЯ АНАТОЛЬЕВНА

РОЛЬ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В МОДУЛЯЦИИ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ И ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МОЗГА ПРИ МИГРЕНИ У КРЫС-ГЕТЕРОЗИГОТ ЛИНИИ DAT-KO

1.5.24. Нейробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Федеральная территория «Сириус» – 2026

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

Научный руководитель: кандидат биологических наук,
Герасимова Елена Вячеславовна

Защита состоится «19» декабря 2026 года в 13:00 на заседании Диссертационного совета НТУ.1.5.24.26 в АНОО ВО Научно-технологическом университете «Сириус» по адресу 354340, Краснодарский край, пгт. 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,
к.б.н. Калинина Д.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Мигрень является одним из наиболее распространенных и социально значимых неврологических заболеваний, которым страдает около 15 % населения мира. Согласно данным Global Burden of Disease, мигрень занимает второе место среди причин инвалидизации и первое место среди неврологических заболеваний у лиц молодого и среднего возраста [1]. Высокая распространенность заболевания, преимущественное поражение лиц трудоспособного возраста, выраженное снижение качества жизни пациентов и значительные экономические затраты, связанные с потерей трудоспособности и необходимостью длительного лечения, определяют высокую медицинскую и социальную значимость данной патологии [2].

Современная концепция патогенеза мигрени рассматривает заболевание как результат нарушения функционирования тригеминоваскулярной системы, представляющей собой совокупность чувствительных волокон тройничного нерва, иннервирующих сосуды и оболочки головного мозга, а также центральных структур, обеспечивающих проведение и обработку ноцицептивной информации [3]. Под действием различных триггеров происходит активация периферических окончаний тройничного нерва, которая сопровождается высвобождением нейропептидов, прежде всего кальцитонин-ген-связанного пептида (CGRP), пептида, активирующего аденилатциклазу гипофиза (PACAP) и субстанции Р. Эти медиаторы вызывают вазодилатацию, повышение сосудистой проницаемости, дегрануляцию менингеальных тучных клеток и развитие нейрогенного воспаления в твердой мозговой оболочке, что приводит к сенситизации периферических ноцицепторов и последующей активации центральных отделов тригеминоваскулярной системы [3,4]. Именно активация тригеминоваскулярной системы в настоящее время рассматривается как основной механизм возникновения мигренозной боли.

Одним из первых нейромедиаторов, роль которого была определена при мигрени, стал серотонин (5-гидрокситриптамин, 5-НТ). Наиболее убедительным подтверждением участия серотонина в патогенезе мигрени стало создание селективных агонистов серотониновых рецепторов - триптанов, которые оказались эффективны в лечении мигрени [5]. Вместе с тем накопленные за последние годы данные свидетельствуют о том, что мигрень не может быть объяснена исключительно нарушением серотонинергической передачи или активацией тригеминоваскулярной системы. Несмотря на высокую эффективность триптанов, около 40 % пациентов не достигают адекватного ответа на лечение, а сами препараты оказывают преимущественно

симптоматическое действие, не предотвращая развитие заболевания и его хронификацию [6]. Это указывает на существование дополнительных механизмов, регулирующих возбудимость нейрональных сетей и поддерживающих патологический процесс.

В первых клинических исследованиях было отмечено, что многие продромальные симптомы мигрени, включая тошноту, рвоту, сонливость, зевоту и артериальную гипотензию, характерны для активации дофаминовых рецепторов, а применение антагонистов D2-рецепторов способствует уменьшению выраженности приступа [7]. Экспериментальные исследования показали, что дофамин способен модулировать активность тригеминоваскулярной системы, изменять возбудимость корковых нейронов, влиять на центральную сенситизацию [8–10]. Однако результаты многих исследований остаются противоречивыми, несмотря на эффективность антагонистов дофамина при купировании симптомов мигрени, применение дофамина или агонистов его рецепторов может подавлять активацию тригеминальных нейронов [11–13].

Степень проработанности темы исследования. Несмотря на существенный прогресс в понимании патофизиологии мигрени, механизмы ее возникновения и особенности перехода эпизодической формы в хроническую до настоящего времени остаются изученными не полностью. Современные представления рассматривают мигрень как заболевание, возникающее вследствие нарушения функционирования сложной сети взаимосвязанных нейрональных структур, включающих тригеминоваскулярную систему, ствол мозга, таламус, гипоталамус, кору больших полушарий и лимбическую систему, что приводит к нарушению сенсорной обработки [14].

Заболеваемость мигренью также осложнена вероятностью перехода из эпизодической формы в хроническую. Существуют исследования, свидетельствующие о важной роли нейровоспаления в патогенезе мигрени, а также переходе заболевания в хроническую форму. Повторяющаяся активация тригеминоваскулярной системы сопровождается развитием локального нейрогенного воспаления в мозговых оболочках, активацией резидентных иммунных клеток центральной нервной системы (микроглии) и формированием центральной сенситизации [15]. Длительная активация глиальных клеток сопровождается изменением продукции цитокинов, хемокинов, а также пуринергической сигнализации и других молекулярных механизмов, способных поддерживать повышенную возбудимость ноцицептивных сетей и способствовать хронификации боли [16,17].

Таким образом, несмотря на значительный прогресс в изучении мигрени, механизмы взаимодействия дофаминергической системы и глиального нейровоспаления при различных формах заболевания остаются недостаточно изученными. Выяснение роли дофамина в регуляции нейроиммунных процессов представляет существенный фундаментальный интерес и может способствовать более глубокому пониманию механизмов хронификации мигрени, а также поиску новых терапевтических мишеней, направленных на предупреждение прогрессирования заболевания.

Целью исследования было охарактеризовать поведенческие, электрофизиологические и нейровоспалительные особенности у крыс-гетерозигот линии DAT-KO (DAT-HET) в моделях мигрени.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1) Изучить изменения сенсорной чувствительности, поведенческих особенностей в модели хронической мигрени без ауры у крыс DAT-HET.

2) Оценить воспалительную активность периферической иммунной системы в модели хронической мигрени без ауры и острой мигрени с аурой у крыс DAT-HET.

