РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА
Том 107, № 12, 2021

СОДЕРЖАНИЕ

Обзорные и проблемные статьи

Интегративная роль альбумина: эволюционные, биохимические и патофизиологические аспекты
Д. А. Белинская, П. А. Воронина, Н. В. Гончаров 1455

Экспериментальные статьи

Развитие гиппокамп-ассоциированных когнитивных нарушений у мышей с моделью болезни Хантингтона
Н. А. Красковская, А. И. Ерофеев, Е. Д. Гришина, С. А. Пушкарева, Е. И. Герасимов, О. Л. Власова, И. Б. Безпрозванный 1490

Влияние блокады синтеза NO на осморегулирующую функцию почек в условиях моделирования гипотиреоза у крыс с различным уровнем вазопрессина в крови
П. Д. Правикова, Л. Н. Иванова 1505

Повышение системного уровня эндотоксина ослабляет барорефлекс и кардиоваскулярные эффекты электростимуляции инфралимбической коры анестезированной крысы
Т. С. Туманова, Т. Н. Кокурина, Г. И. Рыбакова, В. Г. Александров 1518

Соматостатин-содержащие нейроны туберальной области гипоталамуса крыс при старении
П. А. Вишнякова, К. Ю. Моисеев, В. В. Порсева, Л. Г. Панкрашева, А. Ф. Будник, А. Д. Ноздрачев, П. М. Маслюков 1530

Роль активного фрагмента AgRP 25–51 в регуляции функциональной активности норадренергических нейронов locus coeruleus и в биосинтезе норадреналина
А. Л. Михрина, Л. О. Савельева, И. Ю. Морина, И. В. Романова 1542

Изменение электрокортикографических показателей крыс в ситуации реальной угрозы жизни в модели витального стресса
Н. К. Апраксина, Т. В. Авалиани, С. Г. Цикунов 1553

Временные характеристики локализации источника звука, движущегося по азимуту, у пациентов с легкой и умеренной сенсоневральной тугоухостью
Е. А. Клишова, А. П. Гвоздева, Л. Е. Голованова, И. Г. Андреева 1568

Роль калиевых токов в формировании фазы следовой гиперполяризации внеклеточных потенциалов действия вентрикулярных кардиомиоцитов крысы в норме и при стрептозотоциновом сахарном диабете
И. В. Кубасов, А. В. Степанов, А. А. Панов, О. В. Чистякова, И. Б. Сухов, М. Г. Добрецов 1583

Динамика показателей вертикальной позы человека при прослушивании приближающихся спереди и сзади шагов
О. П. Тимофеева, И. Г. Андреева, А. П. Гвоздева 1597

CONTENTS

Reviews

Integrative Role of Albumin: Evolutionary, Biochemical and Pathophysiological Aspects
D. A. Belinskaia, P. A. Voronina, and N. V. Goncharov 1455

Experimental Articles

Development of Hippocampus-Associated Cognitive Disfunction in Huntington's Disease Mouse Model
N. A. Kraskovskaya, A. I. Erofeev, E. D. Grishina, S. A. Pushkareva, E. I. Gerasimov, O. L. Vlasova, and I. B. Bezprozvanny 1490

Effect of NO Synthesis Blockade under Hypothyroidism on the Osmoregulating Renal Function in Rats with Different Blood Vasopressin Level
P. D. Pravikova and L. N. Ivanova 1505

Increase in the Systemic Level of Endotoxin Weakens Baroreflex and Cardiovascular Effects of Electrostimulation of the Infralimbic Cortex in Anesthetised Rat
T. S. Tumanova, T. H. Kokurina, G. I. Rybakova, and V. G. Aleksandrov 1518

Somatostatin-Containing Neurons of the Tuberal Region of the Rat Hypothalamus during Aging
P. A. Vishnyakova, K. Yu. Moiseev, V. V. Porseva, L. G. Pankrasheva, A. F. Budnik, A. D. Nozdrachev, and P. M. Masliukov 1530

The Role of the Active Fragment AgRP 25–51 in the Regulation of the Functional Activity of Norepinephrinergic Neurons Locus Coeruleus and in the Biosynthesis if Norepinephrine
A. L. Mikhrina, L. O. Saveleva, I. Yu. Morina, and I. V. Romanova 1542

Change of Electrocorticographic Indicators of Rats in a Situation of a Real Threat to Life in the Model of Vital Stress
N. K. Apraksina, T. V. Avaliany, and S. G. Tsicunov 1553

Temporal Characteristics of Azimuthally Moving Sound Source Localization in Patients with Mild and Moderate Sensorineural Hearing Loss
E. A. Klishova, A. P. Gvozdeva, L. E. Golovanova, and I. G. Andreeva 1568

Role of Potassium Currents in the Formation of After-Hyperpolarization Phase of Extracellular Action Potentials Recorded from the Control and Diabetic Rat Heart Ventricular Myocytes
I. V. Kubasov, A. V. Stepanov, A. A. Panov, O. V. Chistyakova, I. B. Sukhov, and M. G. Dobretsov 1583

Dynamics of Postural Indicators When Listening to Steps Approaching from the Front and from Behind
O. P. Timofeeva, I. G. Andreeva, and A. P. Gvozdeva 1597

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2021, том 107, № 12, с. 1455–1489

ОБЗОРНЫЕ И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

ИНТЕГРАТИВНАЯ РОЛЬ АЛЬБУМИНА: ЭВОЛЮЦИОННЫЕ, БИОХИМИЧЕСКИЕ И ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

© 2021 г.
Д. А. Белинская[1, *], П. А. Воронина[1], Н. В. Гончаров[1, 2]

[1]*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия*

[2]*НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека, г.п. Кузьмоловский, Всеволожский район, Ленинградская обл., Россия*

**E-mail: daria.belinskaya@iephb.ru*

Поступила в редакцию 26.02.2021 г.
После доработки 02.04.2021 г.
Принята к публикации 02.04.2021 г.

Будучи одним из главных белков в организме человека и многих видов животных, альбумин играет решающую роль в транспортировке различных ионов, электронейтральных молекул и в поддержании коллоидно-осмотического давления крови. Альбумин способен связывать практически все известные лекарства, многие нутрицевтики и токсические вещества, в значительной степени определяя их фармако- и токсикокинетику. Однако альбумин не только пассивный, но и активный участник фармакокинетических и токсикокинетических процессов, обладающий рядом ферментативных активностей. Благодаря тиоловой группе в составе Cys34 альбумин может служить ловушкой для активных форм кислорода и азота, участвуя таким образом в окислительно-восстановительных процессах. Большое значение имеет взаимодействие белка с клетками крови, кровеносных сосудов, а также с клетками тканей за пределами сосудистого русла. Взаимодействие с эндотелиальным гликокаликсом и клетками эндотелия сосудов во многом определяет интегративную роль альбумина. В данном обзоре представлены сведения исторического характера, информация об эволюционных изменениях, воспалительных и антиоксидантных свойствах альбумина, о его структурно-функциональных модификациях и их значении в патогенезе некоторых заболеваний.

Ключевые слова: альбумин, плазма крови, оксидативный стресс, эндотелий, гликокаликс, транспортная функция, трансцитоз

DOI: 10.31857/S0869813921120037

ВВЕДЕНИЕ: ЭВОЛЮЦИОННЫЕ, ГЕНЕТИЧЕСКИЕ, СТРУКТУРНЫЕ И ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ ОСОБЕННОСТИ АЛЬБУМИНА

Альбумин был, возможно, первым белком, на который обратили внимание врачи древних цивилизаций. Так, Гиппократ в V в. до нашей эры связывал заболевание почек у своих пациентов с наличием у них пенистой мочи, которая, как теперь известно, становится такой из-за присутствия в ней альбумина. Первые зарегистрированные в исторических анналах попытки выделения альбумина из мочи с помощью уксуса были предприняты в 16 в. Парацельсом, но лишь в 1894 г. Гурбер впервые кристаллизовал альбумин из конской сыворотки [1]. Так как поначалу объектом исследования и источником альбумина была сыворотка крови, за альбу-

мином закрепилось определение “сывороточный альбумин”, хотя современные технологии выделения альбумина предполагают использование плазмы крови в качестве его источника [2]. При этом исходная причина частого употребления словосочетания “сывороточный альбумин” – необходимость подчеркнуть его отличие от яичного, молочного и растительных альбуминов.

Сывороточный альбумин принадлежит к суперсемейству альбуминоидов, которое также включает витамин D-связывающий белок (VDP), альфа-фетопротеин и альфа-альбумин (афамин); соответственно семейство генов включает гены этих четырех глобулярных белков [3]. Это семейство встречается только у позвоночных [4], так что сывороточный альбумин имеется не только у млекопитающих, но и у птиц, некоторых видов лягушек, миног и саламандр (исчерпывающий список представлен на сайте albumin.org). В количественном отношении альбумин является доминирующим белком плазмы или сыворотки крови и, наряду с другими представителями семейства, действует как переносчик эндогенных и экзогенных веществ, включая тироксин, жирные кислоты и лекарства, тогда как основным “грузом” VDP является 25-гидроксивитамин D [3]. Все альбуминоиды эволюционно связаны с сывороточным альбумином [5, 6]. Это один из наиболее эволюционно изменчивых белков: у разных видов различия между доменами альбумина составляют 70–80%. Очевидно, это связано с развитием в ходе эволюции его особых связывающих характеристик по отношению к новым лигандам – гормонам, метаболитам, токсинам. В отличие от альбумина, различия в структуре ретинол-связывающего белка составляют в среднем 40%, а в структуре гистонов – менее 10% [7]. Исследование альбуминоидных генов показало, что в наибольшей степени отбор затронул сайты связывания жирных кислот и тироксина, поверхность контакта с неонатальным Fc-рецептором, а также аминокислотные остатки альбумина, образующие карман для связывания простагландинов [3]. Однако, несмотря на то что альбумин является быстро эволюционирующим белком, он обладает двумя консервативными характеристиками: это третичная структура, которая состоит из преимущественно спиральных участков при полном отсутствии каких-либо фрагментов бета-листа, а также паттерн дисульфидных связей, которых в молекуле альбумина семнадцать [8]. Благодаря присутствию у всех позвоночных сывороточный альбумин может служить своеобразным индикатором времени эволюции вида [9]. Так, в результате исследования филогенетического древа альбуминов приматов было установлено, что орангутанги первыми отделились от приматов, следующими были гориллы, позже шимпанзе и, наконец, люди [10].

Предковый ген альбумина претерпел утроение в процессе эволюции около 525 миллионов лет назад [11], когда впервые появились позвоночные. Молекула сывороточного альбумина человека (HSA, Human Serum Albumin) состоит из 585 аминокислотных остатков (а. о.), образующих одну полипептидную цепь с молекулярной массой 66439 Да, однако эти цифры могут варьировать из-за видовых различий, генетических и посттрансляционных модификаций. Архитектура альбумина преимущественно спиральная и состоит из трех доменов с очень похожими формами, которые в совокупности образуют форму сердца. Однако у миноги, так называемого “живого ископаемого”, альбумин состоит из семи доменов [12]. Четыре канонических представителя семейства альбуминоидов человека тандемно расположены в области 4q13.3 [13]. Ген *alb* HSA состоит из 16961 пар нуклеотидов от предполагаемого “кэп-сайта” до первого сайта присоединения поли(А). Он разделен на 15 экзонов, которые симметрично размещены в трех доменах. Предшественник сывороточного альбумина (препроальбумин) имеет N-концевой пептид, который отщепляется перед тем как белок покидает шероховатый эндоплазматический ретикулум. Продукт (проальбумин) транспортируется в аппарат Гольджи. В секреторных гранулах происходит ограниченный протеолиз и зрелый негликози-

лированный альбумин секретируется во внеклеточную среду [1]. Синтез белка происходит главным образом в полисомах гепатоцитов; у здорового взрослого человека производится 10–15 г альбумина в день, что составляет почти 10% всего синтеза белка в печени [14]. В плазме остается около 1/3 синтезированного альбумина, тогда как большая часть переходит в межклеточное пространство мышечной ткани и кожи. Синтез альбумина в печени во многом зависит от коллоидно-осмотического давления, экспрессия гена регулируется по принципу обратной связи [15].

