

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской
Академии Наук

Научный доклад об основных результатах подготовленной научно-
квалификационной работы (диссертации)

**Молекулярные механизмы, лежащие в основе токсического действия ионов
фтора на клетки гиппокампа крыс**

Надей Ольга Владимировна

1.5.4. Биохимия
(Биологические науки)

Научный руководитель
к.б.н. Агалакова Наталья Ивановна

Санкт-Петербург
2023

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования

Уже много лет в научном сообществе ведутся дискуссии о токсичности ионного фтора для человека и животных и его предельно допустимых дозах. Определение последних осложняется тем, что фтор до сих пор считается микроэлементом, в определённых дозах необходимым для профилактики заболеваний зубов и лечения остеопороза. В результате токсичность фтора часто игнорируется или недооценивается. Соединения фтора являются компонентом большинства стоматологических средств и некоторых пищевых добавок, а в ряде стран применяется фторирование питьевой воды, что неизбежно приводит к его неконтрольному поступлению в организм, превышающему установленный терапевтический уровень (Johnston et al. 2020). При этом убедительных экспериментальных подтверждений необходимости фтора для нормального развития организма до сих пор не существует (Guth et al. 2020).

Однако негативное влияние фтора на здоровье человека известно уже давно (Han et al. 2021). Избыточное поступление F^- в организм в регионах с его высоким содержанием в окружающей среде приводит к развитию эндемического флюороза – заболевания, которое характеризуется патологиями костной и зубной ткани, а также широким спектром нарушений работы различных систем организма (Wei et al. 2019). На территории России флюороз встречается, например, на Урале, в Забайкалье и Карелии (Макеева и др. 2017). В последние годы споры о токсичности F^- вышли на новый уровень в связи с тем, что у людей, проживающих в регионах эндемического флюороза или подвергающихся воздействию соединений фтора на производствах, были выявлены разнообразные неврологические и когнитивные расстройства (Adkins et al. 2021). Более того, появляется все больше данных о нарушении интеллектуального развития детей в результате хронического воздействия неорганических соединений фтора. Так, одно из недавних крупных исследований выявило более низкий средний уровень интеллекта и большую распространенность когнитивных нарушений у детей, проживающих в районах эндемического флюороза, по сравнению с детьми из регионов с нормальным содержанием фтора в окружающей среде (Duan et al. 2018).

Хотя влияние F^- на функции мозга лабораторных животных являлось предметом довольно большого количества исследований, молекулярные механизмы, лежащие в основе его токсичности для клеток мозга, изучены слабо. Кроме того, в большинстве этих работ использовали такие дозы F^- (до 600 мг/л), которые значительно превышают его содержание даже в регионах эндемического флюороза. В нашем исследовании применялись количества F^- , сопоставимые с уровнями потребления человеком в регионах с его высоким содержанием в окружающей среде, учитывая его более высокую скорость выведения у крыс.

Цель и задачи исследования

Цель исследования:

Изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе токсического влияния ионов фтора (F^-) на клетки гиппокампа и когнитивные способности крыс.

Задачи исследования:

1. Оценить эффективность формирования памяти у контрольных крыс и животных, в течение года получавших избыточные дозы NaF с водой;
2. Установить способность ионов фтора индуцировать гибель нейронов;
3. Охарактеризовать экспрессию некоторых внутриклеточных маркеров гибели в клетках гиппокампа крыс после длительного потребления фторида;
4. Идентифицировать возможные изменения экспрессии генов (*Gria1*, *Gria2* и *Gria3*) и субклеточного распределения и степени фосфорилирования субъединиц (GluA1, GluA2 и GluA3) AMPA рецепторов в клетках гиппокампа крыс после длительного отравления ионами фтора;
5. Охарактеризовать возможные изменения экспрессии субъединиц NMDA рецепторов на уровне транскрипции (*Grin1*, *Grin2a* и *Grin2b*) и трансляции (GluN1, GluN2A и GluN2B) в клетках гиппокампа крыс после потребления высоких доз NaF;
6. Изучить связь между избыточным потреблением NaF крысами и изменениями экспрессии и субклеточного распределения кальпаина-1 и его посредников (RhoA, PHLPP1, ERK1/2).

Положения, выносимые на защиту

1. Длительное потребление крысами относительно высоких доз фтора, сопоставимых с его содержанием в регионах эндемического флюороза, оказывает негативное влияние на когнитивные способности животных, в частности, нарушает способность к пространственному обучению и формированию долговременной памяти.
2. Избыточное поступление NaF в организм крыс приводит к дезорганизации клеточного слоя и снижению численной плотности пирамидных нейронов в зонах гиппокампа CA1 и CA3, что указывает на гибель клеток и истощение синаптической основы.
3. Процессы гибели клеток гиппокампа крыс под действием фтора сопровождается активацией некоторых маркеров апоптоза, в частности, увеличением экспрессии про-апоптотического белка Вах и снижением уровня анти-апоптотического белка Bcl-2, а также появлением активной формы каспазы-3.

4. Длительное отравление крыс ионами фтора не оказало влияния на экспрессию генов AMPA рецепторов (*Gria1-Gria3*), но привело к изменению субклеточного распределения или степени фосфорилирования GluA2 и GluA3 субъединиц AMPA рецепторов в клетках гиппокампа, что может свидетельствовать об изменении соотношения между числом Ca^{2+} -проницаемых и Ca^{2+} -непроницаемых рецепторов в мембранах и являться причиной избыточного входа Ca^{2+} в клетки.
5. В клетках гиппокампа крыс, получавших избыток фтора, экспрессия GluN1 субъединицы NMDA рецепторов не изменялась ни на уровне транскрипции, ни на уровне трансляции, однако увеличивалась экспрессия генов *Grin2a* и *Grin2b* или степень фосфорилирования GluN2A и GluN2B субъединиц, что может приводить к изменению соотношения числа NMDA рецепторов, содержащих GluN2A и GluN2B субъединицы, в мембранах.
6. Хроническое отравление животных фтором сопровождается активацией и внутриклеточной транслокацией протеазы кальпаина-1 и эффекторов его сигнального пути - ГТФазы RhoA, регуляторной фосфатазы PHLPP1, протеинкиназы ERK1/2, что может указывать на гиперстимуляцию каскада кальпаина-1, связанную с изменениями активности NMDA рецепторов.

Научная новизна исследования

Впервые было проведено комплексное исследование внутриклеточных механизмов, лежащих в основе токсического действия ионов фтора на клетки гиппокампа, в экспериментах на крысах. В проекте впервые охарактеризованы некоторые молекулярные механизмы фтор-индуцированных нарушений формирования долговременной памяти, связанные с изменениями нейрональной пластичности, нарушениями трансдукции сигнала и механизмами гибели в клетках гиппокампа. Впервые получены данные о связи между избыточным потреблением фтора крысами и изменениями экспрессии ионотропных глутаматных рецепторов как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции.

Теоретическое и практическое значение работы

Работа посвящена изучению молекулярных изменений в клетках гиппокампа и механизмов функциональных реакций в ЦНС крыс как процессов, лежащих в основе снижения когнитивных способностей у людей в районах эндемического флюороза или подвергающихся хронической интоксикации соединениями фтора на производствах. Исследование значительно дополняет существующие пробелы в данных о внутриклеточных посредниках, изменения экспрессии которых приводят к нарушениям путей трансдукции синаптического сигнала, обеспечивающих процессы обучения и формирования долговременной памяти. Оно позволит

выделить ключевые элементы, критичные в плане возможных нарушений процессов синаптической пластичности в гиппокампе человека и животных с хроническим флюорозом, и может быть полезным для поиска терапевтических стратегий для снижения негативного влияния ионов фтора на функции ЦНС. Кроме того, данные работы подтвердили токсическое влияние ионов фтора на функции мозга, что поможет выработать рекомендации по определению оптимальных и предельно допустимых доз фтора для потребления человеком.

Апробация результатов исследования

Основные результаты диссертационного исследования доложены и обсуждены на всероссийской конференции с международным участием «Интегративная физиология» (Санкт-Петербург, Россия, 2019), VII молодёжной школе-конференции по молекулярной и клеточной биологии института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия, 2020), XVI всероссийской конференции с международным участием «Совещание по эволюционной физиологии имени академика Л.А. Орбели» (Санкт-Петербург, Россия, 2020), всероссийской конференции с международным участием «Интегративная физиология», посвященная 95-летию института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург, Россия, 2020), международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2021» (Москва, Россия, 2020), XXVII всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2021» (Санкт-Петербург, Россия, 2021), всероссийской конференции с международным участием Российского нейробиологического общества «RUSNEUROCHEM 2022» (Санкт-Петербург, Россия, 2022), всероссийской научной конференции для студентов, аспирантов и молодых ученых «LifeSciencePolytech» (Санкт-Петербург, Россия, 2022), V международном симпозиуме «Innovations in Life Sciences» (Санкт-Петербург, Россия, 2023).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 4 печатные работы в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования.

Материалы и методы

Объект исследования. Информация об уходе, содержании и эвтаназии животных. Обследуемые группы.

В исследование были включены 60 самцов крыс Wistar. Животные были предоставлены виварием ИЭФБ РАН, содержались в стандартных условиях (цикл 12 ч /12 ч света/темноты, температура 22-25 оС) и получали пищу и воду *ad libitum*. Корм был приготовлен из натуральных ингредиентов в соответствии с требованиями лабораторных животных к питательным веществам и содержал низкое фоновое содержание F⁻. Все эксперименты проведены в соответствии с требованиями Animal Welfare act (2006) и рекомендациями этического комитета Института эволюционной физиологии и биохимии им. Сеченова (2021).

В возрасте 6 недель (PND 42) крысы случайным образом были разделены на 4 группы:

Группа №1 – *Контроль* ($n=15$) – получала обычную водопроводную воду с фоновым содержанием F⁻ 0.4 мг/л.

Группа №2 – *5F* ($n=15$) – получала воду с 5 мг/л F⁻ (в виде NaF) в течение 12 месяцев.

Группа №3 – *20F* ($n=15$) – получала воду с 20 мг/л F⁻ (в виде NaF) в течение 12 месяцев.

Группа №4 – *50F* ($n=15$) – получала воду с 50 мг/л F⁻ (в виде NaF) в течение 12 месяцев.

В течение эксперимента у крыс не наблюдалось снижения массы тела, аппетита или потери шерсти, а также признаков каких-либо заболеваний, кроме развития флюороза зубов у животных из групп, получавших избыточные дозы фторида.

В конце экспериментов животных анестезировали Золетилом-100 путем внутривентрикулярной инъекции (100 мг/кг массы тела) и умерщвляли путем обескровливания. У крыс извлекали мозг, который делили на две части по продольной щели больших полушарий. Образцы мозга от 5 животных из каждой группы фиксировали для дальнейшего гистохимического анализа. Из мозга остальных крыс извлекали гиппокамп, который немедленно замораживали при -70°С. Правый гиппокамп использовали для ПЦР анализа, левый – для последующего приготовления гомогенатов для иммуноблоттинга.

Поведенческие тесты

Тест распознавания нового объекта

Тест распознавания нового объекта базируется на естественной любознательности животных и используется для оценки памяти, связанной с осознанными воспоминаниями (Lueptow 2017).

На первом этапе в течение 2-х дней проводили пре-тест. Чтобы животные привыкли к условиям эксперимента, каждая крыса на 5 минут помещалась в выделенную для тестирования клетку, которая была аналогична тем, в которых они содержались в виварии.

Затем приступали к тестированию, которое продолжалось в течение 2-х дней.

В 1-й день выделяли *фазы обучения и тестирования* (рис.1).

Для фазы обучения в углы клетки для тестирования ставили 2 объекта, затем на 4 минуты помещали туда каждую крысу и фиксировали время, в течение которого животное изучало предметы (обнюхивало их). После чего объекты убирали, а через 5 минут начинали фазу тестирования. Для этого в углы клетки снова ставили 2 объекта, один из которых был тем же, что и в фазе тестирования (знакомый крысе), другой предмет был новым. Затем на 4 минуты в клетку помещали животное и фиксировали время, в течение которого крыса взаимодействовала с предметами. По результатам этой фазы тестирования анализировали способность животных к формированию кратковременной памяти.

2-й день тестирования включал только фазу теста, при этом один предмет был тем же, который использовали в фазе теста в 1-й день, а второй объект был новым. Затем каждое животное помещали в клетку на 4 минуты и фиксировали время, в течение которого крысы изучали объекты. По результатам этой фазы тестирования анализировали способность животных к формированию долговременной памяти.

Для анализа способности крыс к формированию памяти вычисляли коэффициент дискриминации (Кд) между старым и новым предметами с помощью формулы: $K_d = \frac{(V_n - V_z)}{(V_n + V_z)} \times 100\%$, где V_n – время изучения нового предмета в фазе теста, V_z – время взаимодействия со знакомым объектом в фазе теста.

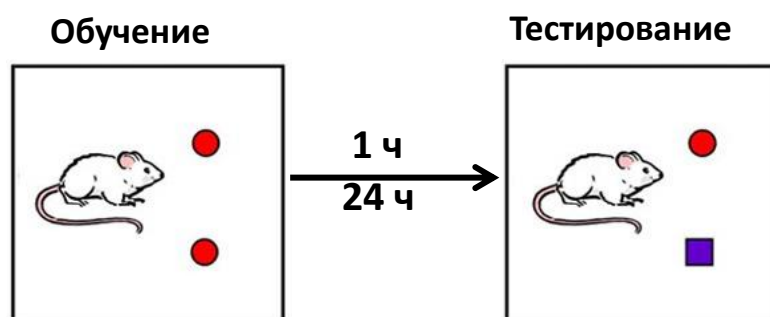


Рисунок 1. Схематическое изображение дизайна теста распознавания нового объекта.

Водный тест Морриса

Водный тест Морриса считается одним из самых надежных способов проверки способности животных к обучению и формированию долговременной памяти (Othman 2022). Тест проводился в бассейне, который условно разделили на 4 зоны, их границы отметили точками, относительно которых при проведении теста в воду помещали животных. В центре одной из зон разместили платформу, при этом уровень воды был выше платформы примерно на 1 см. Для того чтобы животные во время тестирования не видели платформу, в воду добавили молоко. Температура воды составляла 23-24 °С.

Перед проведением тестирования проводили обучение (рис. 2).