3) Исследовать гистологические изменения в дорсальном гиппокампе и таламусе крыс DAT-HET в модели хронической мигрени без ауры и острой мигрени с аурой.

4) Изучить электрофизиологические показатели активности коры головного мозга в модели острой мигрени с аурой у крыс DAT-HET.

5) Оценить молекулярно-генетические биомаркеры нейровоспаления у крыс DAT-HET в модели мигрени с аурой.

Научная новизна. Впервые для изучения механизмов мигрени с аурой и без ауры применена генетическая модель крыс, гетерозиготных по нокауту гена транспортера дофамина (DAT-HET, *Slc6a3*), с эндогенно повышенным внеклеточным уровнем дофамина, что позволило исключить артефакты экзогенной фармакологической модуляции и оценить роль дофаминергической системы в развитии заболевания.

Выявлено участие дофамина в центральных и периферических механизмах возникновения и развития мигрени. Продемонстрировано его противовоспалительное действие в отношении менингеальных оболочек, тогда как развитие реактивного астроглиоза в гиппокампе протекает независимо от активности обратного захвата дофамина.

Впервые на модели мигрени с аурой установлено, что изменения кинетики распространяющейся корковой депрессии ассоциированы с модулирующим

влиянием дофаминергической системы на возбудимость нейронов соматосенсорной коры.

Научно-практическая значимость. Полученные результаты показывают, что хроническое изменение дофаминергического тонуса, обусловленное снижением обратного захвата дофамина, не приводит к универсальному усилению или подавлению мигренеподобных проявлений, а избирательно изменяет отдельные компоненты патологического ответа. Важное значение имеют результаты исследования нейровоспалительных механизмов. Показано, что вариативность иммунного и глиального ответа на фоне повышенного тонуса внеклеточного дофамина зависит от типа механизмов (центральных или периферических) вовлеченных в формировании мигренозного приступа.

Полученные результаты дополняют экспериментальные данные о механизмах взаимодействия дофаминергической передачи с тригеминальной системой, распространением корковой депрессии (РКД) и нейровоспалением и могут быть использованы при дальнейшем исследовании молекулярных механизмов мигрени, в том числе при разработке экспериментальных подходов к фармакологической модуляции дофаминергической системы.

Методология и методы исследования. Работа проводилась на крысах-гетерозиготах линии DAT-KO (DAT-HET). Были использованы поведенческие тесты для определения динамики развития болевого приступа в модели хронической нитроглицерин-индуцированной мигрени. Также применена модель мигрени с аурой, в ходе которой регистрировались электрофизиологические показатели активности коры. После моделирования хронической мигрени и острой мигрени с аурой проведен гистологический анализ воспаления оболочек мозга, подкорковых структур, а также количественный анализ экспрессии генов в мозге.

Личный вклад диссертанта в исследование. Работа выполнена при личном участии диссертанта во всех этапах исследования: проведение экспериментов, обработка и анализ полученных результатов, написание тезисов и статей.

Положения, выносимые на защиту

1. При моделировании хронической мигрени активация астроцитов в полях CA1 и CA3 гиппокампа не зависит от генотипа крыс линии DAT, тогда как в зубчатой извилине и вентральных ядрах таламуса глиальный ответ носит генотип-зависимый характер, увеличение плотности микроглии в таламусе выявлено только у крыс DAT-WT. В вентральных ядрах таламуса у DAT-HET

крыс микроглиальное окружение в модели хронической мигрени сохраняется на уровне контроля.

2. В модели острой мигрени с аурой снижаются скорость деполяризации, амплитуда и латентность начала распространяющейся корковой депрессии у DAT-HET крыс, тогда как порог ее инициации и множественные потенциалы действия нейронов соматосенсорной коры не зависят от этого влияния.

3. Активация менингеальных тучных клеток при индукции мигрени зависит от характера и длительности патологического воздействия: в модели хронического введения нитроглицерина она наблюдается независимо от генотипа, тогда как при острой KCl-индуцированной мигрени только у DAT-WT крыс.

Достоверность полученных данных. Достоверность результатов основана на достаточном количестве проведенных исследований с применением адекватных методик и статистической обработке полученных данных.

Апробация работы. По материалам диссертации опубликованы 2 статьи в журналах из перечня ВАК, 1 статья в зарубежном журнале из 1 квартиля. Также результаты работы представлены на конференциях: Всероссийская конференция по естественным и гуманитарным наукам с международным участием «Наука СПбГУ – 2023» (Санкт-Петербург, 2023); Всероссийская с международным участием школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2023); XXIV съезд физиологического общества им. И.П. Павлова (Санкт-Петербург, 2023); Нейрокампус 2023: Эволюция. Нейротехнологии Будущего (Москва, 2023); Международная конференция NEUROSCIENCE WEEK (Ереван, 2024); LIFT Школа молодого нейротехнолога (Москва, 2024, 2025); 28 Пущинская школа-конференция молодых ученых с международным участием "Биология - наука XXI века" (Пущино, 2025); Самойловские чтения. Современные проблемы физиологии (Казань, 2026); Современное видение вопросов боли: клинические и экспериментальные подходы (Санкт-Петербург, 2026).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных журналах (включенных в перечень ВАК, Scopus и Web of Science) и 12 тезисов по материалам конференций.

Конкурсная поддержка работы. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 23-15- 00328.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 142 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения,

выводов и списка литературы, состоящего из 330 источников. Диссертация содержит 32 рисунка, 2 таблицы.

Основное содержание работы

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на самцах крыс линии DAT-KO в возрасте 4-12 месяцев генотипа DAT-WT (+/+, n = 35) и DAT-HET (-/+, n = 38), а также крыс линии Wistar (n = 12) того же возраста. Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и получено заключение локального этического комитета «Сириус» (протокол #2 от 2.05.23).

Были использованы 2 модели мигрени:

1. Для моделирования хронической мигрени применяли стандартный протокол внутрибрюшинного введения нитроглицерина (НТГ) в концентрации 1 мг/мл с расчетом 10 мг/кг, производили уколы через день, всего 5 инъекций.