Альбумин вырабатывается исключительно гепатоцитами. Для доставки вновь синтезированного альбумина к базолатеральной стороне клеток и последующей секреции альбумина в кровоток необходим рецептор Fc новорожденных (FcRn). FcRn локализован преимущественно внутри клеток и, помимо IgG, может связывать альбумин. Отсутствие экспрессии FcRn в гепатоцитах приводит к повышению уровня альбумина в желчи, его внутриклеточному накоплению и снижению уровня циркулирующего альбумина [16]. Например, в процессе онкогенеза клетки могут терять или подавлять экспрессию FcRn. В этих случаях клетки не смогут перерабатывать альбумин после его интернализации, вместо этого он разлагается, обеспечивая опухоль питательными веществами и способствуя ее росту. Благодаря особенностям структуры и отсутствию прямой связи с иммунными ответами FcRn был классифицирован как неклассический FcγR [17]. IgG и альбумин являются мажорными сывороточными белками, которые обладают относительно длительным периодом полужизни в сыворотке во многом благодаря их взаимодействию с FcRn, что спасает их от внутриклеточной деградации через механизм клеточного рециклинга.

Все представители семейства альбуминов водорастворимы и умеренно растворимы в концентрированных солевых растворах. Ключевые физико-химические свойства сывороточного альбумина – кислый, хорошо растворимый и очень стабильный белок, выдерживающий температуру 60°C в течение 10 ч [1]. HSA имеет в общей сложности 83 положительно заряженных аминокислотных остатка (Arg + Lys) и 98 отрицательно заряженных остатков (Asp + Glu) с теоретическим значением pI 5.12. Отличие альбумина от других белков крови состоит в том, что в норме он не гликозилирован (не гликирован, если иметь в виду исключительно неферментативное гликозилирование), хотя даже небольшой процент гликированного альбумина вносит существенный вклад в патогенез диабета и других заболеваний. Наиболее хорошо изучено гликирование по остаткам лизина. Также известны редокс-модификации альбумина – цистеинилирование, гомоцистеинилирование и сульфинилирование по Cys34 [18]. Молекула альбумина содержит 17 дисульфидных связей и одну свободную тиоловую группу в Cys34, которая определяет участие альбумина в окислительно-восстановительных реакциях. В соответствии с редокс-состоянием Cys34 существует три изоформы HSA: меркаптальбумин (восстановленный альбумин, HMA) и немеркаптальбумином-1 и -2 (варианты окисленного альбумина HNA-1 и HNA-2) [19].

Существуют десятки генетических вариантов HSA (полный список представлен на сайте albumin.org). Возможные эффекты некоторых точечных мутаций на лиганд-связывающую способность HSA были исследованы при взаимодействии пяти структурно охарактеризованных генетических вариантов белка с высокоаффинными к альбумину фармпрепаратами варфарином, салицилатом и диазепамом [20]. Данные равновесного диализа позволяют выявить выраженное снижение высокоаффинного связывания всех трех лигандов с HSA Canterbury (313Lys → Asn) и с HSA Parklands (365Asp → His). В случае HSA Verona (570Glu → Lys) изменения аффинности не было выявлено. Сродство к модификации HSA Niigata (269Asp → Gly) было снижено только для салицилата, а к HSA Roma (321Glu → Lys) – для салицилата и диазепама. В половине случаев снижение константы первичной ассоциации достигало одного порядка, что приводило к увеличению несвязанной фракции

фармпрепаратов минимум на 500% при терапевтически релевантных молярных соотношениях фармпрепарата и белка. Основной причиной уменьшения связывания лигандов являются конформационные изменения в области 313–365, тогда как изменения заряда молекулы играют второстепенную роль [20].

Альбумин может связывать различные эндогенные и экзогенные лиганды: воду и катионы металлов, жирные кислоты, гормоны, билирубин, металлопорфирины, оксид азота, аспирин, варфарин, ибупрофен, фенилбутазон и др. [21]. Связывание низкомолекулярных лигандов происходит в двух основных сайтах (сайт Sudlow I в субдомене IIA и сайт Sudlow II в субдомене IIIA) и нескольких второстепенных. Когда альбумин взаимодействует с различными веществами, возникают эффекты кооперативности и аллостерической модуляции, которые обычно присущи мультимерным макромолекулам [22, 23]. Альбумин является не только пассивным, но и активным участником фармакокинетических и токсикокинетических процессов. Многочисленные эксперименты показали наличие у альбумина (псевдо)эстеразной, фосфатазной, пероксидазной и других типов ферментативной активности. Более детально ферментативная активность белка рассмотрена в наших предыдущих обзорах [24–26]. Ранее в литературе было высказано предположение, что некоторые простые реакции, катализируемые сывороточным альбумином с кинетикой Михаэлиса–Ментен, включают неспецифическое связывание субстрата и катализ локальными функциональными группами [27]. Большинство ферментов способны катализировать физиологически нерелевантные (вторичные, “неразборчивые”) реакции в дополнение к тем реакциям, которые в результате эволюции стали для них основными; количество “неразборчивых” реакций при детальном рассмотрении вопроса оказалось довольно большим [28, 29], так что является скорее правилом, чем исключением. Однако каталитическая “неразборчивость” альбумина, на наш взгляд, возникла в результате утраты (а не приобретения) некоторых специализированных активностей, например, таких как активность эстераз (гидролаз) с пищеварительными функциями. В механизме “неразборчивости” альбумина определенную роль играет т.н. элиминация Кемпа – прототипная реакция отщепления протона от углерода. Реакция происходит в слое Штерна, на границе раздела между головкой мицеллы или поверхностью белка и водой, так что значительное ускорение реакции может быть достигнуто независимо от пространственного расположения субстрата [30, 31]. Механизм элиминации Кемпа в белковых молекулах связан с присутствием остатков ароматических аминокислот (Trp, Tyr, Phe), обеспечивающих стэкинг-взаимодействие с донорами водородной связи (Lys, Arg, Ser, Tyr, His, молекула воды) [32]. Ранее мы предложили объяснение опосредованного альбумином гидролиза некоторых субстратов существованием каталитических диад (в отличие от каталитических триад в холинэстеразах) His-Tyr или Lys-Tyr, в которых остатки гистидина или лизина функционируют как кислотные остатки и доноры протона, а остаток тирозина является каталитическим основанием [24].

РЕДОКС-МОДУЛЯЦИЯ И РЕДОКС-АКТИВНОСТЬ АЛЬБУМИНА

Редокс-статус тиоловой группы остатка Cys34 обеспечивает гетерогенность изоформ альбумина: меркаптальбумин человека (HMA) имеет свободную форму тиола; смешанный дисульфид с Cys или цистеинилглицином (CysGly), в меньшей степени с гомоцистеином (HCys) или глутатионом (GSH), получил название немеркаптальбумин-1 (HNA-1); альбумин с остатком цистеина, окисленным до сульфиновой или сульфоновой кислоты, получил название HNA-2. У здоровых людей молодого возраста HMA составляет 70–80%, HNA-1 составляет 20–30%, тогда как HNA-2 – от 2 до 5% от общего количества альбумина [33]. Окисленные формы альбумина отличаются по физико-химическим свойствам от восстановленной формы. Так,

повышение коллоидного осмотического давления окисленного альбумина было показано в экспериментах *in vitro* с использованием гипохлорита, а также установлено у пациентов с хронической болезнью почек [34]. Аффинность к эндогенным лигандам билирубину и триптофану, а также к экзогенным фармпрепаратам варфарину и диазепаму снижается пропорционально уровню окисленного альбумина (цистеинилирование по Cys34) [35]. Аффинность к липидам также различается: проатеросклеротические лизофосфатидилхолин и лизофосфатидная кислота имеют более высокое сродство к окисленной изоформе, тогда как антиатеросклеротические производные эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот обладают более высоким сродством к восстановленной изоформе альбумина [36].

Остатки альбумина человека (HSA), подверженные окислению, это в первую очередь Cys34, но также остатки тирозина Tyr84, 138, 140, 161, 263, 319, 332, 334, 353 и 370, остатки метионина Met87 и Met123, остаток триптофана Trp214 [37]. В плазме крови здорового человека около 80% всех тиолов приходятся на остаток Cys34 альбумина [38]. Он способен стехиометрически инактивировать пероксид водорода, пероксинитрит, супероксид-анион и хлорноватистую кислоту, окисляясь при этом до сульфеновой кислоты (HSA-SOH) [39, 40]. При оксидативном стрессе, вызванном активными формами кислорода (АФК), Cys34 образует дисульфид со свободным цистеином или глутатионом; окисление изменяет трехмерную структуру HSA и влияет на связывание многих ксенобиотиков (фармпрепаратов и токсических веществ). В зависимости от характера и степени окисления HSA окисленные производные можно разделить на обратимые (HNA-1) и необратимые (HNA-2). Предполагается, что как HNA-1, так и HNA-2 обусловливают развитие воспалительных процессов, что сопряжено с повышением уровня провоспалительных цитокинов и маркеров повреждения тех или иных тканей и органов [37]. Недавние исследования позволяют предполагать, что окисленные изоформы альбумина являются самостоятельными патогенетическими факторами многих распространенных и социально-значимых заболеваний, а их уровень тесно связан с характером питания человека [19]. Однако во многом остается неясным, в чем состоит специфика ответа разных тканей на воздействие разных форм модифицированного альбумина.

Перечень активностей альбумина, связанных с редокс-модуляцией плазмы крови и межклеточной жидкости, включает активность тиоэстеразы [41, 42], глутатионпероксидазы и цистеинпероксидазы, а также активность пероксидазы в отношении гидропероксидов липидов [43–45]. Следует отметить важную роль двух цистеиновых остатков альбумина, Cys392 и Cys438, которые образуют редокс-чувствительный дисульфид в комплексе альбумина с пальмитоил-KoA [45]. Cys34 является наиболее важной “ловушкой” АФК, хотя и не единственной: шесть остатков метионина также вносят вклад в антиоксидантные свойства альбумина [39, 46]. Остатки Met87 и Met123 обычно окисляются до сульфоксида метионина, особенно при почечной недостаточности и диабете.

Альбумин участвует в транспорте меди [47] – кофактора многих ферментов и участника окислительно-восстановительных реакций и сигнальных путей в организме в норме и при патологии [48]. Основным сайтом связывания катионов Cu(II) является N-концевой участок альбумина человека Asp-Ala-His-Lys (N-концевой сайт, NTS) [49]. Предполагается, что в структуре альбумина есть сайт и для связывания Cu(I). С помощью спектроскопических и вычислительных методов было показано, что в связывании катиона Cu(I) ключевую роль играют имидазольные кольца двух гистидинов [50]. N-концевая область HSA в комплексе с ионами меди обладает супероксиддисмутазной активностью [51]. Кроме того, следует отметить прооксидантные свойства альбумина: связанные с альбумином ионы Cu^{2+}

усиливают образование аскорбатного радикала с последующим окислением образовавшихся ионов Cu^{+} молекулярным кислородом и протонами снова до Cu^{2+} [52].

Редокс-активность альбумина может быть дополнена реакцией детоксикации цианидов с образованием тиоцианата, которая катализируется участками субдомена IIIA без участия Tyr411 [53]. Процент окисленного альбумина служит одним из биомаркеров оксидативного стресса, сопровождающего различные заболевания: так, уровень Cys34-цистеинилированного альбумина значительно повышен у пациентов, страдающих сахарным диабетом, заболеваниями печени и почек [35]. При заболевании почек чрезмерное образование АФК способствует окислительному повреждению, воспалению, эндотелиальной дисфункции и фиброзу почечной ткани [54]. У пациентов с сахарным диабетом часто встречается хроническая болезнь почек, так что основной причиной повреждения почек считается гликированный альбумин, хотя сравнительный анализ гликированного и окисленного альбумина не проводился. Отрицательные эффекты альбумина (как модифицированного, так и немодифицированного) на эпителиальные клетки канальцев изучены недостаточно. Предполагается, что окисление альбумина предшествует или происходит на ранних стадиях хронического заболевания почек. Альбумин у здоровых людей частично преодолевает барьер клубочковой фильтрации, но реабсорбируется посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза в проксимальных (71%) и дистальных клетках канальцев (26%) [37]. Альбумин связывается с рецептором комплекса мегалин-кубулин и направляется в покрытые клатрином везикулы, далее следует эндоцитоз и происходит закисление эндосом, что вызывает диссоциацию альбумина из комплекса мегалин-кубулин и связывание альбумина с неонатальным рецептором Fc (FcRn). Затем альбумин либо переносится в лизосомы, либо по трансцитозному маршруту возвращается в кровь, в то время как рецепторы подвержены рециклизации. Однако уровень окисленного в плазме альбумина коррелируют со снижением скорости клубочковой фильтрации. Окисленный альбумин оказывает прямое влияние на нейтрофилы, увеличивая уровни липокалина, связанного с желатиназой нейтрофилов, который является общепринятым биомаркером почечного повреждения у пациентов и в различных экспериментальных условиях. Более того, окисленный альбумин у пациентов с заболеванием почек независимо коррелирует с более высокими уровнями в плазме провоспалительных цитокинов TGF-β1, TNF-α, IL-1β и IL-6 [37].