В 1-й день каждую крысу помещали в воду на 1 минуту, за которую она могла самостоятельно найти платформу. Если животное не обнаруживало платформу, на неё указывали мягкой линейкой. Когда крыса находила платформу, ее оставляли там на 15 секунд. При этом во время обучения над платформой размещали крупный предмет, который указывал на местоположение платформы.

Тестирование продолжалось в течение 5 дней, при этом на стенах возле бассейна располагали несколько картинок для ориентации крыс. Во время тестирования животных помещали в воду попеременно из 4-х разных зон. Если они не могли обнаружить платформу в течение одной минуты, на нее указывали аналогично этапу обучения, после чего оставляли на ней крыс на 15 секунд.

Для анализа способности к пространственному обучению и формированию долговременной памяти оценивали время, за которое животные обнаруживали платформу.

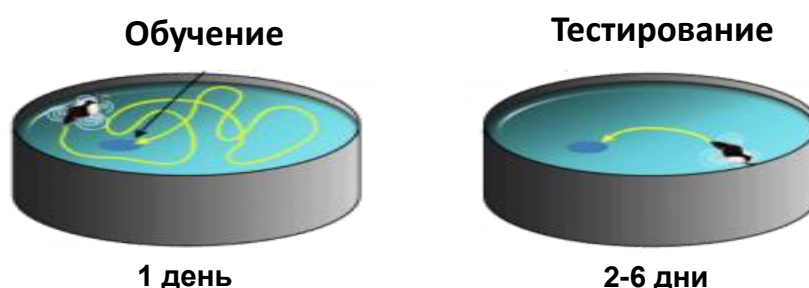


Рисунок 2. Схематическое изображение дизайна водного теста Морриса.

Гистохимический анализ

Образцы мозга фиксировали в растворе цинк (1 г) – этанол (90 мл 96 %) – формальдегида (10 мл) в течение суток. После этого препараты обезживали в спиртах восходящей крепости (от 50 до 100%) и заливали в парафин. Сагиттальные срезы мозга (10 мкм) делали в одной плоскости. Затем срезы депарафинировали и окрашивали по методу Ниссля толуидиновым синим (BioVitrum, Россия, Санкт-Петербург) согласно инструкции производителя.

Для окраски предметное стекло помещали в краситель на 10 минут, затем промывали водой и переносили в дифференцирующий раствор (1 капля ледяной уксусной кислоты на 100 мл 96 % этанола) на 5–10 секунд. После промывки в 96 % этаноле процесс дифференцировки контролировали под микроскопом. Препараты помещали в 100 % этанол на 1 минуту, обезживали в двух сменах изопропилового спирта и помещали в изопропил/ортоксилол (1: 1) на 5 минут, затем просветляли в двух сменах ортоксилола по 10 минут в каждой и заключали в канадский бальзам. Срезы анализировали с помощью микроскопа MF₁₀-LED (Micro-shot

Technology, Китай) с цифровой камерой MD50 и программы Mshot Microscope Imaging System. Подсчет нейронов осуществлялся по 3 полям зрения для каждой зоны при увеличении x40 для каждой крысы, оценивали не менее 750-1000 клеток.

Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени

Все реактивы для выделения РНК, ПЦР и праймеры были получены от компании Евроген, (Россия, Москва). Для выделения РНК пробы гиппокампа гомогенизировали в соотношении 1 мл реагента ExtractRNA на 50 мг ткани. Концентрацию (260 нм) и чистоту (260/280 нм) выделенной РНК оценивали с помощью мультимодального ридера NanoPhotometer®-N50 (IMPLEN, Германия). Затем проводили обратную транскрипцию 1 мкг РНК с помощью набора для синтеза первой цепи кДНК MMLV RT. Реакционную смесь инкубировали 5 мин при 25°C, 60 мин при 42°C и 5 мин при 70°C. Для проведения ПЦР полученную кДНК разбавляли в 10 раз. Для выбора оптимальной температуры плавления используемых пар праймеров применяли программу Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Затем эффективность отжига оценивали путем построения стандартной кривой значений C_q на основе 3х-кратных разведений кДНК. Для ПЦР выбрали пары праймеров с эффективностью, близкой к 2 (идеальному значению), и коэффициентом корреляции выше 0,98.

ПЦР в реальном времени проводили на анализаторе LightCycler 96 (Roche, Австрия) с помощью универсальной реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Москва). Для проведения ПЦР готовили реакционную смесь (25 мкл), состоящую из dH₂O (17 мкл), qPCRmix-HS SYBR (5 мкл), прямого и обратного праймеров (2 мкл; 500 нм) и кДНК (1 мкл). Этапы проведения ПЦР: (1) горячий старт (95°C, 5 мин), (2) 40 циклов, включающих стадии денатурации (95°C, 5с), отжига (57-63°C; 10с) и элонгации (72°C; 30с). Интенсивность флуоресценции фиксировалась в конце каждого цикла на стадии элонгации. Все эксперименты с RT-qPCR проводились в трех повторах, с использованием контроля без матрицы. После амплификации была получена кривая плавления путем инкубации продукта при 65°C в течение 5 с и медленного нагревания до 95°C. Флуоресценцию измеряли в фазе медленного нагревания. Кривые плавления использовались для подтверждения того, что амплифицировался только один продукт ПЦР.

Контрольные образцы без матрицы были отрицательными во всех экспериментах. C_t составлял менее 40 для всех реакций. ΔC_t было меньше 0.5 для всех повторов. Значения C_t были преобразованы в ненормированные относительные величины в соответствии с формулой: $2^{-\Delta C_t}$. Анализ относительной экспрессии исследуемых генов проводили с использованием сравнительного метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Проверка стабильности референсных генов-кандидатов

Для получения достоверных результатов ПЦР в реальном времени предварительно была проведена работа по выбору оптимальных референсных генов, экспрессия которых сопоставима в клетках гиппокампа контрольных крыс и животных, получавших NaF. Кандидатами в референсные гены для нормализации результатов ПЦР были выбраны *Pgk1*, *Gapdh*, *Ppia*, *Tbp*, *Helz* и *Eef1a1*. Экспрессию этих генов анализировали в программе RefFinder (<https://www.heartcure.com.au/reffinder>), которая суммирует результаты четырёх статистических алгоритмов – сравнительного Delta-Ct, geNorm, BestKeeper и NormFinder и ранжирует исследуемые гены по стабильности (Xie 2023).

Исходные уровни экспрессии исследуемых референсных генов в гиппокампе контрольных крыс и животных, потреблявших избыточные дозы фторида, значительно различались (рис. 6). При этом наиболее вариабельными генами оказались *Gapdh* (Ct от 18.73 до 25.12, SD = 1.602) и *Tbp* (Ct от 24.84 до 34.28, SD = 2.724), а самыми стабильными *Ppia* (Ct от 23.53 до 27.03, SD = 0.498), *Eef1a1* (Ct от 22.02 до 23.89, SD = 0.598) и *Helz* (Ct от 22.97 до 25.99, SD = 0.703).

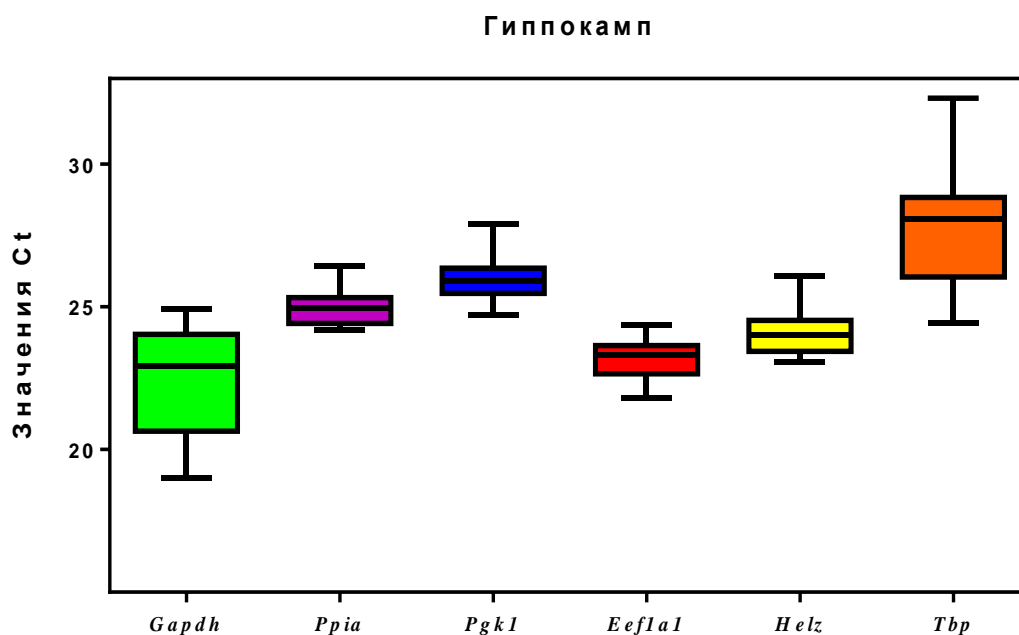


Рисунок 6. Уровни экспрессии исследуемых референсных генов в образцах гиппокампа крыс всех экспериментальных групп (n=28). Данные представлены в виде диаграммы boxplot.

Для более точного подбора стабильных в условиях эксперимента референсных генов использовали несколько статистических подходов, объединенных программой RefFinder. Согласно этим алгоритмам, наиболее стабильными генами в гиппокампе крыс, потреблявших

избыточные дозы фторида, являются гены *Ppia* и *Eef1a1*, напротив, наименее стабильные гены - *Tbp* и *Gapdh* (рис. 7).

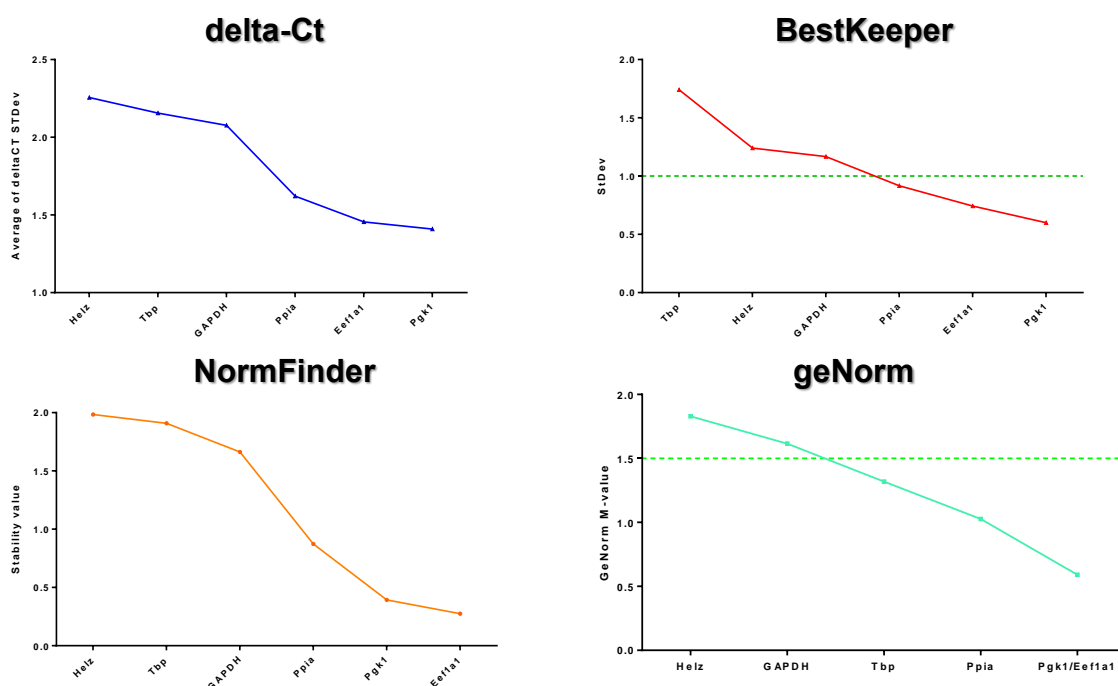


Рисунок 7. Значения коэффициентов алгоритмов, используемых для анализа стабильности экспрессии референсных генов, для каждого исследуемого гена (n=28).

Основываясь на результатах всех статистических подходов, референсными генами, наиболее подходящими для анализа изменений экспрессии целевых генов в гиппокампе крыс, подверженных воздействию фторида, являются *Ppia* и *Eef1a1* (рис. 8).

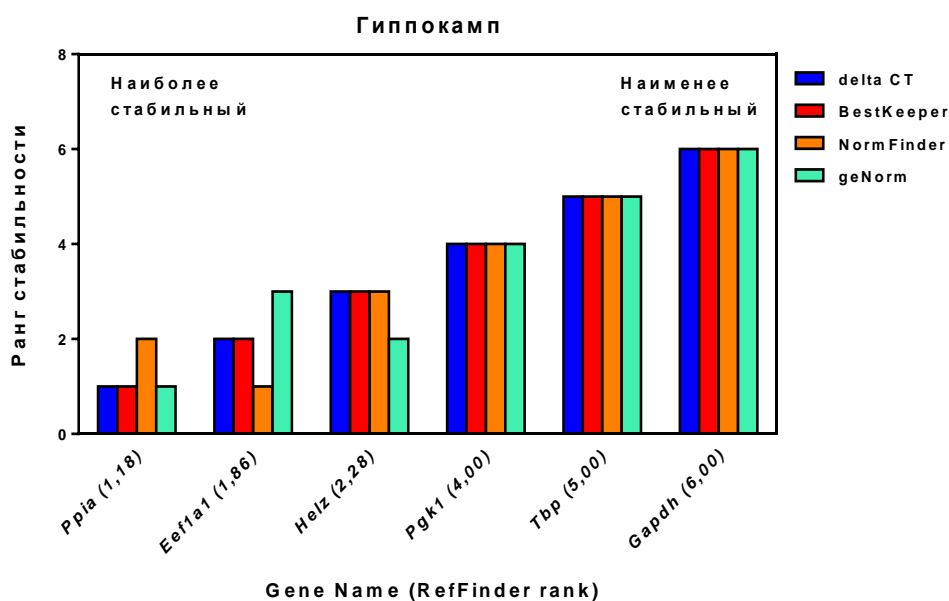


Рисунок 8. Результаты анализа стабильности референсных генов с помощью статистических алгоритмов, включенных в программу RefFinder. Гены расположены от наиболее стабильных к наименее стабильным. Значения в скобках представляют собой геометрические средние значения стабильности, рассчитанные с помощью четырех статистических алгоритмов и используемые для всестороннего ранжирования.