2. Острая мигрень с аурой на основе индукции распространяющейся корковой депрессии (РКД).

На крысах линии Wistar оценивали пороги механической чувствительности нитями фон Фрея до введения НТГ, через 10, 70, 130 мин после 1 введения НТГ, а также до и через 2 часа после последующих введений.

При моделировании хронической мигрени у крыс DAT после введения НТГ также проводилась батарея тестов: после 1 и 3 введения НТГ крыс тестировали нитями фон Фрея, далее «Открытое поле» и «Темно-светлая камера» в течение 3 часов, после 5 введения первые 2 часа; через 3 часа после 2 и 4 введения НТГ, а также на 10 день проводились тесты «температурная чувствительность хвоста».

Электрофизиологические исследования. Хирургия проводилась на спящем животном под анестезией изофлураном, далее переводили под уретановый наркоз. Для установки электродов были просверлены 2 отверстия, над соматосенсорной корой (S1, A/P: -2 мм, M/L: 2.5 мм) и зрительной корой (V1, A/P: -5 мм, M/L: 2.5 мм). Заземляющий электрод из хлорсеребряной проволоки был имплантирован в мозжечок. Для записи электрической активности коры были использованы вольфрамовые электроды (R = 0.5-1 МОм), которые погружались на глубину 800-950 мкм, соответствующему IV слою коры.

Проводили определение порогов генерации РКД при помощи аппликации 10 мкл раствора хлорида калия (KCl) в отверстие для электрода над областью S1 на твердую мозговую оболочку. Для определения порогов генерации РКД KCl апплицировали в возрастающей концентрации от 0,05 М до 1 М и записывали сигнал в течение 10 мин. При отсутствии РКД повышали концентрацию раствора KCl, между аппликациями проводили отмывку от KCl раствором 0.9% хлорида натрия (NaCl). После определения порога генерации РКД также проводили отмывку далее непрерывно записывали активность коры в течение 2 часов с KCl (1М). Оценивали латентность генерации РКД с момента аппликации KCl до начала волны, амплитудно-временные характеристики первой волны РКД, а также скорость распространения РКД по коре. Регистрация РКД проводилась в режиме постоянного тока, для изучения множественных потенциалов действия (МПД) проводилась также запись активности коры в режиме переменного тока. Контрольные значения количества спайков в 10 с были определены по записи до начала определения порогов РКД, которые сравнивались с количеством спайков в течение 10 с после начала волны РКД. Из выборок были исключены результаты, на которых артефакты записи препятствовали анализу волны. В анализ скорости распространения РКД по коре входили результаты только с животных, у которых РКД регистрировалась под обоими электродами.

После электрофизиологических записей забирали образцы головного мозга для анализа уровня мРНК методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) в трех структурах: первичная соматосенсорная кора, таламус и гиппокамп. Для изучения активации клеток и маркеров воспаления были выбраны 3 гена (*Fos, Tgfb1, P2rx7*), с использованием бета-актина (*Actb*) и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (*Gapdh*) в качестве генов «домашнего хозяйства». Относительную экспрессию генов определяли с помощью метода ΔΔCt, результаты дополнительно выражали в виде логарифма по основанию 2 от Fold Change.

После окончания протокола моделирования мигрени с аурой и хронической без ауры производили забор материала на гистологию. Животных перфузировали раствором фосфатно-солевого буфера, затем 4% параформальдегида, декапитировали, образцы головного мозга и черепа с мозговыми оболочками переносили в 4% формальдегид. С черепов отделяли твердую мозговую оболочку и окрашивали раствором 0.1% толуидинового синего для визуализации тучных клеток, которые затем анализировались при помощи индекса дегрануляции.

Коронарные срезы головного мозга толщиной 50 мкм окрашивали маркером зрелых астроцитов GFAP, провоспалительным астроцитарным маркером S100β, для мечения микроглиальных клеток использовали антитела к Iba1. Для визуализации использовали набор со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, а также 3,3'-диаминобензидином в качестве хромогена. Съемку полученных препаратов проводили с помощью светового микроскопа Zeiss Axio Lab.A1 с объективом 20х. Были выбраны области анализа: лучистый слой (stratum radiatum, SR) CA1 и CA3, ворота (hilus) и молекулярный слой (ML) зубчатой извилины дорсального гиппокампа, а также область вентральных задних ядер таламуса. Анализировали плотность окрашенных глиальных клеток на толщину образца ткани. Также проведен анализ морфологии микроглии при хронической мигрени у DAT в гиппокампе.

Статистический анализ данных проводился с использованием GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, США), Microsoft Excel (Microsoft, Tulsa, OK, США) и R Studio. Нормальность распределения данных в каждой подгруппе проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Однородность дисперсий оценивали с помощью критерия Левена. Для анализа двух несвязанных выборок, не прошедших тест на нормальность, использовали тест Манна-Уитни. Для двухфакторного анализа связанных выборок использовали дисперсионный анализ (ANOVA) смешанного типа с поправкой Сидака. Для анализа выборок с двумя независимыми факторами при прохождении выборками критерия Шапиро-Уилка и Левена использовали двухфакторный ANOVA с последующим апостериорным тестом Тьюки. При нарушении хотя бы одного из критериев применяли двухфакторный дисперсионный анализ на основе выровненного рангового преобразования (Aligned Rank Transform) с апостериорным сравнением контрастов взаимодействия (ART C) и поправкой Холма на множественность сравнений. Расчёты выполнены в среде R с использованием пакетов ARTool, emmeans и car.

Результаты исследования и их обсуждение

1. Моделирование хронической мигрени на крысах линии Wistar

После 1 введения НТГ было показано снижение порогов чувствительности на 2 и 3 час измерения по сравнению с контрольными значениями ($p<0.05$). Также были проведены тестирования механической чувствительности у группы, получившей эквивалентное введение NaCl, различий в сравнении с контрольными измерениями не обнаружено. Это подтвердило вклад введения НТГ в развитие аллодинии.