Жирные кислоты, по-видимому, играют важную роль в регуляции антиоксидантных свойств альбумина. Впервые к такому выводу пришли Грызунов с соавт. [52]. Связывание жирных кислот альбумином изменяет конформацию сайтов Sudlow I и II и увеличивает квантовый выход флуоресценции дансиламида (лиганд сайта Sudlow I) и дансилсаркозина (лиганд сайта Sudlow II); кроме того, жирные кислоты увеличивали стерическую доступность тиоловой группы Cys34 и усиливали ее реакционную способность по отношению к 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислоте (DTNB). Таким образом, связывание жирных кислот создает предпосылки для одновременной регуляции двух важных функций белка: транспортной и антиоксидантной [52]. Кроме того, альбумин усиливает антиоксидантный статус организма за счет связывания билирубина (лиганд Сайта III [55]) и полиненасыщенных жирных кислот, которые взаимодействуют с остатками Arg117, Lys351 и Lys475 [39].

ГЛИКИРОВАННЫЙ АЛЬБУМИН – БИОМАРКЕР И ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ФАКТОР САХАРНОГО ДИАБЕТА. КОНЕЧНЫЕ ПРОДУКТЫ ГЛИКИРОВАНИЯ И ИХ РЕЦЕПТОРЫ

Сахарный диабет сродни глобальной эпидемии, которая растет тревожными темпами и ассоциируется с увеличением уровня смертности населения. В 2018 г.

только в США количество больных диабетом составило 34.2 миллиона человек. Во всем мире их количество составляет 425 миллионов человек, и ожидается, что к 2045 г. эта цифра вырастет до 629 миллионов [56]. Гестационный диабет ежегодно поражает от 2 до 14% беременных женщин в США [57]. У диабетиков имеет место усиление процесса неферментативной конденсации сахаров с нуклеиновыми кислотами, белками и липидами, что в конечном итоге формирует конечные продукты гликирования (КПГ). Гликирование изменяет их структуру и функцию, что приводит к нарушению функции клеток и цитотоксическим эффектам, вследствие чего КПГ получили название гликотоксины. КПГ могут возникать в результате физиологических процессов, когда они не уравновешиваются механизмами детоксикации, или поступать в организм из внешних источников, таких как еда, сигаретный дым и загрязнение воздуха. Их накопление ведет к воспалению и оксидативному стрессу, в основном посредством активации специфических рецепторов КПГ (РКПГ, RAGE, AGER) [58]. Рецептор КПГ был впервые описан в 1992 г., позже были идентифицированы изоформы: AGER-1, 2, 3, а также скавенджер-рецептор CD36 [59, 60]. RAGE и AGER-2 участвуют в инициации воспалительных процессов, тогда как рецепторы AGER-1, -3 и CD36 ответственны за детоксикацию КПГ [58, 61, 62]. RAGE – это рецептор, принадлежащий к суперсемейству иммуноглобулинов; его лиганд-связывающий домен распознает – помимо КПГ – большое количество молекул, среди которых наиболее важными являются белки S100, белок бокс-1 группы высокой подвижности (HMGB1), β-амилоид и антигенный комплекс макрофагов 1 (Mac-1) [63]. Т.е. RAGE действует как неспецифический рецептор распознавания образов, который может функционировать как экстраклеточный датчик [58]. Гликированные продукты и активация RAGE связаны с патофизиологией многих метаболических заболеваний, таких как сахарный диабет 2-го типа, пищевая аллергия, астма, хроническая обструктивная болезнь легких, острая почечная недостаточность, болезнь Альцгеймера, синдром поликистозных яичников [64–66]. КПГ способствуют канцерогенезу при хроническом местном воспалении, индуцированном *Helicobacter pylori* [67].

Сигнальные пути при активации РКПГ включают p21ras, киназы MAP, Rho GTPases, N-концевую киназу Jun (JNK) и JAK/STAT, которые приводят к миграции транскрипционных факторов в ядро и экспрессии генов, регулирующих хемотаксис, активацию клеток и пролиферацию [58]. NF-κB, NFAT, STAT, AP-1, ERK1/2 и белок, связывающий цАМФ-чувствительный элемент, связываются со своими специфическими промоторами для транскрипции генов, кодирующих провоспалительные цитокины (например, IL-1, IL-2 и IL-4), проапоптотические белки (например, p53-Bax, который инициирует каскад каспаз) и поверхностные белки, такие как молекулы адгезии эндотелиальных клеток [68–70]. РКПГ конститутивно экспрессируются во многих тканях, тогда как гиперактивация РКПГ вызывает стимуляцию пути PI3K–PKB–IKK, что приводит к связыванию NF-κB на промоторе РКПГ и автоамплификации экспрессии [58]. Другая петля самоамплификации состоит в том, что КПГ индуцируют оксидативный стресс через активацию РКПГ с последующей гиперактивацией NADPH-оксидазы, генерацией АФК, повышением КПГ и усилением экспрессии РКПГ [71]. Экспрессия РКПГ может увеличиваться не только вследствие воздействия КПГ, но также вследствие воздействия провоспалительных цитокинов [72]. КПГ-активированные эндотелиальные клетки “притягивают” лимфоциты и задерживают апоптоз моноцитов, увеличивая продолжительность воспаления [73].

Модификации белков плазмы, структурных белков и других макромолекул усиливаются при диабете не только вследствие повышенного гликирования (вторичного по отношению к повышенным концентрациям глюкозы), но и вследствие оксидативного стресса, который возникает по ходу заболевания и может быть

признаком неосложненного сахарного диабета. Комбинированные эффекты гликирования и окисления могут ускорять развитие сопутствующих патологий при диабете. В то время как сама глюкоза содержит карбонильную группу, которая участвует в начальной реакции гликирования, наиболее важные и реактивные карбонилы образуются в результате реакций окисления, повреждающих либо углеводы (включая саму глюкозу), либо липиды. Образующиеся промежуточные продукты, содержащие карбонил, затем модифицируют белки, давая продукты "гликоксидирования" и "липоокисления" соответственно. Этот общий путь глюкозо- и липид-опосредованного стресса является основой гипотезы карбонильного стресса [74].

КПГ даже в здоровом организме образуются эндогенно, но недавние исследования показали, что диета является важным экзогенным источником КПГ [75, 76]. Поскольку мишенями гликирования являются свободные аминогруппы, потенциально любой белок может быть модифицирован, и каждая ткань может накапливать гликотоксины. С точки зрения длительности накопления КПГ, долгоживущие белки являются наиболее важными для изучения: это компоненты внеклеточного матрикса (коллаген, ламинин и эластин), белок хрусталика α-кристаллин, хрящ, гемоглобин [58, 68]. Например, в настоящее время стандартными биомаркерами для мониторинга диабета являются глюкоза и гликированный гемоглобин A1c (HbA1c), но HbA1c является репрезентативным показателем для гликемических данных за 2–3 предшествующих месяца и не является адекватным для мониторинга терапии, тогда как уровень глюкозы может существенно меняться даже в течение дня и при гестационном диабете легкой и средней степени тяжести, что может дезориентировать пациента и даже врача [57]. Кроме того, в определенных условиях измерение HbA1c ненадежно, в частности для пациентов с модифицированными эритроцитами или почечной недостаточностью [77, 78]. Таким образом, существует потребность в промежуточном биомаркере, который можно эффективно использовать для мониторинга гликемического статуса пациентов. Таким биомаркером может служить альбумин, который имеет относительно короткий период полуобновления (20–21 день). Альбумин, количество которого существенно превышает количество других белков плазмы крови, подвержен гликированию в первую очередь и позволяет прогнозировать риск развития диабета даже в случае эугликемии [79]. Одним из главных реагентов, обнаруженных *in vivo* в аддуктах с альбумином, является карбоксиметил-лизин (CML). Из других следует отметить глиоксаль (GO), метилглиоксаль (MG) и 3-дезоксиглюкозон (3-DG) [58, 80].

Как уже было упомянуто, альбумин синтезируется и попадает в кровоток в виде негликозилированного белка, но со временем в плазме крови даже здорового человека происходит гликирование определенной части молекул альбумина, что может влиять на его структурные и функциональные характеристики [81, 82]. По некоторым оценкам в нормогликемической крови от 10 до 18% циркулирующих белков гликируются *in vivo*, тогда как у диабетиков он достигает 40% [57, 83]. Сравнительный анализ способности различных сахаров взаимодействовать с бычьим альбумином (BSA) *in vitro* показал, что d-галактоза более реакционноспособна по сравнению с d-глюкозой или d-лактозой, хотя только конъюгаты альбумина с лактозой распознавались специфическими лектинами [84]. К настоящему времени идентифицировано более 60 сайтов гликирования альбумина человека. Наиболее доступными для конъюгации оказались лизины Lys256 и Lys420, хотя наиболее реактивным у HSA считается Lys525 [85, 86]. Помимо лизина, наиболее реакционноспособными аминокислотными остатками являются аргинин и гистидин [58]. Окисленный альбумин легче гликируется, причем даже при физиологической концентрации глюкозы (5 мМ) [83]. Накопление КПГ изменяет структуру и функцию белков, превращая их в потенциальные мишени иммунной системы, результатом

чего может стать продукция аутоантител против КПГ. Альбумин не стал исключением: в крови пациентов с атеросклеротическим повреждением сосудов и признаками сахарного диабета были обнаружены антитела против альбумина [87]. Более того, аутоантитела IgG и IgA к HSA могут иметь диагностическое значение при аутоиммунных буллезных дерматозах (АБД), притом что кожные аутоантигены все еще не идентифицированы [88]. Сигнальный путь фосфо-p38, связанный с повреждением ДНК, является потенциальной мишенью для лечения больных с АБД-позитивными сывороточными аутоантителами к HSA.

Гликированный альбумин используется как в целях диагностики, так и для экспериментального исследования системных эффектов КПГ, многие из которых опосредованы NF-κB – универсальным фактором транскрипции, контролирующим экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла [89]. Как уже отмечалось, в настоящее время в качестве маркеров диабета общепризнанными являются глюкоза плазмы крови и HbA1c. Альтернативой HbA1c в качестве маркера сахарного диабета стал фруктозамин, играющий все более важную роль в диагностике этого заболевания и являющийся мерой гликирования циркулирующих белков, главным из которых с точки зрения доступности и оценки масштаба наблюдаемых изменений является альбумин [56]. Альбумин плазмы крови напрямую подвергается воздействию циркулирующей глюкозы, так что он постепенно вытесняет HbA1c при гликемическом мониторинге пациентов с сахарным диабетом [77]. Однако точность определения степени гипергликемии по фруктозамину относительно невысока не только потому, что разные белки по-разному взаимодействуют с глюкозой и другими сахарами, но еще и потому, что свой вклад в погрешность метода вносят билирубин, мочевая кислота и ряд других низкомолекулярных соединений. Среди других недостатков теста называют отсутствие общепринятого стандарта и даже невысокую его доступность [90]. Нельзя сказать, что разнообразные методики определения гликированного альбумина отличаются простотой и доступностью: отметим здесь ионообменную высокоэффективную жидкостную хроматографию, боронатную аффинную хроматографию, иммуноанализы (радиоиммуноанализ и иммуноферментный анализ), колориметрический метод с тиобарбитуровой кислотой, ферментативные методы с использованием протеиназы и кетаминоксидазы. Тем не менее, в последние годы наибольшую популярность получил ферментативный метод “Lucica GA-LR” (Asahi Kasei Pharma Corporation, Япония), имеющий высокую воспроизводимость, точность и хорошую корреляцию с A1c [90]. Разработана тест-система на индикаторной полоске для измерения доли гликированного альбумина от общего сывороточного альбумина. Для проведения колориметрических измерений использовались аптамеры с наночастицами золота. Как гликированный, так и негликированный альбумин можно измерять в соответствующих физиологических диапазонах концентраций – от 50 до 300 мкМ с пределом обнаружения (LoD) 6.5 мкМ для гликированного альбумина и от 500 до 750 мкМ с LoD 21 мкМ для негликированного альбумина [57].