Иммуноблоттинг

Пробы гиппокампа гомогенизировали в буфере RIPA, содержащем коктейль ингибиторов протеаз и фосфатаз (Santa Cruz Biotechnology, США). Гомогенаты центрифугировали в течение 15 мин при 1000 g для осаждения ядерного материала и клеточных обрывков, а полученный супернатант центрифугировали (11000 g, 15 минут) для осаждения митохондрий. Вторичный супернатант разделяли на фракции, условно называемые цитозольными (содержащими в том числе микросомы и везикулы) и мембранными (содержащими преимущественно плазматические мембраны), для чего его центрифугировали 2.5 часа при 25000 g. Для определения содержания белка в образцах использовали метод Лоури.

Белки в пробах цитозольных и мембранных фракций денатурировали в буфере Лэммли (90 °C; 10 минут) и разделяли по молекулярной массе методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) в присутствии белкового маркера. В зависимости от молекулярной массы изучаемых белков использовали разделяющий гель с 10 % или 12 % акриламида. Для электрофореза использовали вертикальную камеру omniPAGE Mini (Clever Scientific Ltd., Великобритания) при значениях напряжения и силы тока 220 V и 150 mA, соответственно. Затем белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану в течение 60 мин при напряжении 100 V и силе тока 400 mA. Неспецифическое связывание мембраны блокировали с помощью 5%-го раствора обезжиренного молока в буфере Tris, содержащем 0.1 % Tween-20 (TTBS). Затем мембраны инкубировали с первичными антителами в течение 2 часов. Все антитела были произведены фирмой Cell Signaling Technology (США) и использовались в разведении 1:500. После отмытки мембраны обрабатывали вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (1:1000). Специфическое связывание белков визуализировали с помощью хемилюминесцентного раствора ECL (Cytiva, США). Содержание белка в пробах вычисляли денситометрически в программе Quantity One (BioRad, США) и нормировали относительно GAPDH в цитозольных и β -актина в мембранных фракциях.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы GraphPad Prism 6 (США). Нормальность распределения определяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Выбросы в выборке идентифицировали с помощью критерия Рауса с достоверностью $\alpha=0.05$. Статистически достоверные различия между исследуемыми группами определяли с помощью анализа ANOVA и критерия Tukey's или U-критерия Манна-Уитни. Данные представлены как средние \pm стандартные ошибки средних (SE). Различия при $p < 0.05$ считалась статистически значимыми.

Результаты и обсуждение

Тест распознавания нового объекта (РНО)

По значению коэффициента дискриминации можно сделать вывод о том, идентифицирует ли животное незнакомый предмет как новый и смогла ли крыса запомнить объект, уже предъявлявшийся ранее. Более низкое значение коэффициента дискриминации указывает на снижение способности к запоминанию и, соответственно, нарушение процессов формирования памяти.

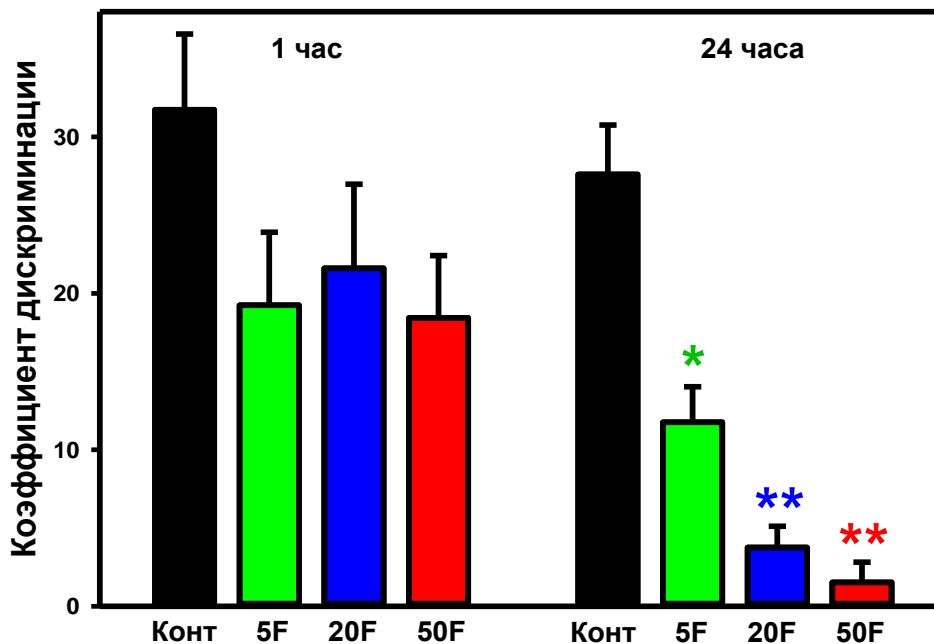


Рисунок 3. Средние значения коэффициента дискриминации для крыс из групп, потреблявших воду с различным содержанием фторида. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с контрольной группой (one-way ANOVA, $n=10$).

В 1-й день теста значение коэффициентов дискриминации для животных из групп, получавших различные дозы F^- , были ниже, чем у крыс из контрольной группы, однако эти различия не были статистически достоверными, т.е. через час после ознакомления крысы всех групп могли различить новый и знакомый объекты. Однако во 2-й день теста снижение значений коэффициентов дискриминации в группах крыс, получавших избыточные дозы фторида, относительно контрольной группы достигало статистической значимости (рис. 3), что свидетельствует о снижении функций долговременной памяти после потребления фторида.

Водный тест Морриса

Время, необходимое на поиск платформы для крыс из групп, получавших 5 и 50 мг/л F⁻, достоверно увеличивалось с 3-го дня теста, что указывает на снижение способности к пространственному обучению (рис. 4). Однако у крыс из группы 20 мг/л F⁻ не было выявлено достоверных различий по сравнению с контролем, что может быть результатом малой выборки и индивидуальных отличий животных. Несмотря на это, полученные данные свидетельствуют о том, что длительное потребление фторида может приводить к снижению способности к формированию долговременной памяти.

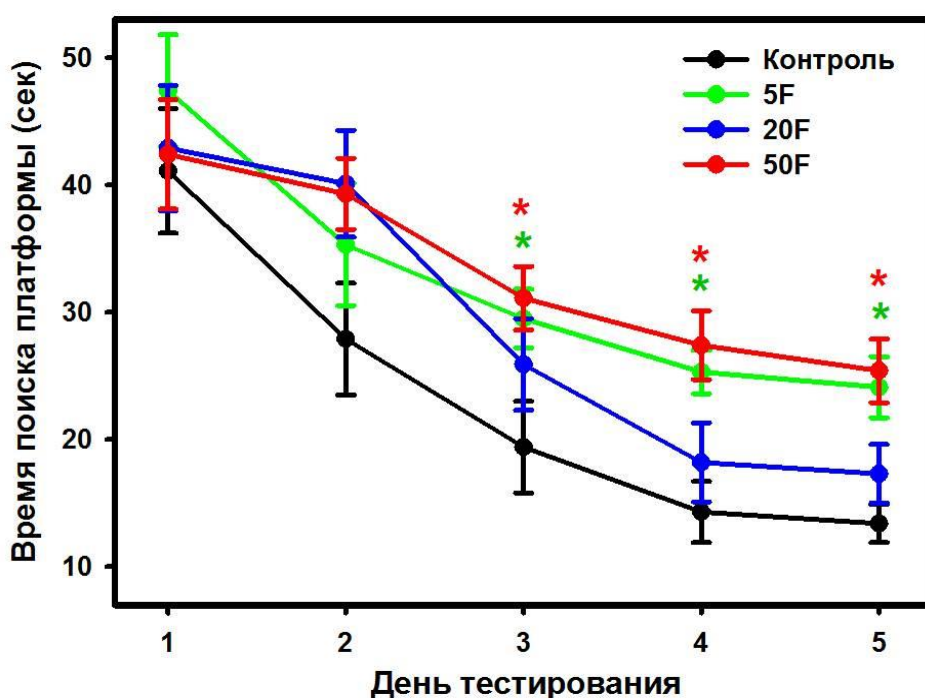


Рисунок 4. Среднее время поиска платформы крысами из групп, потреблявших воду с различным содержанием фторида. * $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой (one-way ANOVA, $n=10$).

В целом, результаты поведенческих тестов согласуются с существующими литературными данными. Так, аналогичные нашим результаты теста РНО были получены на самцах мышей, которые в течение 6 месяцев получали воду со 100 мг NaF/л (Han et al. 2014). В ряде статей с помощью теста РНО показали ухудшение долговременной памяти у крыс, подвергшихся воздействию 100-120 мг /л NaF в течение 4-8 недель, однако применяемые модификации теста не предусматривали оценку кратковременной памяти (Swamy et al 2023; Jaiswal et al 2020). Снижение способности к пространственному обучению в водном тесте Морриса было выявлено

у крыс, подверженных интоксикации 100-270 мг /л NaF в течение 21-28 дней (Zhang et al. 2023; Mirsaeed-Ghazi et al. 2021). Однако в водном тесте Морриса мы не обнаружили достоверного нарушения долговременной памяти у крыс, получавших 20 мг/л F⁻. Вероятнее всего, это связано с индивидуальными особенностями животных. Хотя крысы были разделены на группы случайным образом, в эту группу могли попасть животные, менее чувствительные к действию ионов фтора. Второй причиной может быть использование небольшой выборки животных.

Потребление избыточных доз фторида крысами приводит к снижению числа нейронов гиппокампа

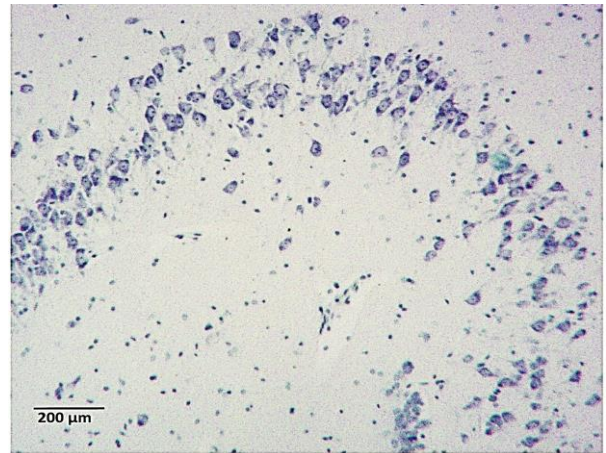
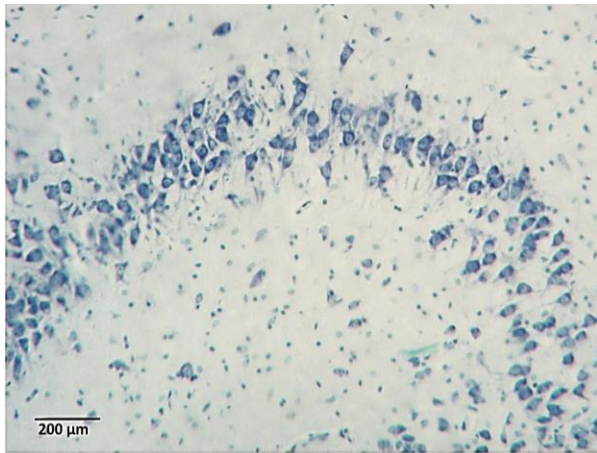
На срезах мозга контрольных крыс после окраски по методу Ниссля видно, что нейроны гиппокампа имеют упорядоченное расположение и чёткую ориентацию как в зоне СА1, так и в зоне СА3. В гиппокампе крыс из групп, подверженных действию фторида, заметно нарушение организации клеточного слоя (рис. 5А). Кроме того, после подсчета клеток было выявлено статистически значимое снижение числа нейронов у крыс, потреблявших фторид, по сравнению с контрольной группой (рис. 5Б).

A

CA3

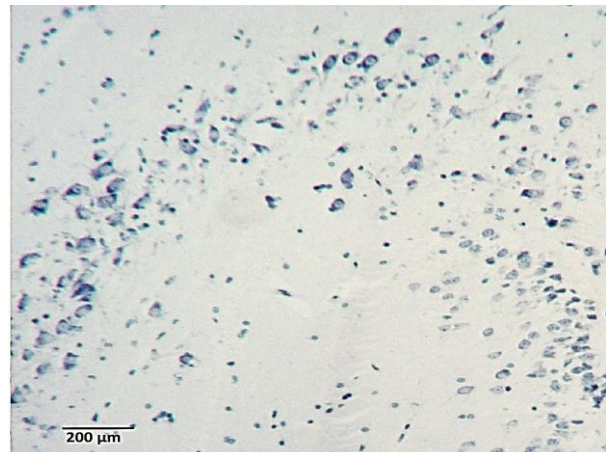
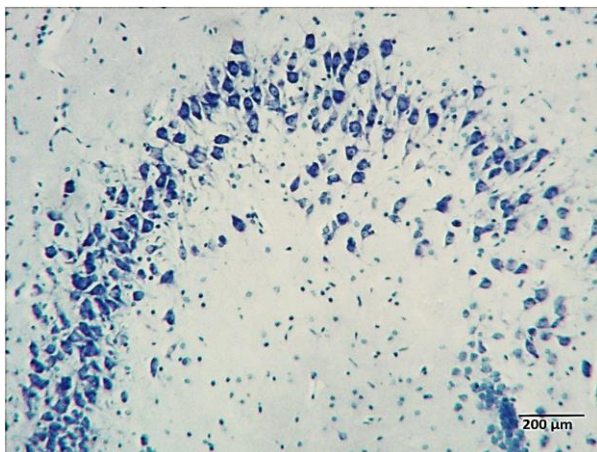
Контроль