При моделировании хронической мигрени у животных измеряли пороги механической чувствительности до, а также через 2 часа после введения НТГ (рис. 1). Моделирование хронической мигрени привело к снижению порогов чувствительности у животных до введения НТГ после 3 введения и в последующие дни (с 5 дня, соответственно, $p<0.05$). Через 2 часа после введения НТГ у Wistar также понижались пороги механической чувствительности по сравнению с контролем, после каждого введения (с 1 по 9 день тестирования, $p<0.05$). При этом в группе, получавшей NaCl, изменения порогов не обнаружено, что подтверждает развитие аллодинии в модели хронической мигрени.

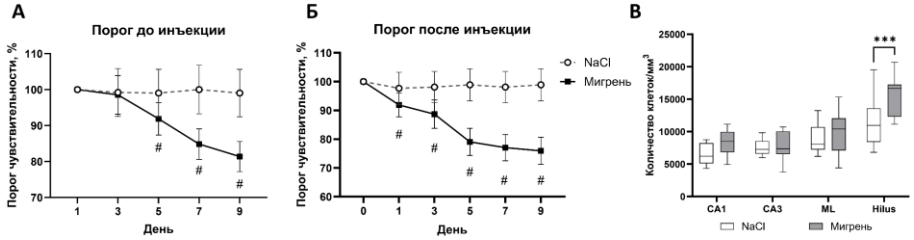


Рисунок 1 – Пороги механической чувствительности крыс линии Wistar. Тестирование порогов чувствительности до (А) и после введения НТГ (Б). В – плотность S100β+ клеток в гиппокампе. Данные представлены как среднее ± SD (А, Б); медиана и 25-75% квартили (В). # - $p<0.05$ (внутригрупповое сравнение), ***- $p<0.001$ (сравнение между группами)

После моделирования хронической мигрени была проведена оценка провоспалительной активации астроцитов, в качестве маркера использован белок S100β. Сравнительный анализ показал более высокую плотность S100β+ в зоне hilus зубчатой извилины гиппокампа у животных в модели хронической мигрени по сравнению с контролем (введение NaCl) (рис. 1В, $p<0.001$). Таким образом, моделирование хронической мигрени у крыс линии Wistar сопровождается развитием глиального воспаления в гиппокампе.

2. Оценка развития сенсорных и моторных нарушений в модели хронической мигрени у крыс DAT-WT и DAT-HET

Было показано, что у животных DAT-WT и DAT-HET понижаются пороги механической и температурной чувствительности при развитии хронической мигрени (рис. 2), однако, различий между группами не обнаружено. Так, у DAT-WT крыс достоверно снижается порог чувствительности на 3 час после первого введения НТГ по сравнению с контролем, и остается достоверно сниженным через 2 и 3 часа после 3 введения, и через 2 часа после 5 введения НТГ. У DAT-HET крыс снижение порога механической чувствительности выявлено через 2

часа после 3 введения НТГ, и в дальнейшем порог давления оставался ниже по сравнению с контролем. Таким образом, хроническая аллодиния у крыс DAT-HET развивается медленнее, чем у DAT-WT крыс.

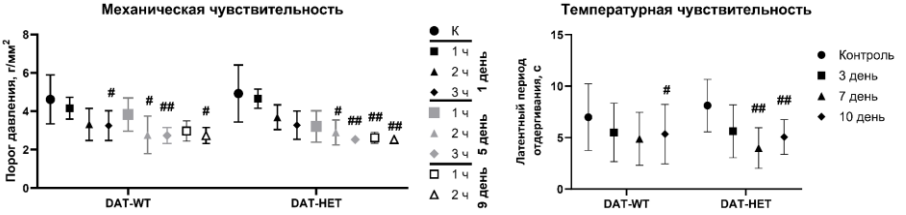


Рисунок 2 – Пороги механической и тактильной чувствительности крыс линии DAT. Сравнение с контрольными (К) значениями внутри группы: # - $p<0.05$, ## - $p<0.01$. Данные представлены как среднее±SD

Температурная чувствительность значимо снижается к 7 дню эксперимента у животных DAT-HET по сравнению с контрольными тестированиями, у DAT-WT только на 10 день (рис. 2).

Тестирование животных в установках «Открытое поле» и «Темно-светлая камера» не показало развитие тревожности, но животные генотипа DAT-HET демонстрировали снижение локомоторной активности в «Открытом поле» по сравнению с контрольными измерениями после 1, 3 и 5 укола НТГ.

3. Сравнительная характеристика активации менингеальных тучных клеток, астроцитов и микроглии в дорсальном гиппокампе и таламусе в хронической модели мигрени у крыс DAT-WT и DAT-HET

Анализ активности тучных клеток показал повышение индекса дегрануляции при моделировании хронической мигрени у DAT-WT и DAT-HET крыс (рис. 3). При этом достоверных различий между группами не обнаружено. Таким образом, развитие хронической мигрени характеризуется активацией тучных клеток вне зависимости от генотипа животного.

Анализ плотности GFAP+ астроцитов дорсального гиппокампа в контрольных условиях не выявил различий между DAT-WT и DAT-HET, что свидетельствует об отсутствии влияния изменённой дофаминергической активности на астроцитарное окружение в норме. После индукции хронической мигрени у крыс DAT-WT достоверных различий в интенсивности GFAP-иммуноокрашивания по сравнению с контролем не обнаружено. У DAT-HET крыс изменений плотности GFAP+ астроцитов в областях CA1, CA3 и hilus гиппокампа не выявлено, однако в молекулярном слое (ML) плотность клеток была выше, чем в контроле.