Смысл измерения гликированного альбумина в клинической практике состоит в его универсальности и как медиатора воспаления, и как маркера гипергликемии. Более глубокое понимание роли гликированного альбумина может привести к принятию его в качестве независимого маркера воспалительного процесса [91]. Гликированный альбумин позволяет прогнозировать риск смерти у диализных пациентов с сахарным диабетом [77], а в сочетании с hsCRP максимально повышает точность прогнозирования сердечно-сосудистых заболеваний, особенно сопряженных с гипертрофией левого желудочка у пациентов с диабетической хронической болезнью почек [78]. Особо следует отметить, что гликированный альбумин может трансформироваться в амилоидные фибриллы, богатые β-слоями [92].

Как и в случае влияния окисления Cys34 на связывающую активность сайтов Sudlow, данные о влиянии гликирования на антиоксидантные свойства альбумина противоречивы [39, 93–95], что может быть связано с межвидовыми различиями, природой и концентрацией участвующих в реакции углеводов (глюкоза, метилглиоксаль), условиями инкубации с моносахаридами. Особый интерес представляют различия между альбумином человека и быка: гликирование HSA резко снижает его антиоксидантную активность, тогда как гликирование BSA несколько усиливает его антиоксидантные свойства. Эти данные коррелируют с результатами вычислительных экспериментов, направленных на изучение влияния редокс-статуса HSA и BSA на их связывающую и эстеразную активность по отношению к параоксону [26, 96]. С точки зрения эволюционной и сравнительной биохимии/физиологии представляется важным следующий факт: концентрация глюкозы в плазме крови птиц в 1.5–2 раза выше, чем у млекопитающих аналогичной массы (т.н. доброкачественная гипергликемия), однако птичий альбумин (на примере CSA, Chicken Serum Albumin) гликируется в меньшей степени, чем BSA, даже когда в эксперименте *in vitro* альбумины подвергали воздействию увеличивающихся концентраций глюкозы вплоть до 500 мМ [97]. Анализ белковых структур позволяет предположить, что относительная устойчивость CSA к гликированию может быть связана с меньшим количеством остатков лизина и вариациями в укладке белка, которые защищают остатки лизина от взаимодействия с глюкозой плазмы. Сравнительный анализ реконструированных последовательностей альбумина свидетельствует о том, что у предка птиц в молекуле альбумина было на 6–8 меньше остатков лизина по сравнению с альбумином млекопитающих [97]. Доброкачественная гипергликемия – общая физиологическая особенность птиц, и развитие механизмов устойчивости к гликированию альбумина, по-видимому, неразрывно было связано с их эволюцией. Полагают, что развитие доброкачественной гипергликемии у птиц совпало с радикальной перестройкой генома, в результате которой произошла потеря важных генов, в том числе гена, кодирующего GLUT4 – переносчика, ответственного за инсулинозависимый транспорт глюкозы в чувствительных к инсулину клетках других позвоночных. Эта потеря, по-видимому, привела к ремоделированию инсулин-зависимого сигнального пути в тканях птиц [98].

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АЛЬБУМИНА С ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ: ГЛИКОКАЛИКС, ТРАНСЦИТОЗ И ГЛИКОПРОТЕИН CD36

КПГ вызывают множественные метаболические нарушения в стенке сосудов и могут привести к эндотелиальной дисфункции. Поскольку значительная часть КПГ представлена гликированным альбумином, необходимо рассмотреть особенности взаимодействия альбумина с эндотелием сосудов. Альбумин взаимодействует с эндотелиальными клетками (ЭК) посредством экстраклеточных молекулярных представителей, среди которых имеются рецепторы, но большая их часть объединена в гликокаликс – динамичную и неоднородную по своему составу “прослойку” между мембранами ЭК, с одной стороны, и компонентами крови (плазма и форменные элементы), с другой стороны. Эндотелиальный гликокаликс – это связанный с мембранами ЭК слой гликопротеинов, который в организме человека удерживает от 700 до 1000 мл практически не циркулирующего объема плазмы. Этот внутрисосудистый слой поддерживает собственное коллоидно-осмотическое (онкотическое) давление (КОД) благодаря содержащимся в нем белков плазмы (в первую очередь альбумина), которые удерживаются внутри эндотелиального гликокаликса (Endothelial Glycocalyx Layer, EGL). Следовательно, он имеет более высокое КОД, чем циркулирующая плазма [99]. По некоторым оценкам, EGL обеспечивает примерно 60% внутрисосудистого КОД [100]. Структурно EGL представ-

ляет собой отрицательно заряженный гелеобразный слой, включающий в себя олигосахаридные и полисахаридные цепи гликозаминогликанов (гепарансульфат, хондроитинсульфат, дерматансульфат, кератансульфат, гиалуронан), которые ковалентно связаны с гликопротеинами и протеогликанами – как мембранными (антитромбин III, интегрины, селектины, синдеканы, глипиканы), так и растворимыми (перлекан, бигликан, версикан, декорин, мимекан). EGL имеет толщину от 0.1 до 4.5 мкм, в зависимости от локализации и размера сосуда, и служит своеобразным резервуаром белков и полисахаридов, таких как антитромбин III и гепарансульфат [99].

Неповрежденный EGL поддерживает разделение между циркулирующей плазмой и эндотелием сосудов, создавая “зону исключения”, которая не позволяет форменным элементам крови контактировать с поверхностью ЭК. В присутствии неповрежденного EGL вода и электролиты свободно проходят сначала через этот слой, а затем и за пределы ЭК через межклеточные щели. Эта “зона исключения” также препятствует контакту с эндотелием высокомолекулярных коллоидов массой >70 кДа. Альбумин является практически единственным белком плазмы, который легко перемещается между плазмой крови и EGL благодаря избирательной проницаемости EGL для природных коллоидов с молекулярной массой <70 кДа [101].

Молекулярный радиус альбумина препятствует его прохождению между соседними клетками интактного эндотелиального монослоя, что ограничивает параклеточную диффузию молекулами размером менее 3–5 нм [102–104]. Однако обнаружение альбумина в интерстициальной и лимфатической жидкостях – до 40–60% от уровня в плазме – указывает на то, что белок способен покидать просвет микрососудов даже при отсутствии воспаления [105, 106]. В работе Palade и соавт. [107] было показано, что альбумин, введенный в кровоток животных, позже обнаруживался во внутриклеточных пузырьках капиллярного эндотелия; в некоторых случаях эти пузырьки высвобождали альбумин в интерстиций, хотя при этом никогда не наблюдался разрыв межэндотелиальных контактов. Такой везикулярный транспорт известен как трансцитоз и опосредуется кавеолами; нокдаун или дефицит кавеолина-1, без которого кавеолы не могут существовать, предотвращает трансцитоз альбумина [108, 109]. Таким образом, в физиологических условиях трансцитоз альбумина является основным путем переноса альбумина из кровотока в интерстиций [107]. Учитывая важную роль альбумина в качестве транспортного средства лекарственных и токсических веществ, актуальность изучения кинетики и механизмов трансцитоза альбумина в кровеносных сосудах трудно переоценить [110]. О регуляции транспорта трансэндотелиального переноса альбумина известно мало, что отчасти обусловлено техническими трудностями при его изучении. Так, при измерении проницаемости эндотелия культивируемыми клетками было сложно отличить вклад параклеточной утечки от истинного трансцитоза [111]. Более серьезная причина слабого исследования трансцитоза альбумина эндотелиальными клетками связана с неопределенностью физиологического значения этого процесса. Мыши с дефицитом кавеолина-1 не имеют кавеол и демонстрируют пониженную эндотелиальную интернализацию альбумина, но у этих животных наблюдается компенсаторное повышение параклеточного транспорта [112]. Эта модель подчеркивает важность транспортировки альбумина за пределы сосудистого русла, но не дает ответ о физиологической функции трансцитоза. Учитывая многочисленные сайты связывания жирных кислот [113], можно предположить, что трансцитоз альбумина важен для регулируемого переноса циркулирующих жирных кислот в различные ткани. В связи с этим представляется важным давно установленный феномен: дефицит альбумина коррелирует с повышенным уровнем циркулирующего холестерина и фосфолипидов [114, 115].

Большая часть работ, связанных с изучением трансцитоза, была проведена на эндотелии легких, клетки которого связывают альбумин через гликопротеин 60

(gp60) в кавеолах и осуществляют его перенос при участии тирозиновых киназ [116, 117]. Трансцитоз альбумина в легких стимулируется тромбином, этот процесс сопряжен с повышением активности кислой сфингомиелиназы, которая способствует синтезу церамида, кавеолина-1 и его рекрутированию на липидные рафты мембраны; стимуляция трансцитоза альбумина провоспалительными медиаторами может способствовать утечке альвеолярного белка при повреждении легких [118]. Однако в легких большое значение имеет и другой механизм трансцитоза – низкоаффинное поглощение альбумина в жидкой фазе по типу пиноцитоза [119]. Пиноцитоз представляет из себя процесс неселективного поглощения клеткой жидкой фазы из окружающей среды, содержащей растворимые вещества, за счет отшнуровывания внутрь небольших пузырьков (эндосом), которые сливаются с лизосомами [120].

Долгое время практически ничего не было известно о трансцитозе альбумина в других тканях. Учитывая выраженную гетерогенность эндотелия сосудов в разных органах [121], можно было предположить, что существуют разные механизмы трансцитоза альбумина. Это предположение нашло свое подтверждение в недавней работе Raheel и соавт.: согласно их данным, трансцитоз альбумина в коже – в отличие от легких – имеет кинетику насыщения, что свидетельствует о рецептор-опосредованном процессе [122]. Было установлено, что для трансцитоза альбумина через эндотелий микрососудов дермы необходимым и достаточным условием является экспрессия гликопротеина CD36, который известен как рецептор-скавенджер (“мусорщик”) 3B класса (SR-B3), гликопротеин IV мембраны тромбоцитов (GPIV), гликопротеин IIIb (GPIIIb), рецептор тромбоспондина, рецептор коллагена, транслоказа жирных кислот (FAT) и даже как рецептор врожденного иммунитета [123]. При связывании лиганда CD36 запускает сигнальный каскад, который опосредует широкий спектр провоспалительных ответов. Например, амилоид-β1-40 (Aβ), взаимодействуя с CD36, активирует генерацию супероксид-анионов NADPH-оксидазой [124]. При остром повреждении легких ключевую роль в дисфункции эндотелиального барьера играют повышенный уровень АФК и внутриклеточного кальция: индуцированное H_2O_2 увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в ЭК микрососудов легких сопряжено с активацией TRPV4 (катионные ваниллоидные каналы 4-го типа с транзиторным рецепторным потенциалом), причем CD36 играет важную роль в H_2O_2-опосредованном повреждении легких через CD36-зависимое закрепление киназы Fyn (из Src-семейства) на клеточной мембране для облегчения фосфорилирования TRPV4 [125].