5F



20F

50F



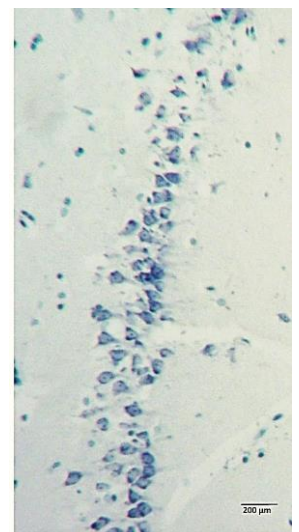
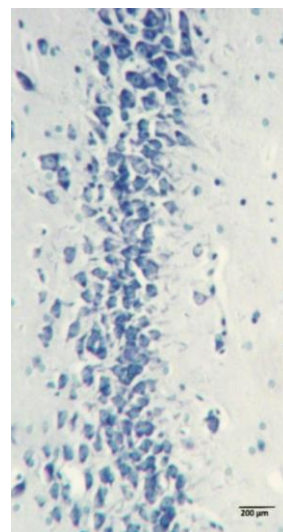
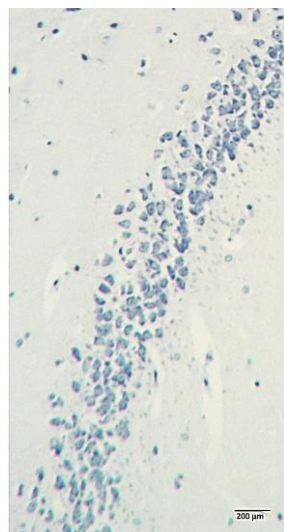
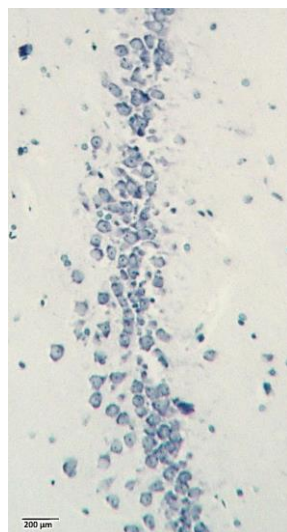
CA1

Контроль

5F

20F

50F



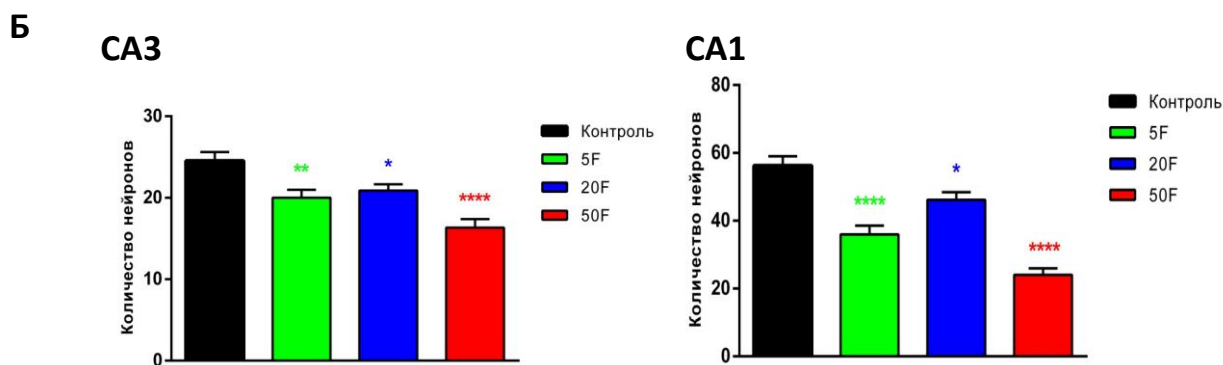


Рисунок 5. А: Типичный вид нейронов зон CA3 и CA1 гиппокампа крыс из каждой группы (x10). Окрашивание толуидиновым синим по методу Ниссля. Увеличение x40. **Б:** Среднее число нейронов в зонах CA3 и CA1 гиппокампа крыс. Подсчет осуществлялся по 3 снимкам каждой зоны (x40) для каждой крысы. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$ по сравнению с контрольной группой (one-way ANOVA, $n=10$).

Аналогичное снижение числа нейронов в разных областях мозга животных, подверженных воздействию фторида, и их потомства наблюдалось ранее в ряде работ (Ge et al. 2018; Wang et al. 2017; Pulungan et al. 2018). В целом, подобное снижения количества нейронов может приводить к нарушению связей между нейронами зон гиппокампа CA1 и CA3 и тем самым являться одной из ключевых причин нарушения когнитивных функций.

Изменение экспрессии маркеров гибели клеток в гиппокампе крыс, потреблявших избыточные дозы NaF

У крыс, получавших высокие дозы фторида, было выявлено снижение экспрессии анти-апоптотического белка Bcl-2 при одновременном увеличении содержания про-апоптотического белка Bax (рис. 9А и 9Б). Кроме того, наблюдалось статистически значимое повышение уровня экспрессии гена *Bax* на фоне стабильной экспрессии *Bcl-2* (рис. 9В), что может смещать соотношение между синтезом этих белков уже на уровне транскрипции. Полученные данные указывают на то, что одной из причин наблюдаемого снижения числа нейронов гиппокампа при потреблении фторида может быть активация апоптоза.

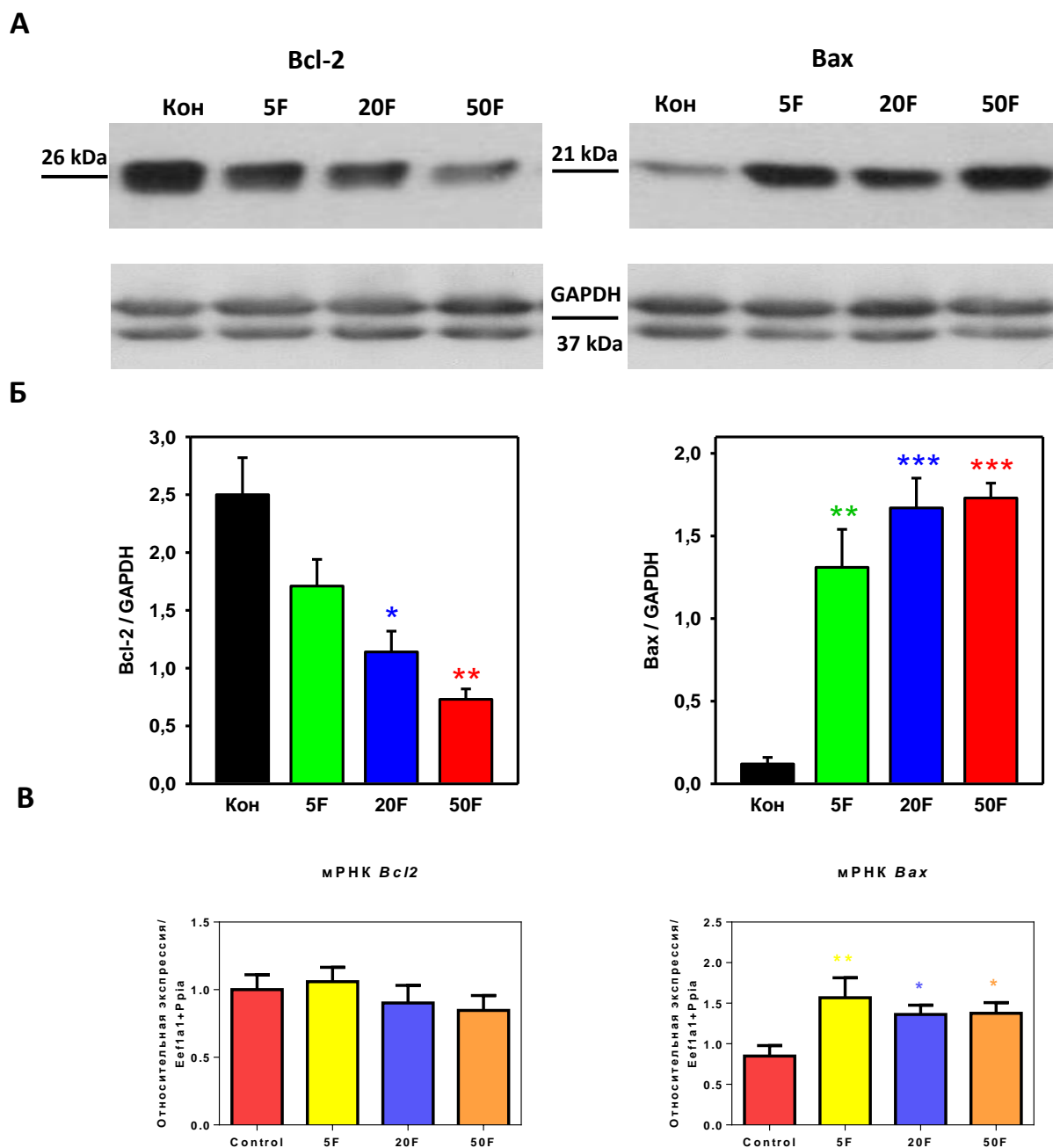


Рисунок 9. А: типичные иммуноблоты для одного животного из каждой группы. Б: Средние данные уровней *Bcl-2* и *Bax* в клетках гиппокампа (по отношению к *GAPDH*) ($n=7-8$). В: Экспрессия генов *Bcl-2* и *Bax* в клетках гиппокампа крыс всех экспериментальных групп ($n=10$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ по сравнению с контролем.

Кроме того, длительное потребление избытка фторида приводит к снижению содержания про-каспазы-3 в клетках гиппокампа крыс из групп 20F и 50F и повышению уровня активной каспазы-3 во всех экспериментальных группах по сравнению с контролем (рис. 10А и 10Б). При этом содержание мРНК каспазы-3 оставалась стабильным (рис. 10В).

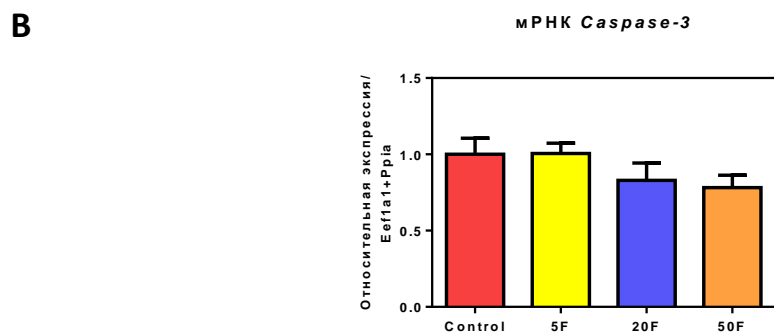
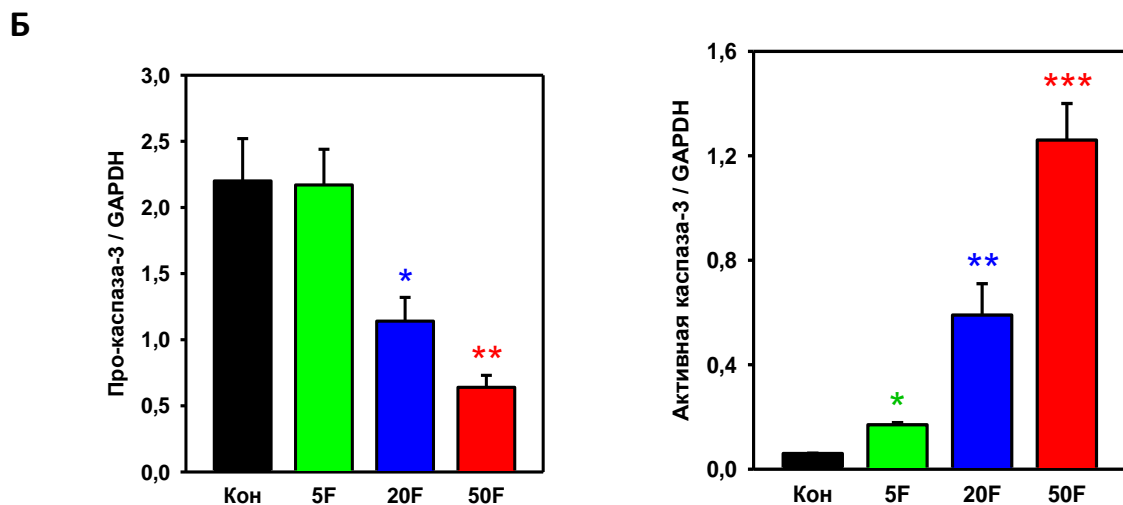
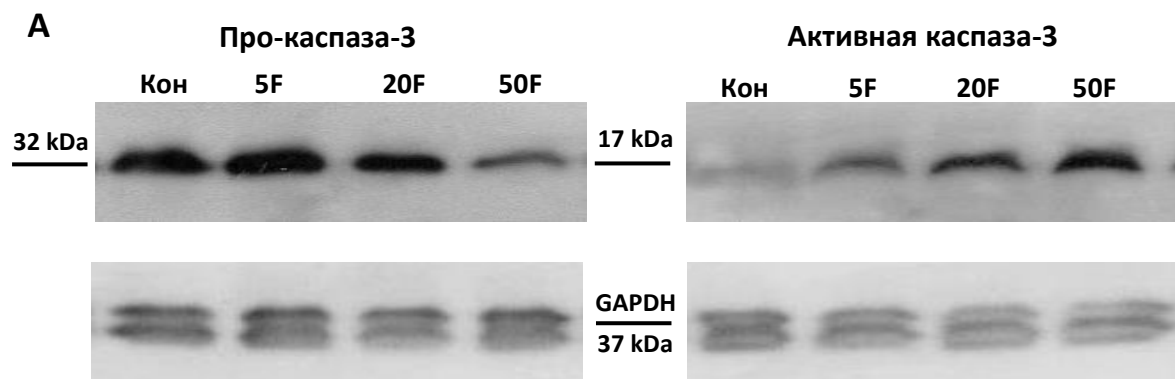


Рисунок 10. А: Типичные иммуноблотты про-каспазы-3 и активной каспазы-3 для одного животного из каждой группы. Б: Средние данные уровней про-каспазы-3 и активной каспазы-3 в клетках гиппокампа (по отношению к GAPDH; n=7). В: Экспрессия гена *Caspase-3* в клетках гиппокампа крыс всех экспериментальных групп (n=10). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ по сравнению с контролем.

Таким образом, полученные результаты подтверждают способность ионов фтора индуцировать апоптотическую гибель клеток. Полученные результаты согласуются с литературными данными, в которых была выявлена активация процессов апоптоза в клетках гиппокампа крыс после воздействия 100мг /л NaF *in vitro* и *in vivo* (Tang et al. 2023). Однако каспазы участвуют не только в процессе апоптоза, поэтому мы не можем утверждать, что он является единственным путем гибели клеток после длительного потребления фторида.