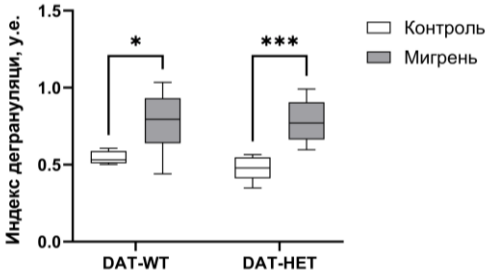


Рисунок 3 – Оценка активации тучных клеток при хронической мигрени у крыс DAT-WT и DAT-HET. Данные представлены как медиана и 25-75% квартили. *-$p<0.05$, ***-$p<0.001$

Плотность S100β+ клеток не различалась между DAT-WT и DAT-HET животными в выбранных зонах гиппокампа в контроле (рис. 4). Вероятно, общий уровень провоспалительной активации астроцитов дорсального гиппокампа не зависит от генотипа животного. Однако в модели хронической мигрени было обнаружено значительное повышение количества S100β+ астроцитов у крыс обоих генотипов в слоях CA1 и CA3 дорсального гиппокампа. В области зубчатой извилины активация зависела от генотипа: у DAT-WT крыс увеличивалась плотность астроцитов в hilus, у DAT-HET животных в ML. Эти данные свидетельствуют о воспалительной нагрузке на гиппокамп при хронической НТГ-индуцированной мигрени и указывают на то, что активация астроглии в ответ на моделирование хронической мигрени является неспецифическим компонентом патофизиологического ответа, не зависящим от функционального состояния дофаминовой системы в зонах CA1/CA3, но в зубчатой извилине воспаление астроцитов зависит от генотипа.

Плотность Iba1+ микроглии в дорсальном гиппокампе не различалась между крысами DAT-WT и DAT-HET в контроле и после индукции хронической мигрени. При этом у DAT-HET крыс выявлено увеличение компактности микроглии (соотношение площади всей клетки к площади отростков) в зубчатой извилине гиппокампа и увеличение средней площади микроглии в CA3, что может быть связано с активацией клеток.

В вентральных ядрах таламуса выявлено достоверное повышение плотности микроглиальных клеток только у DAT-WT крыс в модели хронической мигрени по сравнению с контролем (без мигрени, рис. 5). Несмотря на изменения в микроглиальном окружении, различий между контрольными и экспериментальными значениями плотности GFAP+ и S100β+ астроцитов у DAT-WT и DAT-HET крыс не было обнаружено. Возможно, сенситизация при

хронической НТГ-индуцированной мигрени не связана с глиальной перестройкой в таламусе.

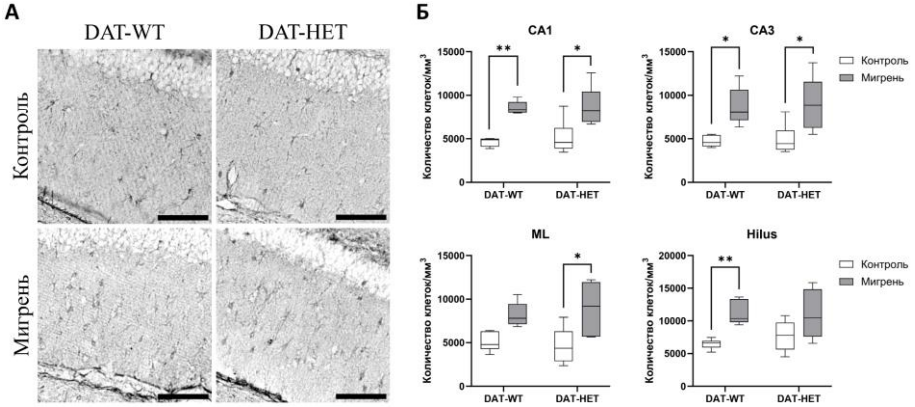


Рисунок 4 – Изменение провоспалительного профиля астроцитов в модели хронической мигрени у крыс DAT-WT и DAT-HET в гиппокампе. А - окрашивание антителами к S100β в молекулярном слое (ML), шкала 100 мкм. Б - плотность S100β+ клеток в областях CA1, CA3, а также ML и hilus зубчатой извилины. Данные представлены как медиана и 25-75% квартили. *-p<0.05, **-p<0.01

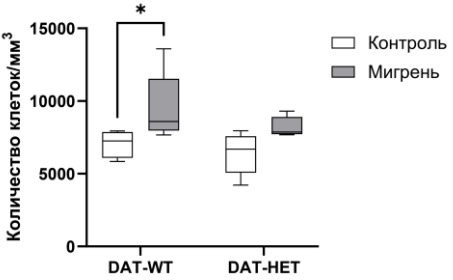


Рисунок 5 – Плотность Iba1+ клеток в вентральных ядрах таламуса у крыс DAT-WT и DAT-HET. Данные представлены как медиана и 25-75% квартили. *-p<0.05

4. Анализ генерации и распространения РКД в коре у крыс с различной экспрессией дофаминового транспортера

Анализ порогов генерации РКД не показал значимых различий между животными с разным генотипом. Минимальный порог генерации РКД составил 0.47±0.19 M KCl (DAT-WT, n = 11) и 0.56±0.24 M (DAT-HET, n = 5).

Анализ амплитудно-временных характеристик первой волны РКД при определении порога ее генерации показал, что у крыс DAT-HET (n = 8) латентность генерации волны РКД в ответ на аппликацию KCl значительно

больше по сравнению с DAT-WT (n = 11, p<0.05, рис. 6). Количество волн РКД под электродом в S1 коре не различалось у крыс двух групп (DAT-WT - n = 11, DAT-HET - n = 8, p>0.05).

Для определения влияния дофамина на скорость распространения волны РКД горизонтально по коре было зафиксировано время генерации первой волны РКД в S1 и V1 коре. Результаты не показали различий в скорости распространения волны РКД по коре между DAT-WT (3.1±2.6, n= 4) и DAT-HET крысами (3.5±1.1, n = 6, p>0.05).

Амплитуда первой волны РКД в S1 коре у животных генотипа DAT-WT (n = 12) оказалась выше, чем у DAT-HET (n = 8, p<0.05, рис. 7). Скорость деполяризации РКД у животных DAT-HET оказалась ниже, чем у DAT-WT (p<0.05). При этом другие показатели волны РКД, такие как длительность, половина длительности, время нарастания волны не достигли статистически значимых различий у DAT-WT (n = 12) и DAT-HET (n = 8) животных.