Гликопротеин CD36 экспрессирован на поверхности не только эндотелиальных клеток микрососудов, но и тромбоцитов, моноцитов, гладкомышечных клеток, кардиомиоцитов и ряда других клеток, однако отсутствует в лимфатических сосудах дермы [126]. Несмотря на широкое распространение, CD36 долгое время оставался довольно загадочным белком. Постепенно было установлено, что CD36 может влиять на клеточные ответы за счет взаимодействия с различными лигандами, в частности, с тромбоспондином-1, окисленными LDL и длинноцепочечными жирными кислотами [127, 128]. В настоящее время CD36 считается главным мембранным белком, участвующим в гомеостазе липидов организма. CD36 действует согласованно с мембранным и цитоплазматическим белками, связывающими жирные кислоты. Скорость поглощения жирных кислот зависит от присутствия CD36 на поверхности клетки, которое регулируется субклеточной везикулярной рециркуляцией CD36 от эндосом к плазматической мембране [129]. Однако неэтерифицированные жирные кислоты не могут свободно циркулировать в плазме, они связаны с альбумином [130], у которого имеется семь сайтов связывания жирных кислот [131]. Взаимодействие с CD36 сопряжено с активацией киназ Src-семейства и митоген-активируемых протеинкиназ, а также с участием Rho-ГТФаз и

транскрипционных факторов NF-κB [132]. Требует ли связывание и трансцитоз альбумина участия этих или других сигнальных путей, еще предстоит выяснить.

У мышей, избирательно дефицитных по эндотелиальному CD36, отмечен пониженный уровень подкожного жира, притом что уровень циркулирующих липидов был сопоставим с таковым у контрольных животных, и представители обеих групп имели близкую массу тела [122]. Это согласуется с дефектом транспорта или метаболизма липидов на границе между эндотелием и кожей. В соответствии с этой гипотезой, анальбуминемические крысы демонстрируют выраженную гиперхолестеринемию [133], а пациенты с врожденным дефицитом альбумина демонстрируют повышенные концентрации холестерина и фосфолипидов в сыворотке крови, которые временно возвращаются к норме после внутривенных инфузий альбумина [114, 115]. Дефицит CD36 или мутации в нем ранее не связывали с фенотипом кожи [134], но это объясняется тем, что в предыдущих исследованиях изучали эффект дефицита CD36 во всем организме, а не делеции, специфичной для ЭК. После открытия роли CD36 в коже возникает вопрос о роли CD36 в эндотелии микрососудов легких. Хотя он и не опосредует трансцитоз альбумина, имеются сведения о том, что эндотелиальный CD36 легких участвует в реакции на вдыхаемые загрязнители [135] или на инфекцию [136].

Однако CD36 не является исключительным посредником воздействия жирных кислот на клетки эндотелия. В отсутствие или недостатке альбумина воспаление может возникать в результате их взаимодействия с Toll-подобными рецепторами, а не как следствие поглощения через CD36 [137]. Так, пальмитат, не связанный с альбумином, активирует воспалительные пути в ЭК микрососудов, усиливает в них генерацию и/или экспрессию IL-6, IL-8, TLR2 (Toll-подобный рецептор 2) и молекул межклеточной адгезии 1 (ICAM-1), нарушает транспорт инсулина и способствует трансмиграции моноцитов. Ингибирование CD36 не влияет на индуцированную пальмитатом экспрессию молекул адгезии; в то же время подавление передачи сигналинга через TLR4 к NF-κB снижает индуцированную пальмитатом экспрессию ICAM-1 [137]. Такие варианты переключения сигналинга важны для понимания важности альбумина как в предотвращении, так и в развитии заболеваний сердечно-сосудистой системы.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЛИКИРОВАННОГО АЛЬБУМИНА С ЭНДОТЕЛИЕМ

У больных диабетом уровень гликированного альбумина составляет более 70 мкМ, он является одним из инициаторов апоптоза ЭК [138]. Вероятность образования атеросклеротических бляшек в каротидной артерии у больных диабетом 2-го типа коррелирует с повышенным уровнем гликированного альбумина и пониженным уровнем эндотелиальных прогениторов (CD34+/133+/309+) [139]. Интересно, что по мере формирования бляшек уровень гликированного альбумина снижался, равно как и соотношение гликированного альбумина к гликированному гемоглобину. Частично это объясняется тем, что при диабете ЭК аорты переключаются на биосинтетический фенотип с повышенным количеством кавеол и усиленным (примерно на 20%) трансцитозом гликированного альбумина. В культуре ЭК 25 мМ глюкозы вызывает примерно 2.6-кратное увеличение pSTAT-3 и pERK1 и примерно 1.8-кратное увеличение pERK2; воздействие гликированного альбумина (5 мкМ) вызывает примерно 4.3-кратное увеличение pERK1/2 по сравнению с 5 мМ глюкозы [140].

Гликированный альбумин индуцирует экспрессию прокоагулянтных и воспалительных факторов эндотелиальными клетками [141, 142]. В то же время имеются данные о том, что повышенный уровень фактора Виллебранда у диабетиков обусловлен не гликированным альбумином, а влиянием манноза-специфических лек-

тинов на углеводородные детерминанты ЭК [143]. Правда, гликированный альбумин тестировали при невысоких его концентрациях в культуре ЭК пупочной вены человека (HUVEC) (25–100 мкг/мл), тогда как физиологически гораздо более активные лектины (конканавалин А, ConA и агглютинин зародышей пшеницы, WGA) тестировали в концентрациях ненамного меньших (4–16 мкг/мл).

При сахарном диабете многие морфофунциональные отклонения клеток опосредуются ауто- и паракринным TGF-β, который индуцируется высоким уровнем глюкозы в окружающей среде и гликозилированными белками. Для большинства типов клеток TGF-β является индуктором апоптоза, который опосредуется рецептором TGF-β типа I, Alk5. Напротив, ранняя диабетическая микроангиопатия характеризуется усилением пролиферации ЭК. ЭК уникальны тем, что экспрессируют второй рецептор TGF-β типа I, Alk1, а также корецептор эндоглин, который увеличивает сродство лиганда к Alk1. В дифференцированных ЭК здоровых субъектов конститутивно экспрессируются Alk1 и эндоглин. Однако инкубация ЭК с высоким содержанием глюкозы и гликированного альбумина в среде индуцирует экспрессию Alk5 и увеличивает секрецию TGF-β в 3 раза, не влияя на уровни Alk1 или эндоглина. “Диабетическая” среда ускоряет пролиферацию клеток, по крайней мере частично, за счет TGF-β/Alk1–smad1/5 и, вероятно, с участием VEGF, а также промиграционных MMP2 ниже Alk1. Кроме того, частично увеличивается активность каспазы-3, что указывает на усиление апоптоза с использованием пути TGF-β/Alk5–smad2/3. Эти данные свидетельствуют о плейотропии TGF-β в ЭК, включая пролиферативные эффекты (через Alk1–smad1/5) и проапоптотические сигналы (через Alk5–smad2/3) [144]. Из других провоспалительных цитокинов, синтез которых индуцирует гликозилированный альбумин, следует отметить TNF-alpha [145]. Экспрессия IL-6 эндотелиальными клетками также повышается при воздействии гликированного альбумина, но это повышение можно предотвратить ангиотензином 1–7, продуктом активности АПФ-2 [146].

Гликированный альбумин усиливает экспрессию RAGE на фоне напряжения сдвига (shear stress) [147] и повышает экспрессию адгезионных молекул VCAM-1, ICAM-1 и Е-селектина [148]. Экспрессия адгезионных белков ЭК (в частности Е-селектина или CD62E) повышается именно при воздействии гликированного альбумина, такого эффекта нет при действии разнородной смеси КПГ, которые образуются в результате неферментативного гликирования и окисления белков, липидов и нуклеиновых кислот [149]. Гликированный альбумин пациентов с сердечной недостаточностью и высоким уровнем гликирования также увеличивал экспрессию молекул адгезии в в клетках HUVEC и усиливал адгезию мононуклеарных клеток периферической крови к ЭК [150]. Как известно, мононуклеары являются мощными генераторами АФК, но что особенно важно, повышение экспрессии адгезионных молекул опосредовано генерацией АФК NADPH-оксидазой ЭК и сигнальным путем с участием киназ PKB-IKK и JNK, транскрипционных факторов NF-kB и AP-1. Методом ПЦР-ОТ установлено, что генерация АФК максимально выражена через 4 ч после начала воздействия гликозилированного альбумина и сопровождается повышением экспрессии мРНК Nox4 и p22phox [151]. Активация NOX2 эндотелия также вносит вклад в дисфункцию гломерулярного аппарата инсулин-зависимых мышей, снижая экспрессию гломерулярного гликокаликса и обусловливая морфофункциональные изменения подоцитов и мезангиальных клеток; в конечном счете, это способствует развитию диабетической нефропатии, одним из признаков которой является альбуминурия [152]. Помимо NOX4, другим источником АФК при действии гликозилированного альбумина на ЭК является разобщенная eNOS [153]. Гликированный альбумин может как усиливать, так и ослаблять активность NO-синтазы, причем оба варианта ответа отмечены при развитии апоптоза ЭК под действием гликированного альбумина [138, 154, 155].

Это соответствует представлениям о том, что при диабете ключевую роль в повреждении эндотелия играет оксидативный стресс, а степень гликирования альбумина влияет на его интенсивность через возможную связь между NADPH-оксидазами, митохондриями и другими источниками АФК [156]. Недавно было показано, что одним из важных посредников КПГ-индуцированной диабетической дисфункции эндотелия является пероксидазин (PXDN), представитель семейства пероксидаз, катализирующий превращение пероксида водорода в гипохлористую кислоту. Полагают, что источником АФК при воздействии КПГ является NOX2, а действие HOCl приводит к ослаблению фосфорилирования eNOS по Ser1177 и снижению синтеза NO [157]. Еще одним участником антиоксидантной защиты ЭК и мишенью гликозилированного альбумина является внутриклеточная параоксоназа-2 (PON2). Гликозилированный альбумин, а также N-карбоксиметиллизин (КМЛ, наиболее известный представитель КПГ) подавляют экспрессию и активность PON2 в клетках эндотелия [158]. Кроме того, воздействие гликированного альбумина и КМЛ на эндотелий приводит к повышению уровня маркеров стресса эндоплазматического ретикулума GRP78 и IRE1α, а также к усилению экспрессии провоспалительных цитокинов MCP-1, IL-6, IL-8, белков адгезии ICAM1 и VCAM1. В то же время усиление экспрессии PON2 приводит к снижению уровня АФК и облегчает эндотелиальную дисфункцию, вызванную КПГ [158].

РОЛЬ МОДИФИЦИРОВАННОГО АЛЬБУМИНА В ПАТОГЕНЕЗЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Несмотря на доступность мажорных белков вообще и альбумина в частности, сведений о механизмах модификации альбумина и о механизмах влияния модифицированного альбумина на клетки, ткани и здоровье в целом недостаточно, а имеющиеся данные часто противоречивы. Специфика патогенеза того или иного органа обусловлена тем, что при повреждении эндотелия выход альбумина за пределы сосудистого русла выходит из-под контроля, что приводит к изменению биологической активности клеток паренхимы. Кроме того, клетки крови также могут служить мишенью КПГ и гликированного альбумина, что, как правило, усугубляет состояние ЭК и обусловливает нарушение гематотканевых барьеров. Так, гликозилированный альбумин усиливает тромбогенный потенциал тромбоцитов вследствие повышения количества и чувствительности рецепторов [159].

Патогенная роль КПГ и гликированного альбумина наиболее хорошо изучена при ожирении, диабетической полинейропатии и нефропатии [58, 160, 161]. Коронавирус SARS-CoV-2, ставший причиной пандемии COVID-19, стимулировал исследования взаимосвязи между восприимчивостью к инфекции и наличием других заболеваний в анамнезе, в том числе перечисленных выше, одним из патогенных факторов которых является гликированный альбумин.

Ожирение

Висцеральный жир – один из основных источников провоспалительных цитокинов благодаря активированным макрофагам, количество которых в нем намного больше по сравнению с подкожным жиром. Это связано прежде всего с аккумуляцией гликированного альбумина и повышенной экспрессией RAGE [160]. Среди цитокинов есть молекулы, которые взаимодействуют с RAGE (S100β и HMGB-1), а также молекулы, уровень которых повышается при активации RAGE (MCP-1, IL-6, TNFα, TGF-β и ряд других). Хроническое воспаление поддерживается постоянным рекрутированием макрофагов за счет RAGE-зависимой экспрессии MCP-1 и дальнейшей активацией RAGE; эта петля самоамплификации получила название ось RAGE/MCP-1 [162]. Повышение уровня КПГ, главным из которых является

гликированный альбумин, подпитывает как оксидативный стресс, так и ось КПГ/РКПГ (AGE/RAGE), что, в свою очередь, может усиливать воспаление в уже воспаленной ткани, тем самым ускоряя прогрессирование ожирения. Кроме того, адаптивные функции адипоцитов нарушаются посредством других рецепторов КПГ: так, захват и деградация КПГ скавенджером CD36 приводит к уменьшению генерации лептина адипоцитами, что может способствовать развитию ожирения [163].