Длительное воздействие фторида приводит к изменению экспрессии AMPA рецепторов в клетках гиппокампа крыс

Уровни экспрессии генов *Gria1*, *Gria2* и *Gria3* в клетках гиппокампа крыс из всех групп достоверно не различались (рис. 11). Содержание GluA1 субъединицы AMPA рецепторов также оставалось стабильным в обеих субклеточных фракциях (рис. 12). Однако в цитозоле клеток гиппокампа крыс, получавших 20 и 50 мг/л фторида, наблюдалось достоверное увеличение уровня фосфорилированной формы GluA1 (Ser845), хотя в мембранной фракции статистически значимых изменений не было выявлено (рис. 12).

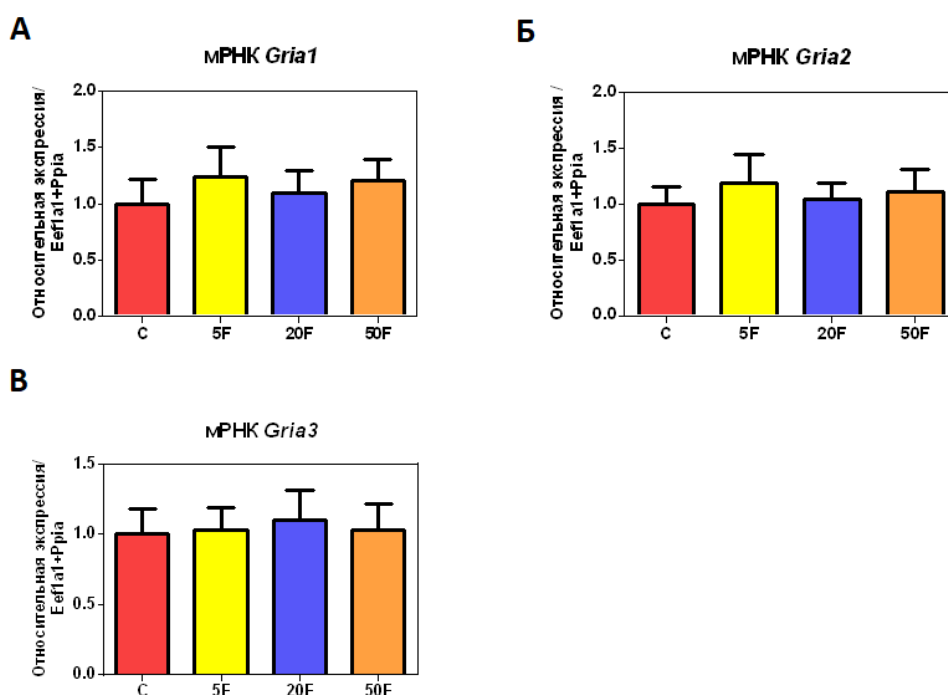


Рисунок 11. Относительная экспрессия генов *Gria1* (А), *Gria2* (Б) и *Gria3* (В) в гиппокампе крыс, получавших различные дозы фторида (относительно *Eef1a+Ppia*; n=10).

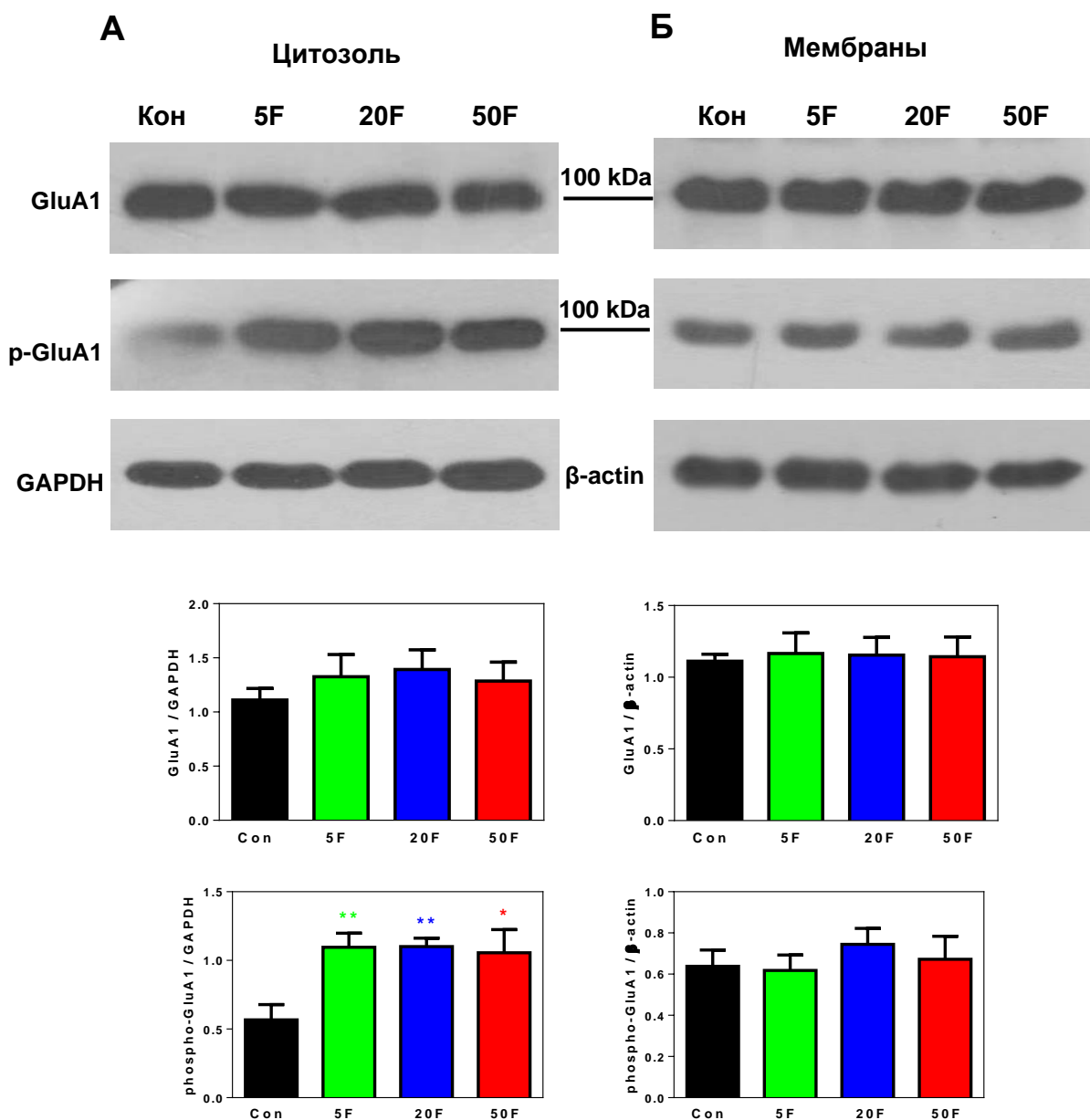


Рисунок 12. А: Типичные иммуноблоты и среднее содержание нативной и фосфорилированной (Ser845) форм GluA1 субъединицы в цитозольной фракции гиппокампа крыс. **Б:** Типичные иммуноблоты и среднее содержание общей и фосфорилированной (Ser845) форм GluA1 субъединицы в мембранах клеток гиппокампа (n=8). Con - контроль, 5F – 5 ppm F⁻, 20F – 20 ppm F⁻, 50F – 50 ppm F⁻, * p < 0.05, ** p < 0.01 по сравнению с контролем.

Экспрессия как нативной, так и фосфорилированной формы (Tyr869/Tyr873/Tyr876) субъединицы GluA2 повышалась в цитозоле, но снижалась в мембранной фракции (рис.13).

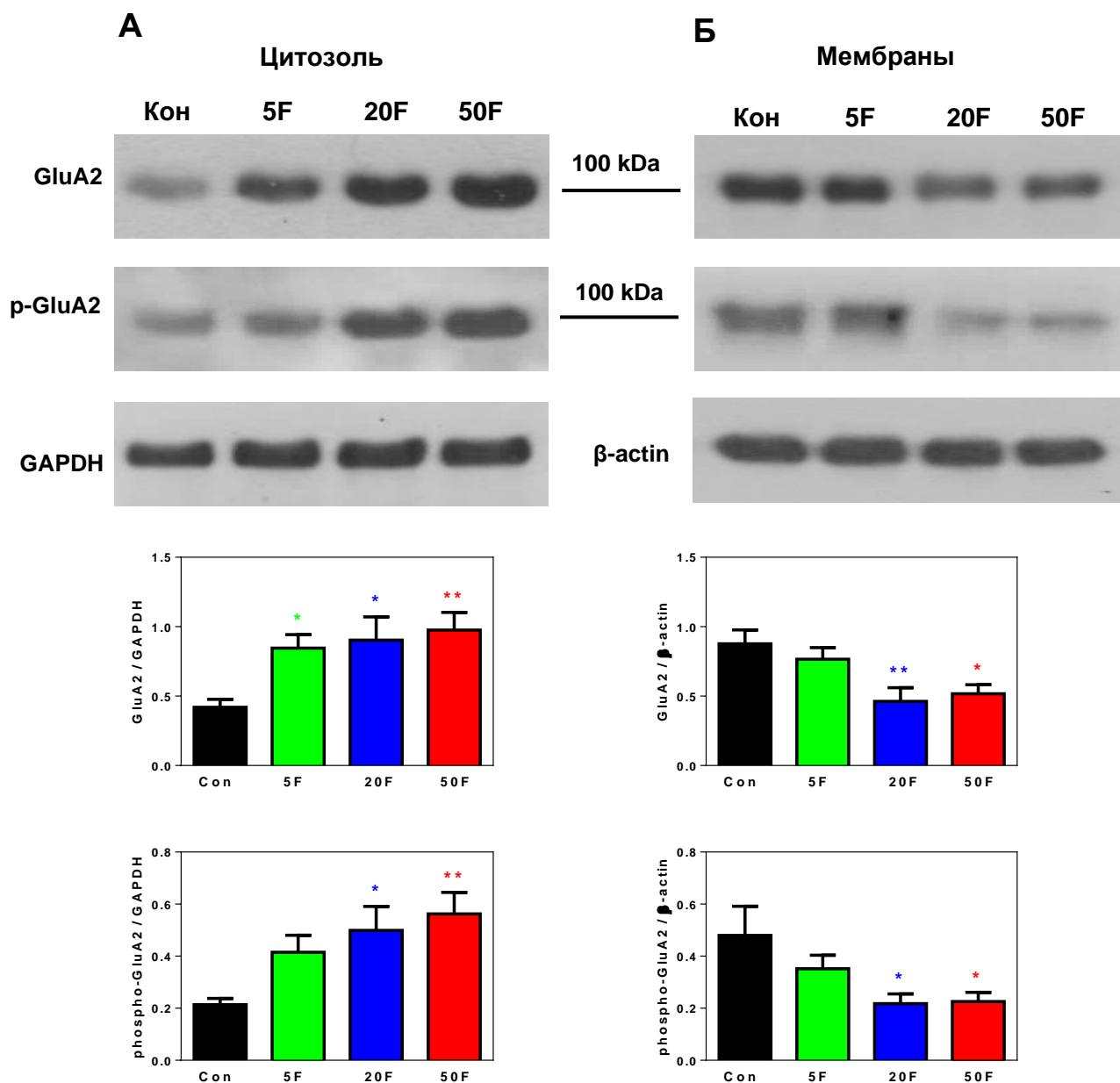


Рисунок 13. А: Типичные иммуноблоты и среднее содержание нативной и фосфорилированной (Tyr869/Tyr873/Tyr876) форм GluA2 субъединицы в цитозольной фракции гиппокампа крыс после интоксикации фторидом. **Б:** Типичные иммуноблоты и среднее содержание общей и фосфорилированной форм GluA2 субъединицы в мембранах клеток гиппокампа (n=8). * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ по сравнению с соответствующим контролем.

Напротив, содержание GluA3-субъединицы уменьшалось в цитозоле, но увеличивалась в мембранной фракции клеток гиппокампа крыс из групп 20 и 50 ppm F⁻ (рис. 14).

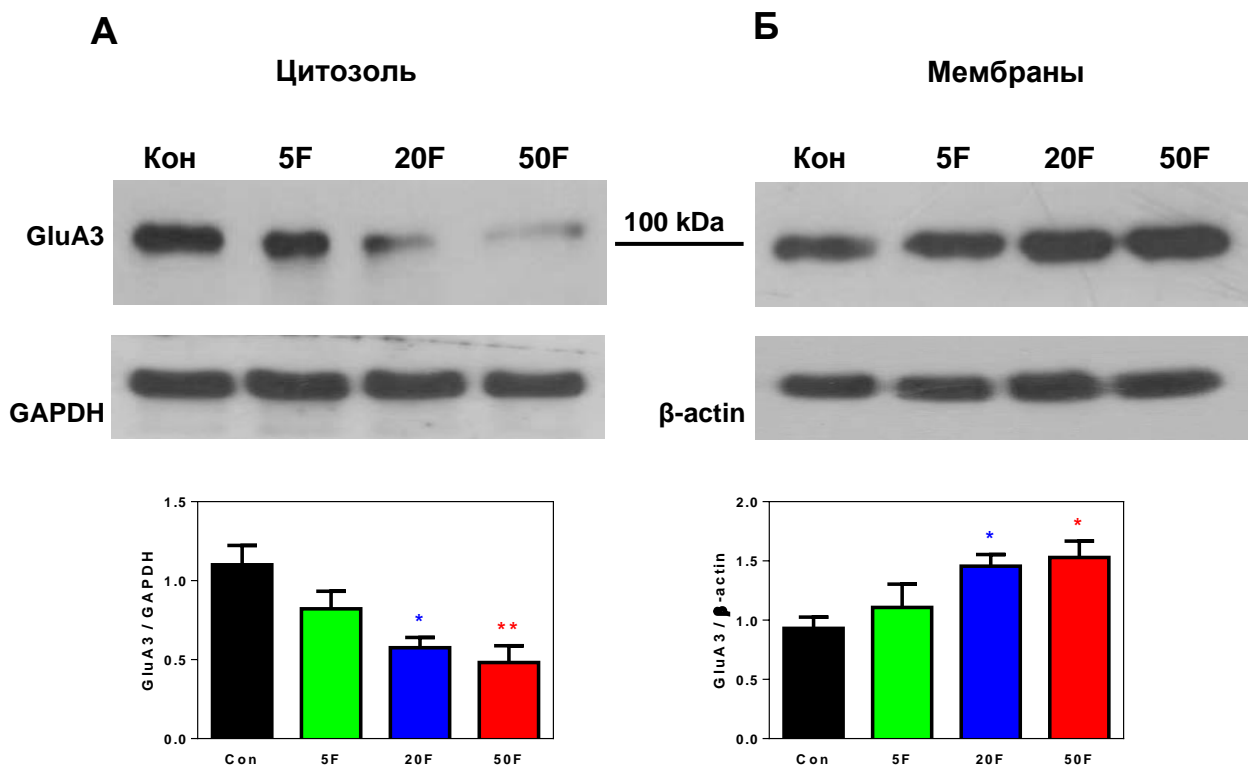


Рисунок 14. А: Типичные иммуноблоты и среднее содержание GluA3 субъединицы в цитозольной фракции гиппокампа крыс под действием F⁻. Б: Типичные иммуноблоты и среднее содержание GluA3-субъединицы в мембранах клеток гиппокампа (n=8). * p < 0.05, ** p < 0.001 по сравнению с соответствующим контролем.