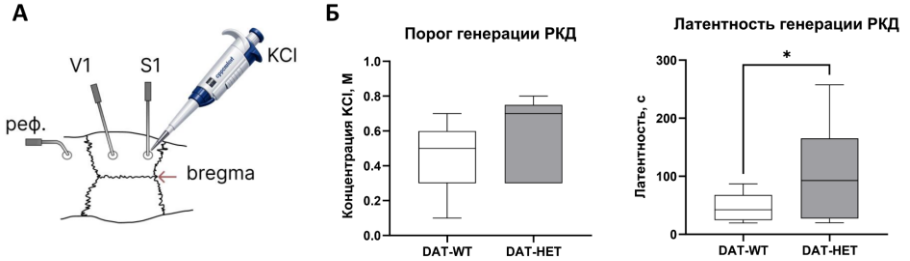


Рисунок 6 – Анализ распространения первой волны РКД у крыс DAT-HET. А - схема постановки электродов; регистрирующие электроды в зоне первичной соматосенсорной (S1) и зрительной коры (V1), референсный электрод в мозжечке (реф.). Б - порог и латентность генерации РКД. Данные представлены как медиана и 25-75% квартили. *-p<0.05

Анализ МПД показал значительное увеличение частоты в S1 коре во время первой волны РКД у DAT-WT (n = 11) и DAT-HET крыс (n = 5) по сравнению с активностью на контрольных записях, но не между животными с разным генотипом (p>0.05, рис. 8).

Также был проведен анализ МПД после первой волны РКД в V1 коре, который не показал статистического увеличения частоты МПД при прохождении волны РКД (p>0.05).

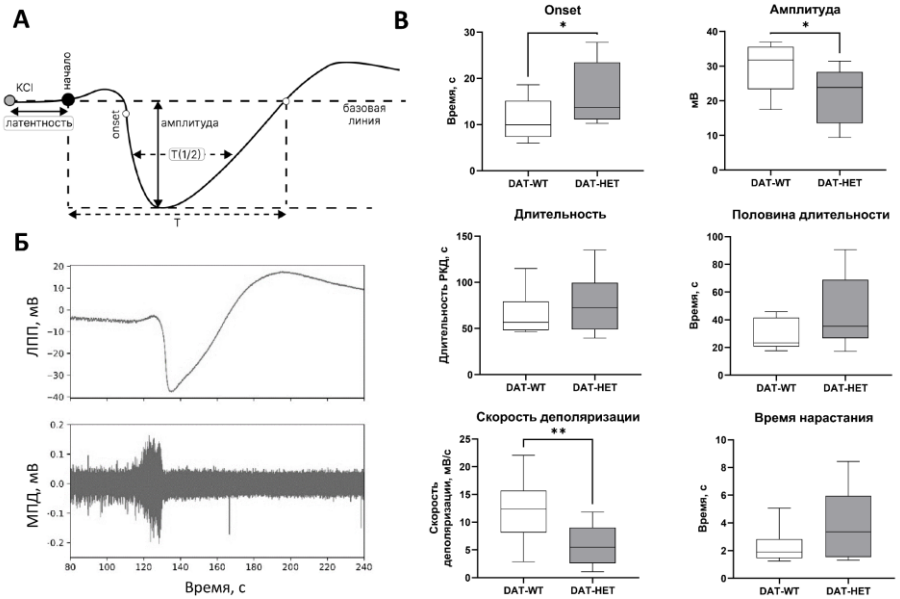


Рисунок 7 – Анализ амплитудно-временных характеристик первой РКД у крыс линии DAT в S1 коре. А - схематическое изображение РКД и основных анализируемых параметров; Т - длительность, Т(1/2) - половина длительности. Б - пример записи волны РКД у DAT-WT, запись локального полевого потенциала (ЛПП) и множественных потенциалов действия (МПД). В - сравнение амплитудно-временных характеристик РКД. Данные представлены как медиана и 25-75% квартили. *-p<0.05, **-p<0.01

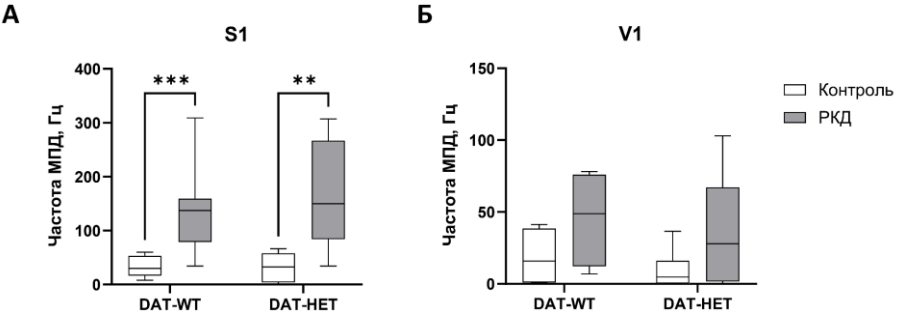


Рисунок 8 – Анализ МПД при первой волне РКД. Повышение МПД активности при РКД в S1 (А) и V1 (Б) коре. Данные представлены как медиана и 25-75% квартили. **-p<0.01, ***-p<0.001

Таким образом, частота МПД во время РКД не зависит от обратного захвата дофамина.

5. Оценка воспалительного ответа менингеальных тучных клеток, астроцитов и микроглии в гиппокампе и таламусе в модели острой мигрени с аурой у крыс DAT-HET

При моделировании острой мигрени с аурой после индукции 2х-часового РКД было показано, что на стороне генерации РКД только у крыс DAT-WT происходит активация тучных клеток по сравнению с интактным полушарием (рис. 9). Напротив, у DAT-HET крыс нет значимых различий индекса дегрануляции между полушариями. Это позволяет предположить, что дофаминергическая система модулирует взаимодействие между нервной и иммунной системами уже на периферическом уровне, причем характер этого влияния может зависеть от ряда факторов, в том числе механизма возникновения мигрени (модели) или времени воздействия фактора (острый или хронической), инициирующего мигренеподобное состояние.