Диабетическая полинейропатия

Установлено, что диабетическая полинейропатия (ДПН) развивается у всех пациентов с сахарным диабетом 1-го типа в течение 15 лет и у 30% пациентов с сахарным диабетом 2-го типа в течение 25 лет [164]. Характерным признаком ДПН является гиперплазия ЭК и утолщение базальной мембраны эндоневральных капилляров и многих других микрососудов. Механизм этого явления остается непонятным: в какой степени он связан с полиольным путем метаболизма глюкозы в ЭК, а в какой – воздействием гликированного альбумина на рецепторы КПГ? Одним из молекулярных патогенетических факторов ДПН является снижение синтеза клаудина-5, важнейшего компонента плотных контактов, ЭК эндоневральных капилляров в результате воздействия КПГ на рецепторы ЭК, что приводит к нарушению барьерной функции эндотелия и отеку нервного волокна. КПГ снижают количество клаудина-5 опосредованно, за счет увеличения аутокринной секреции эндотелиального фактора роста (VEGF) ЭК, образующими гистогематический барьер между кровью и содержимым эндоневрия (blood-nerve barrier, BNB) [161]. Кроме того, важную роль в формировании и поддержании базальной мембраны BNB играют перициты: они производят фибронектин и коллаген IV типа, а также тканевый ингибитор металлопротеазы-1 (TIMP-1), предотвращающий деградацию базальной мембраны. Оказалось, что при гипергликемии КПГ накапливаются в перицитах, усиливая аутокринную секрецию VEGF и TGF-β. Сигналинг от VEGF и TGF-β усиливает выработку фибронектина и коллагена IV типа, что приводит к утолщению базальной мембраны [161].

Интересно отметить, что лечение гипергликемии снижает частоту ДПН на 60–70% у пациентов с сахарным диабетом 1-го типа [165] и лишь на 5–7% у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа [166]. Более того, как минимум у 40% пациентов с сахарным диабетом 2-го типа развивается ДПН даже при контроле уровня глюкозы [167]. Данных о роли модифицированного (гликированного и/или окисленного) альбумина в патогенезе ДПН недостаточно для того, чтобы всерьез рассуждать о перспективах разработки эффективной терапии.

Диабетическая нефропатия

Каждая почка состоит примерно из 1 миллиона нефронов. Каждый нефрон состоит из клубочка (гломерула) и канальцев. Гломерулы состоят из четырех типов клеток: париетальный эпителий, гломерулярный эндотелий (ГЭК), подоциты (клетки висцерального эпителия) и мезангиальные клетки. Эндотелий и подоциты имеют общий внеклеточный матрикс – базальную мембрану клубочков (БМК). ГЭК и их отверстия покрыты эндотелиальным гликокаликсом. У подоцитов имеются отростки с щелевыми диафрагмами, которые окружают внешнюю часть капилляров. ГЭК с эндотелиальным гликокаликсом, БМК и подоциты составляют фильтрационнй барьер почек, или барьер клубочковой фильтрации. При диабете в фильтрационном барьере нарушается обмен сигналами между клетками, при этом первичное нарастание синтеза подоцитами фактора роста эндотелия сосудов А (VEGFA), наблюдаемое на ранних стадиях, сменяется снижением синтеза VEGF

при прогрессировании заболевания. Также происходит потеря взаимодействия ангиопоэтина-1 (Angpt1) и рецептора тирозин-протеинкиназы (Tie2), а продукция активированного протеина С (APC) в клубочках снижается из-за подавления экспрессии тромбомодулина. Снижение функциональной активности APC влияет на проницаемость стенки капилляров клубочков и усиливает апоптоз гломерулярных ЭК и подоцитов. Метаболические изменения, связанные с сахарным диабетом, наряду с активацией ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (RAAS) обусловливают генерацию АФК и АФА (оксид азота, диоксид азота и пероксинитрит) в гломерулярных ЭК. Активность эндотелина-1 (Edn1) при диабете усиливает оксидативный стресс, обусловливает истощение эндотелиального оксида азота (NO) и деградацию эндотелиального гликокаликса [168].

Однако дисфункция гломерулярного эндотелия характеризуется не только повреждением эндотелиального гликокаликса и оксидативным стрессом в ЭК, но и эндотелиально-мезенхимальным переходом (EndMT) [169]. EndMT – это процесс, при котором ЭК теряют эндотелиальный фенотип (например, снижается экспрессия маркеров эндотелиальных клеток CD31 и CD144) и специфические для эндотелия функциональные характеристики (атромбогенность, барьерные функции). Снижение экспрессии эндотелиальных маркеров сопровождается увеличением экспрессии мезенхимальных маркеров, таких как α-актин гладких мышц (αSMA) и специфический для фибробластов белок 1 (FSP-1); кроме того, нарастает синтез белков внеклеточного матрикса (ECM) [170]. EndMT способствует развитию фиброза и наблюдается при заболеваниях самых разных органов, в т.ч. при онкологических заболеваниях [171–173]. В гломерулах пациентов с диабетической нефропатией также наблюдается EndMT, о чем свидетельствует коэкспрессия эндотелиальных и мезенхимальных маркеров [174]. Гипергликемия, КПГ, гликированный альбумин, гипоксия и ряд других факторов вызывают дисфункцию гломерулярного эндотелия, которая характеризуется повреждением эндотелиального гликокаликса, оксидативным стрессом, воспалительным фенотипом ЭК и EndMT; это приводит к протеинурии, повреждению или потере подоцитов, активации мезангиальных клеток и, в конечном итоге, гломерулосклерозу. Дополнительный путь повреждения почек при диабете – трансдифференцировка клеток почечных канальцев в миофиблобласты. Это происходит при активации РКПГ, что вызывает экспрессию TGF-β и других цитокинов, которые опосредуют эту трансдифференцировку [175]. Активация NF-κB, наряду с амплификацией RAGE и экспрессией цитокинов вызывает активацию гена *ZEB2*, кодирующего белок ZEB2 – фактор транскрипции, который приводит к потере адгезии подоцитов, эпителиально-мезенхимальному переходу, отслоению базальной мембраны и потере подоцитов в клубочках [68]. Активация PKC, TGF-β и экспрессии генов в мезангиальных клетках, наряду с аналогичным влиянием на ЭК гломерулярного аппарата, также является причиной диабетической нефропатии, особенно при диабете 1-го типа [176, 177].

Следует отметить, что EndMT не является необратимым процессом, показана возможность обратного перепрограммирования трансформированных ЭК [170], также EndMT находится под контролем аутофагии [178, 179].

COVID-19

В дополнение к многочисленным наблюдениям, свидетельствующим о модификациях и снижении уровня альбумина при различных заболеваниях, сопровождающихся воспалительными процессами, в том числе у многих пациентов с коронавирусной инфекцией [180], было выдвинуто предположение, что цитокиновый шторм, наблюдаемый у пациентов с COVID-19, обусловлен повышенным уровнем

окисленного альбумина [181]. В то же время РКПГ играют важную роль в патогенезе таких заболеваниях легких как фиброз, пневмония и острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС). Сверхэкспрессия/гиперактивация РКПГ усиливает негативное действие медиаторов ренин-ангиотензиновой системы (RAS) на хронические заболевания, которые являются основными факторами риска при коронавирусной инфекции: диабет, заболевания почек и сердечно-сосудистой системы [182]. После распознавания и связывания спайкового белка коронавируса ангиотензинпревращающим ферментом 2-го типа (АПФ-2), SARS-CoV-2 проникает в клетку, что приводит к подавлению регуляции АПФ-2 и нарастанию ангиотензина II (AngII). Зараженные клетки подвергаются пироптозу и высвобождают DAMP (молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением), включая HMGB1. DAMP, цитокины и лиганды РКПГ приводят к усилению экспрессии РКПГ посредством NF-κB. В этих условиях РКПГ вызывают дальнейшее подавление ACE2, повышают экспрессию AT1R (рецептора AngII 1-го типа) и трансактивируются с AT1R, усиливая патогенетические эффекты оси ACE/AngII/AT1R. В то же время взаимодействие AngII с AT1R индуцирует активацию NF-κB и высвобождение лигандов РКПГ, формируется порочный круг. Связка РКПГ с эффекторами RAS способствует развитию “цитокинового шторма” в макрофагах и спленоцитах; вызывает дисфункцию эндотелия за счет увеличения проницаемости капилляров и высвобождения компонентов молекулярного паттерна, ассоциированных с повреждениями (DAMP); усиливает продукцию АФК и образование атеросклеротических бляшек; повышает риск тромбоза, индуцируя образование и высвобождение внеклеточных ловушек нейтрофилами (NET) с последующей агрегацией тромбоцитов; вызывают атрофию мышц, стимулируя апоптоз, увеличивая деградацию белка и снижая синтез белка. Сочетанное воздействие РКПГ и AT1R возникает в сосудах и паренхиме легких, головного мозга, сердца и почек, в клетках иммунной системы, вызывая необратимые повреждения многих органов [183]. Вопрос о том, что же все-таки первично (причина), а что вторично (следствие), в данном случае не просто имеет право на существование, но заслуживает самого серьезного отношения со стороны ученых и врачей.

Роль альбумина в эпилептогенезе

Результаты недавних исследований убедительно свидетельствуют о том, что КПГ вносят основной вклад в повреждение микрососудов мозга и нарушению гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) [184]. Взаимодействия между ГЭБ, церебральными кровеносными сосудами, нейронами, астроцитами, микроглией и перицитами образуют динамическую функциональную нейроваскулярную единицу. Поражение коры головного мозга в результате травмы, интоксикации, ишемии или инфекции может привести к развитию посттравматической эпилепсии (ПТЭ), одного из наиболее распространенных неврологических расстройств, патогенез которого тесно связан с нарушением целостности ГЭБ [123, 185]. В свою очередь, это приводит к утечке компонентов плазмы в паренхиму мозга и усилению возбудимости нейронов – сначала в результате первичного повышения уровней K^+ и глутамата, затем происходит запуск сопряженных механизмов: экстравазированный альбумин поглощается астроцитами через TGF-βR и ведет к Smad2-опосредованному подавлению калиевого канала Kir4.1, тогда как астроцитарный TNF-α инициирует снижение экспрессии транспортера глутамата EAAT-2. Оба механизма усугубляют первичную гиперактивность нейронов из-за нарушения буферизации K^+ и глутамата астроцитами, что приводит к накоплению внеклеточного калия, облегчению NMDA-опосредованной повышенной возбудимости и, в конечном итоге, проявлению эпилептиформной активности [186–188]. Следует отметить, что

этот же сигнальный путь активируется у стареющих людей с дисфункцией ГЭБ [189]. В настоящее время нет средств для выявления пациентов с риском развития ПТЭ или предотвращения его развития. Судороги могут возникать через месяцы или годы после инсульта, не реагируют на противосудорожные препараты более чем у трети пациентов и часто связаны со значительными нервно-психическими заболеваниями [190]. Повышенная концентрация альбумина вызывает увеличение [Ca^{2+}] при участии инозитол-1,4,5-трифосфата (IP3); кроме того, альбумин индуцирует синтез ДНК. Эти процессы частично блокируются гепарином и антагонистами TGF-β [191]. Так, применение SJN2511, специфического ингибитора астроцитарного пути ALK5/TGF-β, предотвращает возбуждающий синаптогенез и эпилепсию, индуцированную альбумином [190]. В то же время, применение неспецифических препаратов, таких как лозартан (антагонист AT1), также препятствует нарушению ГЭБ и развитию эпилептогенеза [185]. Однако остается неисследованным вопрос об отличиях в аффинности немодифицированного и модифицированно альбумина к цитокиновым рецепторам паренхимы мозга. Разработка специфических и неспецифических средств терапии ПТЭ с учетом патогенетической роли альбумина – одна из наиболее актуальных проблем современной фармакологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: ИНТЕГРАТИВНЫЕ КАЧЕСТВА АЛЬБУМИНА В ДИАГНОСТИКЕ И ТЕРАПИИ