Таким образом, длительное потребление фторида крысами сопровождалось интернализацией GluA2-субъединиц и транслокацией к мембранам GluA3, при этом уровень GluA1-субъединиц и экспрессия генов, кодирующих все исследуемые субъединицы, оставались стабильными. Такие изменения могут указывать на дополнительное встраивание проницаемых для Ca²⁺ субъединиц AMPA рецепторов в мембраны и изменение синаптической функции AMPA рецепторов.

В настоящее время литературных данных о влиянии избыточного потребления фторида на экспрессию AMPA рецепторов в тканях мозга или клеточных культурах чрезвычайно мало, поэтому мы не можем провести полноценный сравнительный анализ. В одной из немногих посвященных этой теме работ было показано снижение содержания GluA2 субъединицы в микроглиальных клетках гиппокампа (Yang et al. 2018). Тем не менее известно, что изменение количества и субъединичного состава AMPA рецепторов обеспечивает регуляцию различных типов синаптической пластичности, тем самым оказывая различное влияние на когнитивные способности (Wu et al. 2022). Так, преобладание GluA1-содержащих AMPA рецепторов,

проницаемых для Ca^{2+} , в синапсах было выявлено при различных неврологических нарушениях (Wu et al. 2022). Кроме того, важную роль в регуляции свойств и функции AMPA рецепторов играет фосфорилирование входящих в их состав субъединиц по различным аминокислотным остаткам. Например, фосфорилирование субъединиц GluA1 по серину 845 и серину 831 повышает вероятность открытия и проводимость канала, приводя тем самым к понижению порога долговременной потенциации (ДП) (Corti et al. 2023). А фосфорилирование по серину 845 различных субъединиц AMPA рецепторов регулирует деградацию и субклеточную локализацию рецепторов, участвуя в процессах долговременной депрессии (ДД) (Caudal et al. 2016).

Длительное воздействие фторида приводит к изменению экспрессии NMDA рецепторов в клетках гиппокампа крыс на уровнях транскрипции и трансляции

Экспрессия GluN1 субъединицы NMDA-рецепторов оставалась стабильной как на уровне транскрипции (рис.15А), так и на уровне трансляции (рис. 15Б и 15В). Содержание фосфо-GluN1(Ser890) также не изменялось (рис. 15Б и 15В).

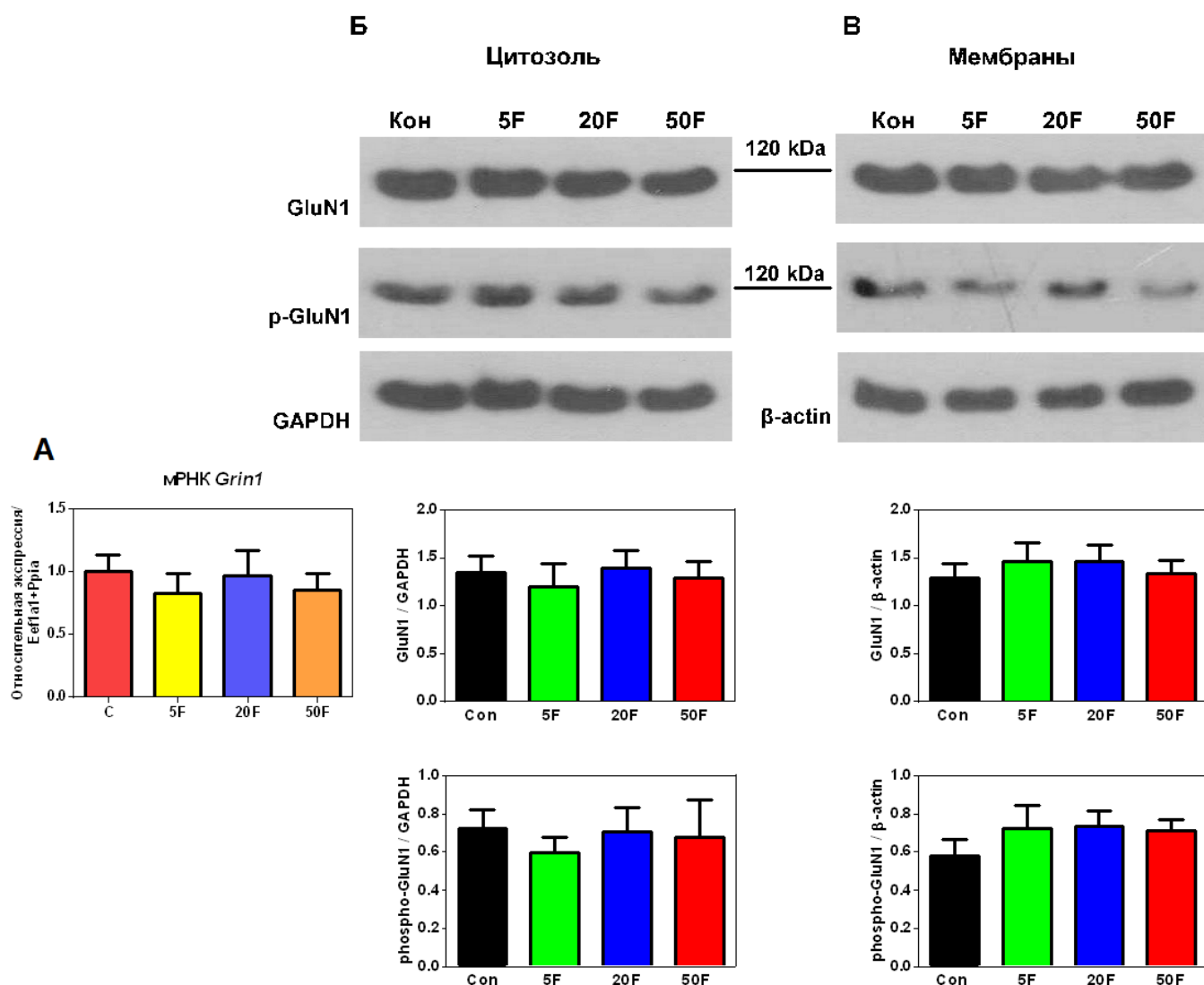


Рисунок 15. **А:** Относительная экспрессия гена *Grin1* в гиппокампе крыс (по отношению *Eef1a+Ppia*; n=10). **Б и В:** Типичные иммуноблоты и среднее содержание нативной и фосфорилированной (Ser890) форм GluN1 субъединицы в цитозольной и мембранной фракциях гиппокампа крыс под действием F, соответственно (n=8).

В клетках гиппокампа крыс, получавших избыточные дозы фторида, наблюдалось увеличение уровня мРНК *Grin2a* (рис. 16А), также повышалось содержания общей и фосфорилированной форм (Tyr1246) субъединицы GluN2A (рис. 16Б и 16В).

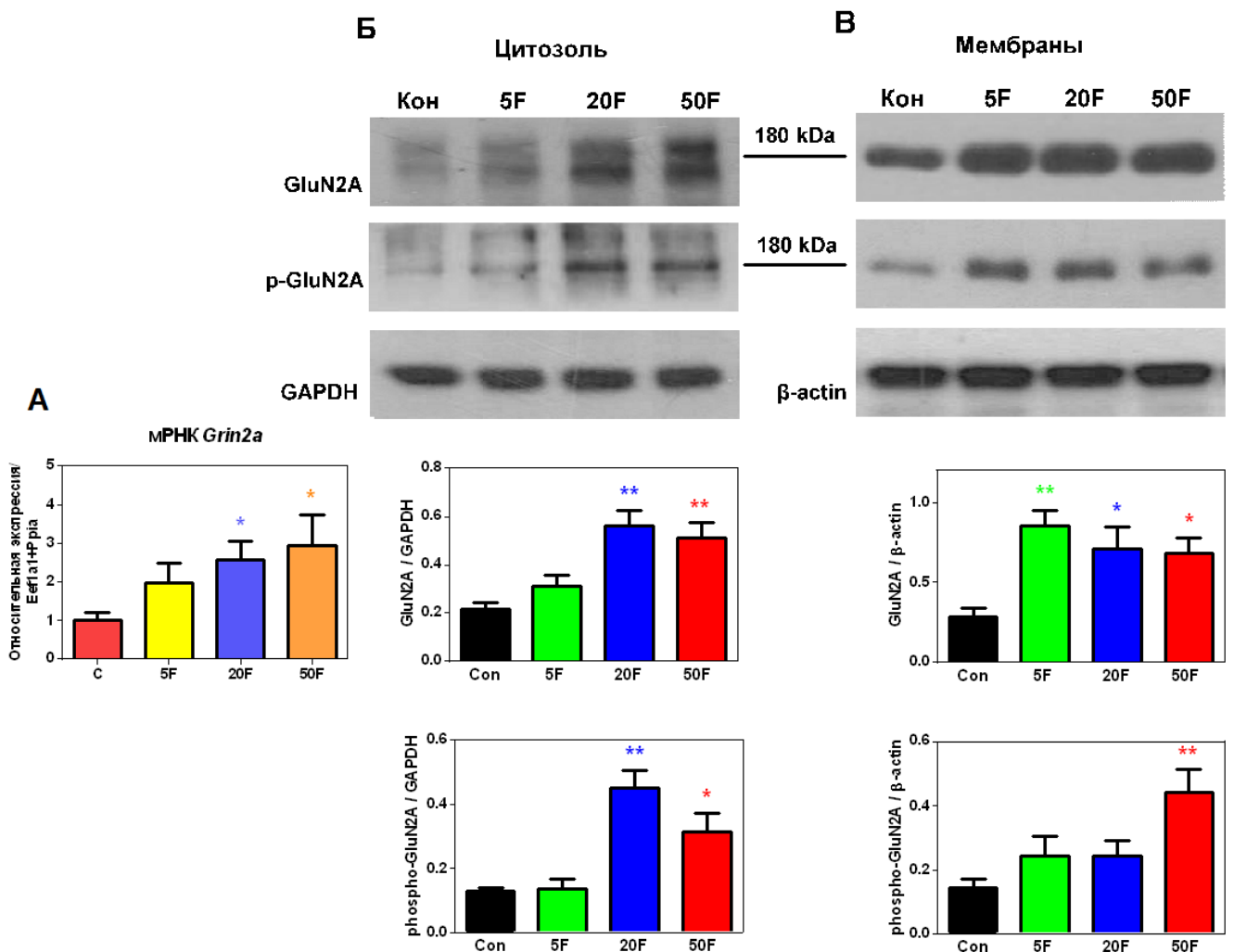


Рисунок 16. **А:** Относительные уровни экспрессии гена *Grin2a* в гиппокампе крыс, потреблявших различные дозы (по отношению к *Eef1a+Ppia*; n=10). **Б и В:** Типичные иммуноблоты и среднее содержание нативной и фосфорилированной (Tyr1246) форм GluN2A субъединицы в цитозольной и мембранной фракциях гиппокампа крыс, получавших F-, соответственно (n=8). * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ по сравнению с соответствующим контролем.

Содержание мРНК *Grin2b* статистически значимо повышалось в клетках гиппокампа крыс из групп 20F и 50F (рис. 17А), также наблюдалось увеличение содержания субъединиц GluN2В в цитозоле, но не в мембранах (рис. 17Б и 17В).

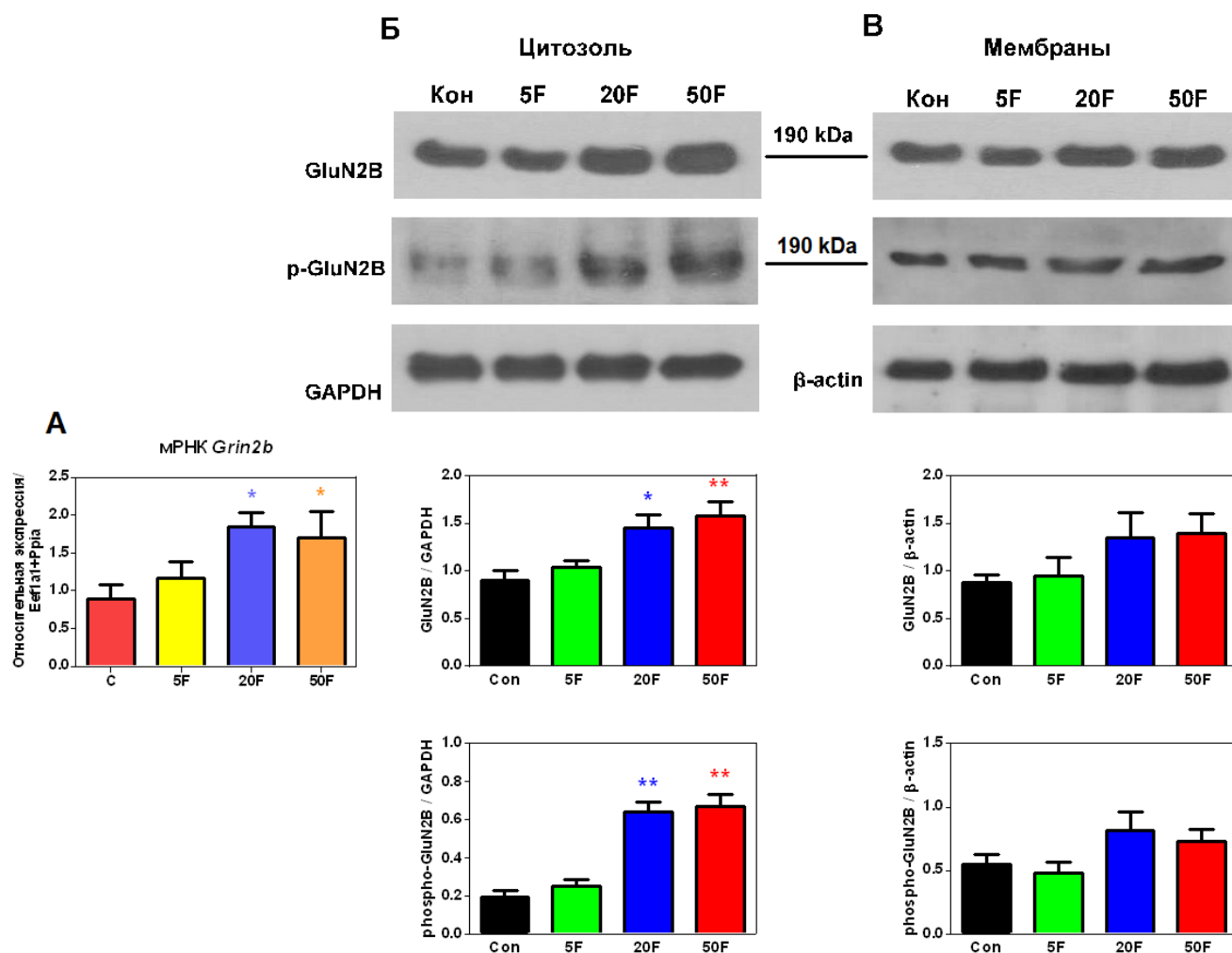


Рисунок 17. А: Относительная экспрессия гена *Grin2b* в гиппокампе крыс (n=10). **Б и В:** Типичные иммуноблоты и среднее содержание нативной и фосфорилированной (Tyr1472) форм GluN2В субъединицы в цитозольной и мембранной фракциях гиппокампа крыс, под действием фторида, соответственно (n=8). * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ по сравнению с соответствующим контролем.