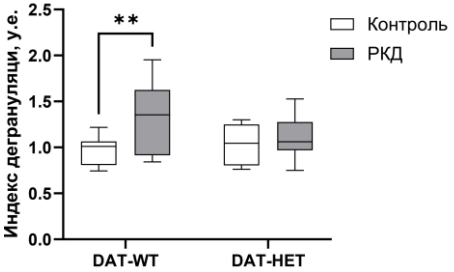


Рисунок 9 – Оценка активации тучных клеток в модели мигрени с аурой. Данные представлены как медиана и 25-75% квартили. **-p<0.01

Окрашивание GFAP+ астроцитов в гиппокампе показало более низкую плотность астроцитов в полушарии с РКД в зоне ML по сравнению с интактным полушарием у крыс DAT-WT (рис. 10). При этом в других зонах дорсального гиппокампа у DAT-WT крыс изменений окрашивания GFAP не наблюдается. У DAT-HET изменений в распределении GFAP+ клеток не обнаружено. Окрашивание астроглии провоспалительного фенотипа не показало различий в плотности S100β+ клеток во всех исследуемых слоях гиппокампа у DAT-WT, ни у DAT-HET крыс, что предполагает недостаточную продолжительность патологического воздействия для изменений окрашивания данного белка.

Окрашивание с помощью антител к Iba1 не показало статистических различий в распределении микроглии у DAT-WT и DAT-HET крыс между полушариями в гиппокампе.

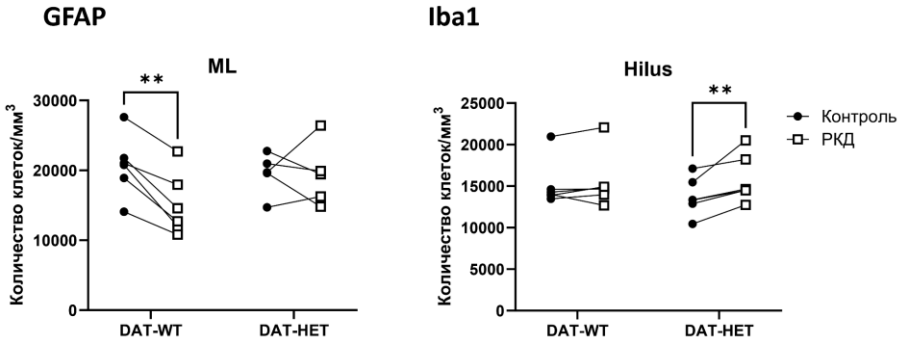


Рисунок 10 – Глиальные изменения в гиппокампе после индукции РКД. Линиями соединены значения плотности между полушариями у одного животного. **-p<0.01

Таким образом, после РКД глиальные изменения могут быть обнаружены при помощи выбранных маркеров только в зубчатой извилине дорсального гиппокампа, провоспалительной активации астроцитов не обнаружено.

Анализ клеток в таламусе после РКД не показал различий в окрашивании Iba1 и S100β, анализ маркера GFAP показал более низкое количество клеток у DAT-WT крыс на стороне с РКД по сравнению с контрольным полушарием.

Глиальные изменения показали ранний, преимущественно астроцитарный, регион-специфичный ответ после РКД в гиппокампе и таламусе DAT-WT. Аналогичных изменений не обнаружено у DAT-HET крыс, что может указывать на влияние дофаминергической системы на ранний астроцитарный ответ и увеличение количества микроглии в таламусе в условиях распространяющейся деполяризации.

При этом анализ экспрессии генов после РКД выявил более выраженные изменения нейрональной и нейровоспалительной активности в полушарии, непосредственно подвергавшемся воздействию РКД (рис. 11). Повышение экспрессии гена *Fos* в первичной соматосенсорной коре подтвердило ограниченность нейрональной активации у DAT-WT и DAT-HET крыс только полушарием с аппликацией KCl. В то же время экспрессия гена *P2rx7* у DAT-HET повышена в S1 коре после РКД по сравнению с контролем, а также выше в контроле и после РКД по сравнению с DAT-WT. Предполагается, что P2rx7 участвует в центральной сенсибилизации при мигрени и повышенной восприимчивости к РКД, однако, у DAT-HET крыс порог генерации РКД не отличался от DAT-WT.

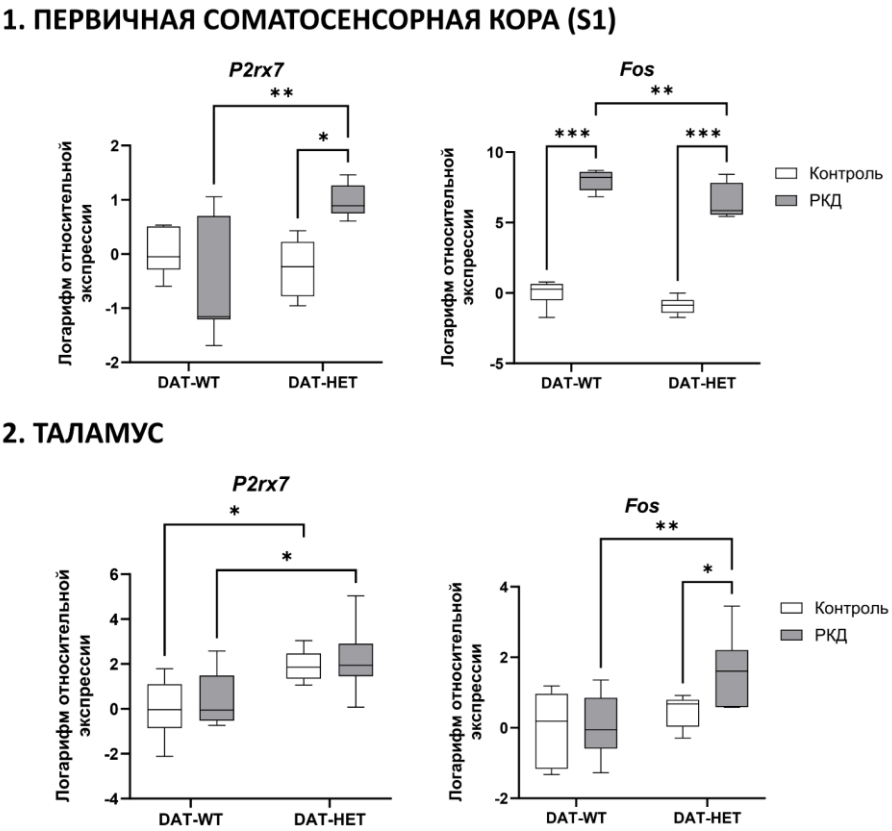


Рисунок 11. Оценка уровня экспрессии генов после индукции РКД в S1 коре и таламусе. Данные представлены как медиана и 25-75% квартили. *-p<0.05, **-p<0.01, ***-p<0.001