Уровень альбумина в плазме или сыворотке крови многие годы служил классическим маркером статуса питания, особенно в отношении белковой пищи, при этом уровень менее 35 г/л определяется как гипоальбуминемия. В последнее время низкий уровень альбумина все чаще рассматривается как фактор риска и предиктор заболеваемости/смертности независимо от пола, возраста, сопутствующих заболеваний и всякого рода полиморфизмов [192–194]. С точки зрения диагностики, уровень альбумина в плазме крови и в моче характеризует не просто уровень одного из белков, а, по сути, интегративные его характеристики с точки зрения оценки состояния всего организма, поскольку отражает белок-синтезирующую функцию печени (отсюда его роль в качестве отрицательного острофазного белка [195]) и функциональное состояние эндотелия сосудов, определяющее целостность гематотканевых барьеров. Взаимосвязь между целостностью эндотелия и уровнем альбумина в моче – наиболее изученное явление в медицинской практике, указывающее в первую очередь на патологию почек, но также и на состояние других компонентов крови и сердечно-сосудистой системы [196–198]. В ряду этих компонентов эндотелий сосудов мозга представляет наибольший интерес, поскольку по ту сторону барьера находится “святая святых” – паренхима мозга, функциональные единицы которой оказались чрезвычайно уязвимы к действию альбумина благодаря наличию на астроцитах рецептора, еще недавно считавшегося специфичным к TGF-β, одному из минорных белков-цитокинов, регулирующих дифференцировку и апоптоз клеток [190, 191]. В период начала или даже расцвета исследований цитокиновой регуляции такое трудно было даже представить: общий рецептор к белкам, разница концентраций которых в сыворотке крови составляет более 9 (!) порядков. Разница в аффинности к рецептору компенсируется потенциальным превосходством в количестве молекул альбумина, которые могут получить доступ к рецепторам астроцитов при нарушении целостности ГЭБ. В связи с этим огромный интерес представляют цитотоксические характеристики редокс-модифицированного и гликированного альбумина не только по отношению к ЭК кровеносных сосудов, но и по отношению к цитокиновым рецепторам астроцитов.

Масштабный поиск новых диагностических показателей с использованием современных технологий метаболомики позволил выделить из огромного перечня

всего четыре простых показателя плазмы крови, которые позволяют с высокой точностью оценить состояние здоровья человека и прогнозировать вероятность летального исхода для пациентов независимо от их возраста, пола и характера имеющихся или перенесенных заболеваний; среди этих четырех показателей уровень альбумина по степени вклада в интегральную оценку, и прогноз оказался на втором месте после орозомукоида (альфа-1-кислый гликопротеин) [193]. Аналогичный результат получен при исследовании пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии: использование простого соотношения положительных (С-реактивный белок) и отрицательных (альбумин) острофазных белков может значительно повысить точность оценки риска смертельного исхода [199]. Близкое по своей структуре соотношение, но с маркерами повреждения мышечных волокон в числителе (креатинкиназа или миоглобин) существенно повышает корреляцию биохимических показателей с показателями функциональными и физиологическими (инструментальными) [200]. Соотношение альбумин/креатинин в моче является одним из наиболее чувствительных индикаторов клубочковой почечной дисфункции и гипертонии у пациентов с нейробластомой высокого риска, получавших миелоаблативные схемы терапии [201]. А уже в период пандемии коронавирусной инфекции было установлено, что существует обратная корреляция между смертностью от COVID-19 и концентрацией альбумина в крови [202]. Авторы исследования предположили, что эта ассоциация может быть связана с антикоагулянтными и антиоксидантными свойствами альбумина.

Грамотное применение методов регрессионного анализа позволяет повысить чувствительность и специфичность диагностики диабетических осложнений за счет использования “внутренних” показателей альбумина, таких как соотношение его восстановленной и окисленной форм [203]. Отношение окисленного альбумина к общему альбумину может увеличиваться при заболеваниях печени, диабете, сердечно-сосудистых заболеваниях, что приводит к бактериальным или вирусным инфекциям. И опять же в период пандемии было установлено, что вследствие индукции цитокинового шторма уровень окисленного альбумина в крови пациентов с COVID-19 может быть положительным предиктором смертности [181].

Однако альбумин может служить не только биомаркером тяжести различных патологий, но и средством терапии. Вследствие своей важнейшей физиологической роли, альбумин человека пользуется наибольшим спросом среди других биофармацевтических препаратов. В настоящее время годовая потребность в HSA во всем мире оценивается примерно в 500 тонн [204]. Инъекции 5%-ного раствора альбумина (изоонкотический раствор) назначают при необходимости увеличения внутрисосудистого объема, инъекции 20–25%-ного раствора альбумина (гиперонкотический раствор) назначают для восстановления коллоидно-осмотического (онкотического) давления и сохранения баланса жидкости между внутрисосудистым и внесосудистыми компартментами [205]. Клиническими показаниями к применению 4–5%-ного раствора альбумина являются гиповолемический шок, острая печеночная недостаточность, проведение искусственного кровообращения [206]. Показания к применению 20–25%-ного раствора – гипоальбуминемия, сепсис или септический шок, цирроз печени с асцитом [207]. В то же время следует иметь в виду, что рутинная коррекция гипоальбуминемии у тяжелобольных не рекомендуется, а ее использование при сепсисе и септическом шоке остается дискуссионным. Постоянная инфузия раствора с 4% альбумина пациентам отделения интенсивной терапии снижает риск внутрибольничных инфекций [208]. Согласно полученным данным, альбумин восстанавливает окисленную форму вазостатина-1 и тем самым восстанавливает его антимикробные свойства. Альбумин можно использовать для доставки сераорганических соединений к клеткам меланомы с целью ингибирования синтеза меланина [209]. Способность альбумина связывать воду может быть

использована при лечении отравлений органофосфатами. Уменьшение гликокаликса приводит к снижению онкотического давления и гиповолемии, так что соответствующая компенсация могла бы стать одним из терапевтических факторов при остром отравлении органофосфатами с целью снижения риска гибели и предотвращения отставленной патологии. Действительно, описаны случаи успешного использования свежезамороженной плазмы при лечении так называемого “промежуточного синдрома”, одного из возможных последствий отравления фосфорорганическими соединениями [210].

В то же время, введение альбумина в некоторых ситуациях может оказаться опасным. Состояния, при которых использование альбумина противопоказано из-за риска острой перегрузки кровообращения, – сердечная и почечная недостаточность, острый или хронический панкреатит, отек легких или тяжелая анемия. Также не рекомендуется применение альбумина при таких состояниях как асцит, реагирующий на диуретики, негеморрагический шок, гипоальбуминемия без возникновения отеков или острой гипотензии, недоедание, открытые раны, острая нормоволемическая гемодилюция в хирургии, потеря белка вследствие энтеропатии или мальабсорбции. Кроме того, использование альбумина может оказаться опасным для жизни пациентов с церебральной ишемией и черепно-мозговой травмой [205, 211].

Наиболее простым и естественным с физиологической точки зрения способом влияния на уровень и свойства альбумина является т.н. “функциональное питание”, т.е. использование в пищу таких продуктов и применение таких способов их обработки, которые бы в максимальной степени сохраняли количество и полезные качества содержащихся в них нутрицевтиков, которые, в свою очередь, оказывали бы позитивное влияние и на микрофлору кишечника, и на функциональное состояние печени, где происходит частичный метаболизм нутрицевтиков и синтез альбумина, а также на состояние альбумина в плазме крови, т.к. многие полифенолы и другие нутрицевтики связываются и транспортируются в системном кровотоке преимущественно альбумином [212], изменяя его конформацию и конкурируя с другими лигандами, среди которых конечно же могут быть жирные кислоты и КПГ. Связь между гликированным альбумином и другими КПГ, поступающими с пищей, с одной стороны, и микробиотой кишечника, с другой стороны, относительно недавно стала предметом исследования [213]. Справедливо обозначена необходимость в разработке стандартизированных методов определения нормы потребления КПГ. Многочисленные исследования показали, что полифенолы в значительной степени определяют численность, состав и состояние кишечных бактерий, которые, в свою очередь, модулируют неврологические заболевания [214]. Полифенолы обладают не только качествами антиоксидантов, но также способностью защиты белков от гликирования (антигликативная способность). Потребление полифенолов с пищей обусловливает повышение в периферической крови концентрации фенольных кислот, из которых мажорной (доминирующей) является 3-гидроксифенилуксусная (до 338 мкМ), тогда как концентрации других фенольных кислот находятся в диапазоне от 13 нМ до 200 мкМ. В эксперименте *in vitro* было показано, что предварительная инкубация BSA с разными фенольными кислотами и последующим гликоксидированием альбумина (глюкоза 5–10 мМ в сочетании с 10 нМ H_2O_2) существенно снижает концентрацию фруктозамина [215]. Среди распространенных полифенолов, способных снижать степень гликирования альбумина, – хризин и лютеолин, структурно близкие агликоны флавонов, содержащиеся в брокколи, перце чили, сельдерее, розмарине и меде [80]. Известны антиканцерогенные и кардиозащитные свойства лютеолина и хризина, в частности, благодаря их способности нейтрализовать АФК, подавлять экспрессию циклооксигеназы-2 и образование простагландина E2 [216]. Богатый полифенолами экстракт лекарственного растения *Doratoxylon apetalum* оказался эффективным

антиоксидантом для защиты ЭК, уменьшая в них уровень АФК – пероксида водорода и супероксида [215]. Помимо полифенолов, экстракт чеснока также ингибирует образование КПГ, в том числе гликированного альбумина [217].

Полагают, что обусловленное старением сопряжение оксидативного и карбонильного стресса (gluco-oxidative stress) с образованием КПГ генерирует неоэпитопы на белках крови, способствуя выработке аутоантител у пожилых людей, особенно у курильщиков. Использование натуральных продуктов с нутрицевтиками-антиоксидантами снижает проявление возрастных патофизиологических изменений. Механизм защитного действия полифенолов до конца не раскрыт, но предполагается, что полифенолы нековалентно взаимодействуют с остатками ароматических аминокислот альбумина; такое гидрофобное взаимодействие способствует ремоделированию зрелых КПГ-модифицированных амилоидных фибрилл и трансформируют вторичную структуру в спиральную или беспорядочную спиралевидную конформацию [92]. Хризин и лютеолин препятствуют формированию альбуминовых фибрилл. Результаты докинга показали, что оба флавоноида нековалентно взаимодействуют с различными аминокислотными остатками субдомена IIA, среди которых склонные к гликированию лизины и аргинины, и дополнительно стабилизируют структуру HSA, что объясняет механизм их действия как антигликирующих и антифибриллирующих агентов [80]. Предполагается, что полифенольные соединения обладают плейотропным действием и препятствуют гликированию на разных уровнях: посредством регуляции метаболизма глюкозы, хелатирования металлов, улавливания промежуточных дикарбонильных соединений, влияния на инсулинорезистентность клеток, наконец, посредством активации сигнального пути рецептора инсулиноподобного фактора роста [218].

Таким образом, выявленные в последние годы характеристики альбумина свидетельствуют о том, что этот мажорный белок плазмы крови, которому еще недавно отводили “скромную” роль осмотически активного компонента, по сути является молекулярным “стержнем”, связующим звеном между различными тканями и органами, свидетельствующим о здоровье всего организма и во многом определяющим это здоровье. Современная диагностика, патогенез различных заболеваний и разработка средств терапии в настоящее время немыслимы без комплексного учета физико-химических, эволюционно-генетических и физиолого-биохимических характеристик альбумина.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках госзадания АААА-А18-118012290142-9.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы (Н.В.Г), сбор данных (Д.А.Б., П.А.В и Н.В.Г.), подготовка и редактирование манускрипта (Д.А.Б., П.А.В и Н.В.Г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Peters T* (1995) All about albumin: biochemistry, genetics and medical applications. Acad Press. London.
2. *Raoufinia R, Mota A, Keyhanvar N, Safari F, Shamekhi S, Abdolalizadeh J* (2016) Overview of albumin and its purification methods. Adv Pharm Bull 6: 495–507.