Таким образом, длительное потребление фторида крысами не оказывало влияния на экспрессию GluN1 субъединицы NMDA рецепторов и кодирующих их генов. При этом наблюдалось повышение содержания мРНК и/или белка нативных и фосфорилированных форм других субъединиц в цитозольной и/или мембранной фракциях гиппокампа. Полученные данные свидетельствуют об изменениях соотношения различных субъединиц NMDA рецепторов,

которые типичны для нейродегенеративных процессов. Хотя известно, что сдвиг в соотношении GluN2A/GluN2B субъединиц играет ключевую роль в процессах обучения (Cercato et al. 2017), подобные изменения наблюдаются при различных неврологических патологиях и когнитивных нарушениях и могут быть вызваны повышением уязвимости нейронов к эксайтотоксичности (Acutain et al. 2021).

Длительное потребление фторида приводило к повышению экспрессии сигнальных молекул каскада кальпаина-1 в клетках гиппокампа крыс

В клетках гиппокампа крыс, получавших избыток фторида, экспрессия гена *Capn1* оставалась неизменной, однако наблюдалось уменьшение содержания кальпаина-1 в цитозоле и увеличение в мембранах (рис. 18), что может указывать на его активацию. Такие же изменения были характерны для ГТФазы RhoA (рис. 19).

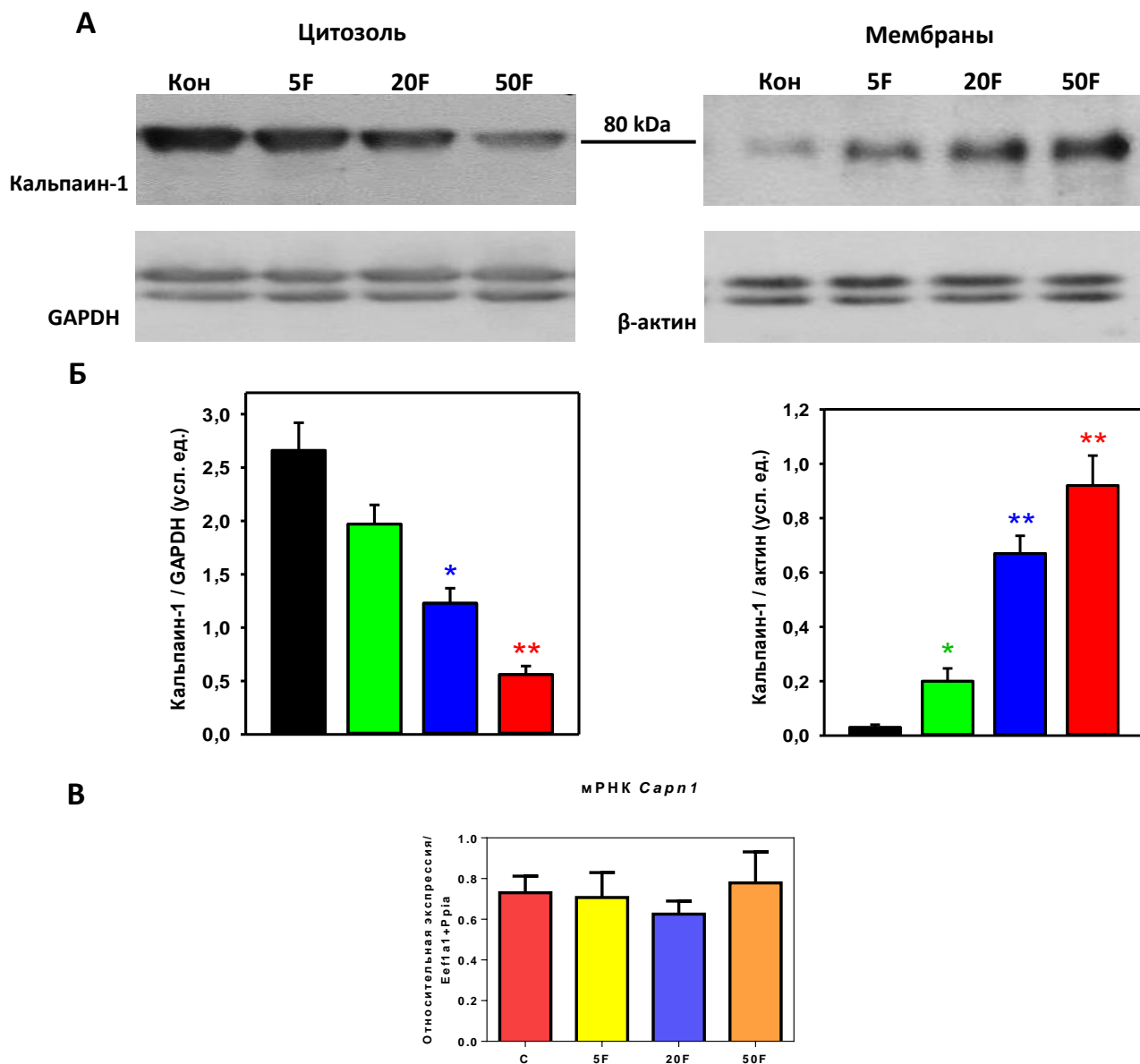


Рисунок 18. А и Б: Типичные иммуноблоты и среднее содержание кальпаина-1 в цитозольных и мембранных фракциях клеток гиппокампа (относительно GAPDH и актина для цитозоля и мембран, соответственно; $n=8$). **В:** Относительные уровни экспрессии гена *Capn1* в гиппокампе крыс, потреблявших различные дозы (по отношению к *Eef1a+Pria*; $n=10$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, по сравнению с контролем.

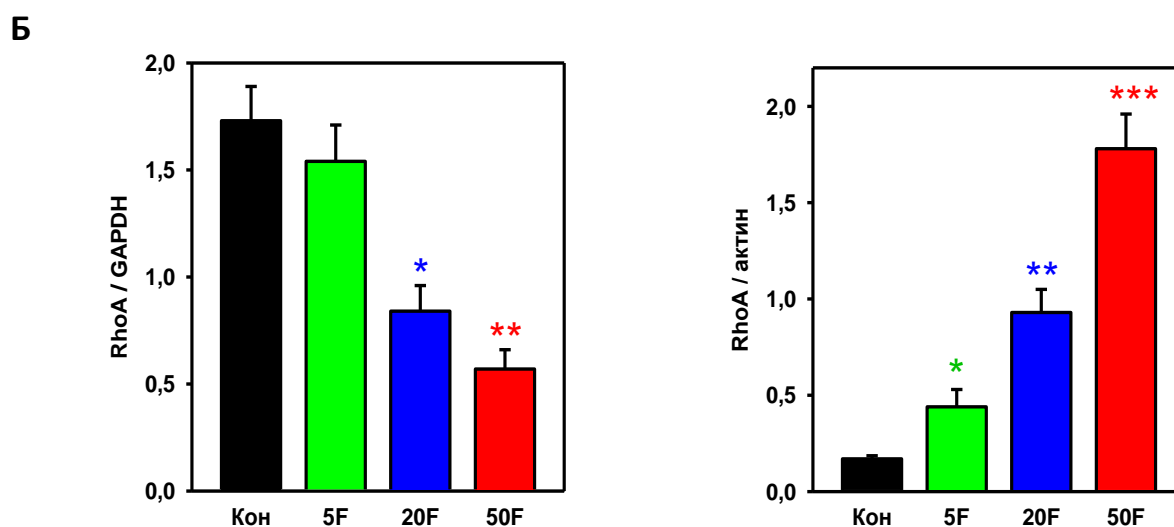
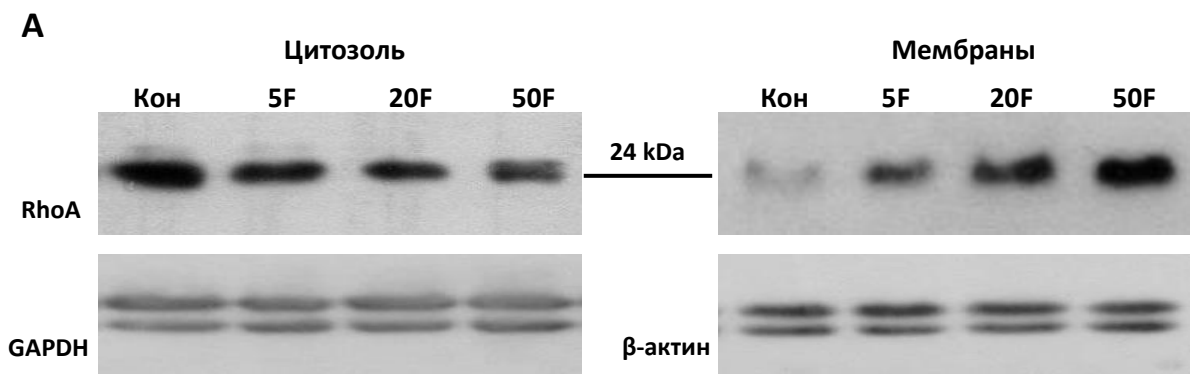


Рисунок 19. А и Б: Типичные иммуноблоты и среднее содержание RhoA в цитозольных и мембранных фракциях клеток гиппокампа (по отношению к GAPDH и актину для цитозоля и мембран, соответственно; n=8). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ по сравнению с контролем.

Кроме того, в клетках гиппокампа крыс из групп 20 и 50F наблюдалось уменьшение содержания фосфатазы PHLPP1 (рис. 19), которое указывает на его протеолиз с образованием активной формы.

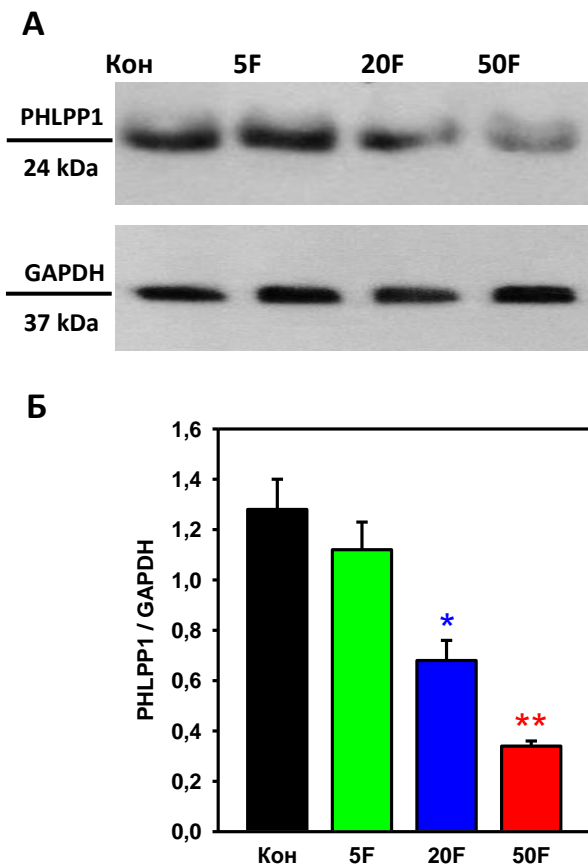


Рисунок 19. А и Б: Типичные иммуноблоты и среднее содержание PHLPP1 в клетках гиппокампа (n=8). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с контролем.

Содержание общей ERK1/2 оставалось стабильным, но было выявлено повышение экспрессии фосфо-ERK1/2 в клетках гиппокампа крыс групп 20 и 50F (рис. 20).