Более того, только у DAT-HET крыс повышалась экспрессия *Fos* в таламусе, что предполагает распространение возбуждения РКД по нисходящим путям в таламус и регуляцией дофаминергической системой данных путей. Отсутствие выраженных изменений выбранных молекулярных маркеров в гиппокампе свидетельствует о том, что кратковременное воздействие РКД не приводит к формированию столь же выраженной транскрипционной перестройки в данной структуре.

Заключение

Полученные результаты показали, что повышенный уровень дофамина в синаптической щели у животных генотипа DAT-HET не препятствует

формированию основных поведенческих проявлений хронической НТГ-индуцированной мигрени: у обоих генотипов наблюдались снижение порогов механической и температурной чувствительности. Отсутствие значимых различий между DAT-WT и DAT-HET животными свидетельствует о том, что врожденное повышение внеклеточного дофамина само по себе не определяет выраженность основных поведенческих проявлений мигренеподобного состояния.

Выявлены генотип-зависимые различия в центральных нейроиммунных взаимодействии и активации менингеальных тучных клеток в твердой мозговой оболочке. После индукции РКД повышенная дегрануляция менингеальных тучных клеток наблюдалась только у DAT-WT крыс, тогда как в модели хронической мигрени активация тучных клеток наблюдалась у животных обоих генотипов. Анализ глиальных клеток показал, что изменение обратного захвата дофамина не однонаправленного усиления или подавления активации глиальных клеток при моделировании хронической мигрени, а изменяет ее региональный паттерн.

По показателям электрофизиологической активности мозга, у DAT-HET крыс более длинный латентный период возникновения РКД при сохранении общего порога генерации, а также более низкая амплитуда и скорость деполяризации при сохранении общей длительности волны.

Анализ экспрессии генов выявил у крыс DAT-HET повышенную экспрессию *P2rx7* в первичной соматосенсорной коре после РКД и более высокие уровни его экспрессии в таламусе по сравнению с DAT-WT. Экспрессия *Fos* после РКД повышалась у крыс DAT-HET в меньшей степени, чем у DAT-WT, но также повышалась и в таламусе, что может указывать на вовлечение таламуса и распространение возбуждения по нисходящим путям при повышенном уровне дофамина.

Таким образом, результаты позволяют рассматривать дофамин как модулятор патологических процессов в модели мигрени у крыс, эффекты

которого определяется длительностью патологического воздействия, типом инициирующего стимула, анатомической структурой и конкретным типом клеток. Врождённое повышение внеклеточного дофамина не препятствует формированию мигренеподобного болевого фенотипа, но изменяет характеристики корковой возбудимости, периферического иммунного ответа и глиальной реакции в ЦНС.

Выводы

1. Развитие аллодинии в модели хронической мигрени у крыс не зависит от генотипа. Достоверных различий в поведенческом фенотипе между животными DAT-WT и DAT-HET не обнаружено.

2. Моделирование хронической мигрени сопровождается изменением глиального профиля и астроцитарной активацией дорсального гиппокампа, характер которых зависит от генотипа и анатомической области мозга. В вентральных ядрах таламуса в модели хронической мигрени не изменялось астроцитарное окружение, рост плотности микроглиальных клеток выявлен только у DAT-WT животных.

3. В модели острой мигрени с аурой порог инициации РКД не зависел от генотипа животных, тогда как кинетические параметры волны (латентность, амплитуда, скорость деполяризации) модулировались дофаминергической системой.

4. От экспрессии дофаминового транспортера не зависит фоновая активность менингеальных тучных клеток, как и активация в модели хронической мигрени. Однако, у DAT-HET крыс после РКД не происходит повышения активности тучных клеток в модели острой мигрени с аурой.

5. В модели острой мигрени с аурой РКД вызывает перестройку глии в дорсальном гиппокампе и таламусе. У DAT-HET крыс плотность астроцитов

поддерживалась на контрольном уровне в ответ на РКД в таламусе. В гиппокампе изменения глии показали регион-специфические эффекты при РКД.

6. В соматосенсорной коре РКД усиливает экспрессию *Fos* у DAT-WT крыс и в меньшей степени у DAT-HET, однако у DAT-HET животных происходит увеличение экспрессии *Fos* в таламусе. У DAT-HET крыс волна деполяризации усиливает экспрессию *P2rX7* в коре. РКД не вызвала изменения экспрессии *Fos, P2rX7, Tgfb1* в гиппокампе вне зависимости от генотипа животных в модели острой мигрени с аурой.

Список опубликованных статей по теме диссертации

1. **Кочнева, А.** Исследования механизмов развития и электростимуляционных подходов терапии мигрени / А. А. Кочнева, Е. В. Герасимова, Д. Р. Еникеев [и др.] // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2025. – Т. 111, № 8. – С. 1357-1378.

2. **Kochneva, A.A.**, Altered Dopamine Regulation Modulates Glial Cell Activation in Chronic Migraine in Rats /A.A. Kochneva, N.O. Fokeeva, S.P. Konovalova [et al.] // J Evol Biochem Phys. – 2026. – Vol. 62. – P. 1289–1299.

3. **Kochneva, A.** Neuroinflammatory and Redox Responses in a Rat Model of NTG-Induced Migraine / A. A. Kochneva, A. N. Ikrin, N. O. Fokeeva [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2026. – Vol. 27, No. 1. – P. 26.