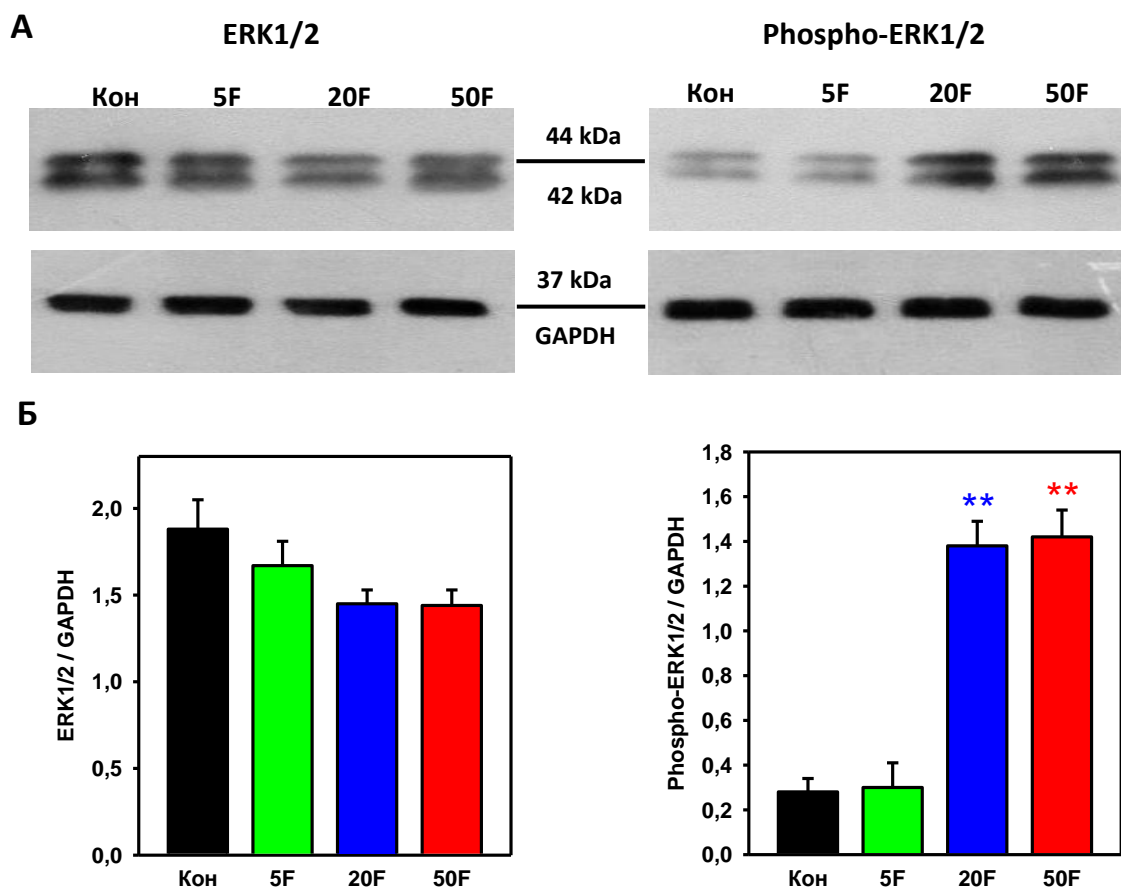


Рисунок 20. А и Б: Типичные иммуноблоты и среднее содержание общей ERK1/2 и фосфо-ERK1/2 в цитозольных фракциях клеток гиппокампа (n=10). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с контролем.

Таким образом, длительное потребление фторида крысами приводит к активации кальпаина-1 и его посредников. Излишняя стимуляция каскада кальпаина вследствие постоянного избыточного поступления кальция в клетки может приводить к протеолизу различных цитозольных и мембранных структур и запуску программы гибели клеток, в частности, по пути апоптоза. Подобная активация посредников сигнального каскада кальпаина-1 было показано при различных патологиях, таких как инсульт, нейродегенерация, повреждения ЦНС различного генеза, и связано с изменениями активности NMDA рецепторов (Zhang et al. 2018; He et al. 2019; Vaudry 2019). Излишняя стимуляция кальпаина-1 вследствие постоянного избыточного поступления кальция в клетки может разрушать как цитозольные, так и мембранные структуры и приводить к запуску программы гибели, в том числе по пути апоптоза.

В целом, в основе токсического влияния ионов фтора на клетки гиппокампа крыс лежат как универсальные механизмы гибели клеток, так и изменения активности внутриклеточных сигнальных молекул, участвующих в процессах синаптической пластичности и долговременной

потенциации и критически необходимых для формирования долговременной памяти - кальпаина-1, его эффекторов, AMPA и NMDA рецепторов.

Выводы

- 1) Длительное потребление высоких доз фтора привело к снижению когнитивных способностей у крыс, в том числе к нарушению способности к обучению и формированию долговременной памяти.
- 2) Избыточное поступление фтора в организм привело к достоверному снижению числа нейронов в зонах CA3 и CA1 гиппокампа, что может нарушать связь между зонами, являясь одной из ключевых причин снижения когнитивных способностей.
- 3) Гибель нейронов сопровождалась увеличением экспрессии про-апоптотического белка Вах и одновременным снижением содержания анти-апоптотического белка Bcl-2 в клетках гиппокампа, что может свидетельствовать об активации апоптоза под действием ионов фтора.
- 4) Избыточное потребление фторида крысами не оказало влияния на экспрессию генов *Gria1-Gria3* AMPA рецепторов в клетках гиппокампа, но привело к изменению соотношения GluA1, GluA2 и GluA3 субъединиц в мембранах и степени их фосфорилирования, что может приводить к преобладанию Ca²⁺-проницаемых AMPA рецепторов в мембранах и являться причиной увеличения входа Ca²⁺ в клетки и повреждения нейронов.
- 5) В клетках гиппокампа крыс, получавших избыток фтора, не изменялась экспрессия гена и белка GluN1 субъединицы, но увеличивалась экспрессия генов *Grin2a* и *Grin2b* или степень фосфорилирования GluN2A и GluN2B субъединиц NMDA рецепторов, что может приводить к изменению соотношения числа этих рецепторов, содержащих GluN2A и GluN2B субъединицы, в мембранах.
- 6) Хроническое отравление фтором приводит к активации и внутриклеточной транслокации протеазы кальпаина-1 и его эффекторов - ГТФазы RhoA, регуляторной фосфатазы PHLPP1, протеинкиназы ERK1/2, что может указывать на гиперстимуляцию каскада кальпаина-1, связанную с изменениями активности NMDA рецепторов.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи

1. Agalakova N. I., Nadei O.V. Inorganic fluoride and functions of brain //Critical Reviews in Toxicology. – 2020. – Т. 50. – №. 1. – С. 28-46.

2. Nadei O. V., Khvorova I. A., Agalakova N. I. Cognitive decline of rats with chronic fluorosis is associated with alterations in hippocampal calpain signaling //Biological trace element research. – 2020. – Т. 197. – С. 495-506.
3. Надей О.В., Иванова Т.И., Суфиева Д.А., Агалакова Н.И. Морфологические изменения нейронов гиппокампа крыс как результат избыточного потребления фтора //Журнал анатомии и гистопатологии. – 2020. – Т. 9. – №. 2. – С. 53-60.
4. Nadei O.V., Agalakova N. I. Optimal Reference Genes for RT-qPCR Experiments in Hippocampus and Cortex of Rats Chronically Exposed to Excessive Fluoride //Biological Trace Element Research. – 2023. – С. 1-11.

Тезисы

1. Надей О.В., Иванова Т.И., Агалакова Н.И. Влияние ионов фтора на клетки гиппокампа и активность молекул кальпаин-зависимого каскада формирования памяти // Интегративная физиология. СПб.: Ин-т физиологии им. И.П. Павлова РАН, 2019. С.172-173
2. Надей О.В., Соколова Т.И., Агалакова Н.И. Влияние ионов фтора на нейроны коры головного мозга крыс // Морфология. 2019, 155(2): 209.
3. Nadey O.V., Agalakova N.I. Expression of cell death markers in rat hippocampus after long-term fluoride intoxication // Zh. Evol. Biokhim. Fiziol. - 2020, V. 56. – N. 7. – P. 780.
4. Надей О.В., Агалакова Н.И. Гиперстимуляция сигнального каскада кальпаина-1 как одна из причин снижения когнитивных способностей у крыс с экспериментальным флюорозом // Гены и клетки. - 2020. – Т. XV. - № 1-3. – С. 280-281.
5. Надей О.В., Агалакова Н.И. Влияние ионов фтора на экспрессию AMPA-рецепторов и G-белков в гиппокампе крыс // Интегративная физиология. СПб.: Ин-т физиологии им. И.П. Павлова РАН, 2020. С.96.
6. Надей О.В., Агалакова Н.И. Изменение экспрессии и субклеточной локализации G-белков, малых ГТФаз и AMPA-рецепторов в гиппокампе и коре больших полушарий как причины снижения когнитивных способностей у крыс с экспериментальным флюорозом //Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2021» – М.: МАКС Пресс, 2021. – С.80
7. Надей О.В., Агалакова Н.И. Влияние ионов фтора на экспрессию NMDA-рецепторов в гиппокампе крыс // ИНТЕГРАТИВНАЯ ФИЗИОЛОГИЯ: Всероссийская конференция с международным участием, Санкт-Петербург (8-10 декабря 2021 г.). – Тезисы докладов. – СПб.: Ин-т физиологии им. И.П. Павлова РАН, 2021. 111 с.

Список цитируемой литературы

1. Макеева И. М., Волков А. Г., Мусиев А. А. Эндемический флюороз зубов-причины, профилактика и лечение //Российский стоматологический журнал. – 2017. – Т. 21. – №. 6. – С. 340-344.
2. Acutain M. F. et al. Reduced expression of hippocampal GluN2A-NMDAR increases seizure susceptibility and causes deficits in contextual memory //Frontiers in Neuroscience. – 2021. – Т. 15. – С. 644100.
3. Adkins E. A., Brunst K. J. Impacts of fluoride neurotoxicity and mitochondrial dysfunction on cognition and mental health: a literature review //International Journal of Environmental Research and Public Health. – 2021. – Т. 18. – №. 24. – С. 12884.
4. Baudry M. Calpain-1 and calpain-2 in the brain: Dr. Jekyll and Mr Hyde? //Current Neuropharmacology. – 2019. – Т. 17. – №. 9. – С. 823-829.
5. Caudal D. et al. Dynamic regulation of AMPAR phosphorylation in vivo following acute behavioral stress //Cellular and molecular neurobiology. – 2016. – Т. 36. – С. 1331-1342.
6. Cercato M. C. et al. GluN1 and GluN2A NMDA receptor subunits increase in the hippocampus during memory consolidation in the rat //Frontiers in Behavioral Neuroscience. – 2017. – Т. 10. – С. 242.
7. Corti E., Duarte C. B. The role of post-translational modifications in synaptic AMPA receptor activity //Biochemical Society Transactions. – 2023. – Т. 51. – №. 1. – С. 315-330.
8. Duan Q. et al. Association between water fluoride and the level of children's intelligence: a dose–response meta-analysis //Public Health. – 2018. – Т. 154. – С. 87-97.
9. Ge Y., Chen L., Yin Z., Song X., Ruan T., Hua L., Liu J., Wang J., Ning H. Fluoride-induced alterations of synapse-related proteins in the cerebral cortex of ICR offspring mouse brain //Chemosphere. 2018. V. 201. P. 874-883.
10. Guth S. et al. Toxicity of fluoride: critical evaluation of evidence for human developmental neurotoxicity in epidemiological studies, animal experiments and in vitro analyses //Archives of toxicology. – 2020. – Т. 94. – С. 1375-1415.
11. Han H, Du W, Zhou B, Zhang W, Xu G, Niu R, Sun Z (2014) Effects of chronic fluoride exposure on object recognition memory and mRNA expression of SNARE complex in hippocampus of male mice. Biol Trace Elem Res 158:58–64
12. Han J. et al. Chemical aspects of human and environmental overload with fluorine //Chemical Reviews. – 2021. – Т. 121. – №. 8. – С. 4678-4742.
13. He J. et al. Neuroprotective effects of zonisamide on cerebral ischemia injury via inhibition of neuronal apoptosis //Brazilian Journal of Medical and Biological Research. – 2021. – Т. 54.

14. Jaiswal P., Mandal M., Mishra A. Effect of hesperidin on fluoride-induced neurobehavioral and biochemical changes in rats //Journal of Biochemical and Molecular Toxicology. – 2020. – T. 34. – №. 11. – C. e22575.
15. Johnston N. R., Strobel S. A. Principles of fluoride toxicity and the cellular response: a review //Archives of toxicology. – 2020. – T. 94. – №. 4. – C. 1051-1069.
16. Lueptow L. M. Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice //JoVE (Journal of Visualized Experiments). – 2017. – №. 126. – C. e55718.
17. Mirsaeed-Ghazi F. et al. Astaxanthin Decreases Spatial Memory and Glutamate Transport Impairment Induced by Fluoride //Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR. – 2021. – T. 20. – №. 4. – C. 238.
18. Othman M. Z., Hassan Z., Has A. T. C. Morris water maze: a versatile and pertinent tool for assessing spatial learning and memory //Experimental Animals. – 2022. – T. 71. – №. 3. – C. 264-280.
19. Pulungan Z. S. A., Sofro Z. M., Partadiredja G. Sodium fluoride does not affect the working memory and number of pyramidal cells in rat medial prefrontal cortex //Anatomical science international. – 2018. – T. 93. – №. 1. – C. 128-138.
20. Swamy R. S. et al. Neuroprotective effect by naringin against fluorosis-induced neurodegeneration in adult Wistar rats //NeuroReport. – 2023. – T. 34. – №. 9. – C. 449-456.
21. Tang Y. et al. PRKAA1 induces aberrant mitophagy in a PINK1/Parkin-dependent manner, contributing to fluoride-induced developmental neurotoxicity //Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2023. – T. 255. – C. 114772.
22. Wang F., Zhang C. Y., Chen R., Ren C., Zhang P., Li Q., Li H.H., Guo K.T., Geng D.Q., Liu C.F. EGb-761 attenuates the anti-proliferative activity of fluoride via DDK1 in PC-12 cells // Neurochemical research. 2017. V. 42, №. 2. P. 606-614.
23. Wei W., Pang S., Sun D. The pathogenesis of endemic fluorosis: Research progress in the last 5 years // Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2019. V. 23. P. 2333–2342.
24. Wu Q. L. et al. The role of AMPARs composition and trafficking in synaptic plasticity and diseases //Cellular and Molecular Neurobiology. – 2022. – T. 42. – №. 8. – C. 2489-2504.
25. Xie F., Wang J., Zhang B. RefFinder: a web-based tool for comprehensively analyzing and identifying reference genes //Functional & Integrative Genomics. – 2023. – T. 23. – №. 2. – C. 1-5.
26. Yang L. et al. Fluoride activates microglia, secretes inflammatory factors and influences synaptic neuron plasticity in the hippocampus of rats //Neurotoxicology. – 2018. – T. 69. – C. 108-120.

27. Zhang R. et al. Neuregulin-1 β plays a neuroprotective role by inhibiting the Cdk5 signaling pathway after cerebral ischemia-reperfusion injury in rats //Journal of Molecular Neuroscience. – 2018. – T. 66. – C. 261-272.
28. Zhang X. L. et al. Mechanism of Learning and Memory Impairment in Rats Exposed to Arsenic and/or Fluoride Based on Microbiome and Metabolome //Biomedical and Environmental Sciences. – 2023. – T. 36. – №. 3. – C. 253-268.