3. *Mozzi A, Forni D, Cagliani R, Pozzoli U, Vertemara J, Bresolin N, Sironi M* (2014) Albuminoid genes: Evolving at the interface of dispensability and selection. Genome Biol Evol 6: 2983–2997. https://doi.org/10.1093/gbe/evu235
4. *Li S, Cao Y, Geng F* (2017) Genome-Wide Identification and Comparative Analysis of Albumin Family in Vertebrates. Evol Bioinform 13: 1–6. https://doi.org/10.1177/1176934317716089
5. *Haefliger DN, Moskaitis JE, Schoenberg DR, Wahli W* (1989) Amphibian albumins as members of the albumin, alpha-fetoprotein, vitamin D-binding protein multigene family. J Mol Evol 29: 344–354. https://doi.org/10.1007/BF02103621
6. *Lichenstein HS, Lyons DE, Wurfel MM, Johnson DA, McGinley MD, Leidli JC, Trollinger DB, Mayer JP, Wright SD, Zukowski MM* (1994) Afamin is a new member of the albumin, alpha-fetoprotein, and vitamin D-binding protein gene family. J Biol Chem 269: 18149–18154.
7. Doolittle RF (1992) Reconstructing history with amino acid sequences. In: Protein Science. 191–200.
8. *Bujacz A* (2012) Structures of bovine, equine and leporine serum albumin. Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr 68: 1278–1289. https://doi.org/10.1107/S0907444912027047
9. *Metcalf V, Brennan S, George P* (2003) Using serum albumin to infer vertebrate phylogenies. Appl Bioinform 2: S97–S107.
10. *Sarich VM, Wilson AC* (1967) Rates of albumin evolution in primates. Proc Natl Acad Sci U S A 58: 142–148. https://doi.org/10.1073/pnas.58.1.142
11. *Harper ME* (1983) Linkage of the evolutionarily-related serum albumin and alpha-fetoprotein genes within q11-22 of human chromosome 4. Am J Hum Genet 35: 565–572.
12. *Gray JE, Doolittle RF* (1992) Characterization, primary structure, and evolution of lamprey plasma albumin. Protein Sci 1: 289–302. https://doi.org/10.1002/pro.5560010211
13. *Nishio H, Heiskanen M, Palotie A, Bélanger L, Dugaiczyk A* (1996) Tandem arrangement of the human serum albumin multigene family in the sub-centromeric region of 4q: Evolution and chromosomal direction of transcription. J Mol Biol 259: 113–119. https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0306
14. *Quinlan GJ, Martin GS, Evans TW* (2005) Albumin: Biochemical properties and therapeutic potential. Hepatology 41: 1211–1219.
15. *Pietrangelo A, Panduro A, Chowdhury JR, Shafritz DA* (1992) Albumin gene expression is down-regulated by albumin or macromolecule infusion in the rat. J Clin Invest 89: 1755–1760. https://doi.org/10.1172/JCI115778
16. *Pyzik M, Sand KMK, Hubbard JJ, Andersen JT, Sandlie I, Blumberg RS* (2019) The neonatal Fc Receptor (FcRn): A misnomer? Front Immunol 10: 1540. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01540
17. *Pincetic A, Bournazos S, Dilillo DJ, Maamary J, Wang TT, Dahan R, Fiebiger BM, Ravetch JV.* (2014) Type i and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. Nat Immunol 15: 707–716. https://doi.org/10.1038/ni.2939
18. *Nakashima F, Shibata T, Kamiya K, Yoshitake J, Kikuchi R, Matsushita T, Ishii I, Giménez-Bastida JA, Schneider C, Uchida K* (2018) Structural and functional insights into S-thiolation of human serum albumins. Sci Rep 8: 932. https://doi.org/10.1038/s41598-018-19610-9
19. *Tabata F, Wada Y, Kawakami S, Miyaji K* (2021) Serum albumin redox states: More than oxidative stress biomarker. Antioxidants 10: 503. https://doi.org/10.3390/antiox10040503
20. *Kragh-Hansen U, Brennan SO, Galliano M, Sugita O* (1990) Binding of warfarin, salicylate, and diazepam to genetic variants of human serum albumin with known mutations. Mol Pharmacol 37: 238–242
21. *Fasano M, Curry S, Terreno E, Galliano M, Fanali G, Narciso P, Notari S, Ascenzi P* (2005) The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. IUBMB Life 57: 787–796. https://doi.org/10.1080/15216540500404093
22. *Ascenzi P, Bocedi A, Notari S, Fanali G, Fesce R, Fasano M* (2006) Allosteric Modulation of Drug Binding to Human Serum Albumin. Mini-Reviews Med Chem 6:483–489. https://doi.org/10.2174/138955706776361448
23. *Ascenzi P, Fasano M* (2010) Allostery in a monomeric protein: The case of human serum albumin. Biophys Chem 148: 16–22. https://doi.org/10.1016/j.bpc.2010.03.001

24. *Goncharov NV, Belinskaya DA, Razygraev AV, Ukolov AI* (2015) On the enzymatic activity of albumin. Russ J Bioorgan Chem 41: 131–144.
https://doi.org/10.1134/S1068162015020041
25. *Belinskaia DA, Goncharov NV* (2020) Theoretical and Practical Aspects of Albumin Esterase Activity. Russ J Bioorganic Chem 46: 287–298.
https://doi.org/10.1134/S1068162020030036
26. *Belinskaia DA, Voronina PA, Shmurak VI, Vovk MA, Batalova AA, Jenkins RO, Goncharov NV* (2020) The universal soldier: Enzymatic and non-enzymatic antioxidant functions of serum albumin. Antioxidants 9: 1–29.
https://doi.org/10.3390/antiox9100966
27. *Kirby AJ, Hollfelder F, Tawfik DS* (2000) Nonspecific catalysis by protein surfaces. Appl Biochem Biotechnol – Part A Enzym Eng Biotechnol 83: 173–181.
https://doi.org/10.1385/abab:83:1-3:173
28. *Copley SD* (2017) Shining a light on enzyme promiscuity. Curr Opin Struct Biol 47: 167–175.
https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.11.001
29. *Yang G, Miton CM, Tokuriki N* (2020) A mechanistic view of enzyme evolution. Protein Sci 29: 1724–1747.
https://doi.org/10.1002/pro.3901
30. *Sanchez E, Lu S, Reed C, Schmidt J, Forconi M* (2016) Kemp elimination in cationic micelles: Designed enzyme-like rates achieved through the addition of long-chain bases. J Phys Org Chem 29: 185–189.
https://doi.org/10.1002/poc.3515
31. *Sakamoto S, Komatsu T, Ueno T, Hanaoka K, Urano Y* (2017) Fluorescence detection of serum albumin with a turnover-based sensor utilizing Kemp elimination reaction. Bioorgan Med Chem Lett 27: 3464–3467.
https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.05.076
32. *Röthlisberger D, Khersonsky O, Wollacott AM, Jiang L, DeChancie J, Betker J, Gallaher JL, Althoff EA, Zanghellini A, Dym O, Albeck S, Houk KN, Tawfik DS, Baker D* (2008) Kemp elimination catalysts by computational enzyme design. Nature 453: 190–195.
https://doi.org/10.1038/nature06879
33. Oettl K, Marsche G (2010) Redox State of Human Serum Albumin in Terms of Cysteine-34 in Health and Disease. In: Methods in Enzymology 181–195.
34. *Michelis R, Sela S, Zeitun T, Geron R, Kristal B* (2016) Unexpected normal colloid osmotic pressure in clinical states with low serum albumin. PLoS One 11: e0159839.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159839
35. *Nagumo K, Tanaka M, Chuang VTG, Setoyama H, Watanabe H, Yamada N, Kubota K, Tanaka M, Matsushita K, Yoshida A, Jinnouchi H, Anraku M, Kadowaki D, Ishima Y, Sasaki Y, Otagiri M, Maruyama T* (2014) Cys34-cysteinylated human serum albumin is a sensitive plasma marker in oxidative stress-related chronic diseases. PLoS One 9: e85216.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085216
36. *Kurano M, Yasukawa K, Ikeda H, Aoki J, Yatomi Y* (2019) Redox state of albumin affects its lipid mediator binding characteristics. Free Radic Res 53: 892–900.
https://doi.org/10.1080/10715762.2019.1641603
37. *Figueroa SM, Araos P, Reyes J, Gravez B, Barrera-Chimal J, Amador CA* (2021) Oxidized albumin as a mediator of kidney disease. Antioxidants 10: 1–13.
https://doi.org/10.3390/antiox10030404
38. *Turell L, Radi R, Alvarez B* (2013) The thiol pool in human plasma: The central contribution of albumin to redox processes. Free Radic Biol Med 65: 244–253.
https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.050
39. *Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E* (2008) The antioxidant properties of serum albumin. FEBS Lett 582: 1783–1787.
https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.04.057
40. *Taverna M, Marie AL, Mira JP, Guidet B* (2013) Specific antioxidant properties of human serum albumin. Ann Intensive Care 3: 1–7.
https://doi.org/10.1186/2110-5820-3-4
41. *Pedersen AO, Jacobsen J* (1980) Reactivity of the Thiol Group in Human and Bovine Albumin at pH 3–9, as Measured by Exchange with 2,2'-Dithiodipyridine. Eur J Biochem 106: 291–295.
https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1980.tb06022.x
42. *Agarwal RP, Phillips M, McPherson RA, Hensley P* (1986) Serum albumin and the metabolism of disulfiram. Biochem Pharmacol 35: 3341–3347.
https://doi.org/10.1016/0006-2952(86)90433-8
43. *Hurst R, Bao Y, Ridley S, Williamson G.* (1999) Phospholipid hydroperoxide cysteine peroxidase activity of human serum albumin. Biochem J 338 (Pt 3): 723–728.
44. *Cha MK, Kim IH* (1996) Glutathione-linked thiol peroxidase activity of human serum albumin: A possible antioxidant role of serum albumin in blood plasma. Biochem Biophys Res

Commun 222: 619–625.
https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0793

45. *Lee H, Kim IH* (2001) Thioredoxin-linked lipid hydroperoxide peroxidase activity of human serum albumin in the presence of palmitoyl coenzyme A. Free Radic Biol Med 30: 327–333.
https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00483-4
46. *Iwao Y, Ishima Y, Yamada J, Noguchi T, Kragh-Hansen U, Mera K, Honda D, Suenaga A, Maruyama T, Otagiri M* (2012) Quantitative evaluation of the role of cysteine and methionine residues in the antioxidant activity of human serum albumin using recombinant mutants. IUBMB Life 64: 450–454.
https://doi.org/10.1002/iub.567
47. *Harris ED* (1991) Copper Transport: An Overview. Proc Soc Exp Biol Med 196: 130–140.
https://doi.org/10.3181/00379727-196-43171B
48. *Karpenko MN, Ilyicheva EY, Muruzheva ZM, Milyukhina IV, Orlov YA, Puchkova LV* (2018) Role of Copper Dyshomeostasis in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. Bull Exp Biol Med 164: 596–600.
https://doi.org/10.1007/s10517-018-4039-4
49. *Laussac JP, Sarkar B* (1984) Characterization of the Copper(II)- and Nickel(II)-Transport Site of Human Serum Albumin. Studies of Copper(II) and Nickel(II) Binding to Peptide 1–24 of Human Serum Albumin by 13C and 1H NMR Spectroscopy. Biochemistry 23: 2832–2838.
https://doi.org/10.1021/bi00307a046
50. *Sendzik M, Pushie MJ, Stefaniak E, Haas KL* (2017) Structure and Affinity of Cu(I) Bound to Human Serum Albumin. Inorg Chem 56: 15057–15065.
https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b02397
51. *Bar-Or D, Rael LT, Lau EP, Rao NKR, Thomas GW, Winkler JV, Yukl RL, Kingston RG, Curtis CG* (2001) An analog of the human albumin N-terminus (Asp-Ala-His-Lys) prevents formation of copper-induced reactive oxygen species. Biochem Biophys Res Commun 284: 856–862.
https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5042
52. *Gryzunov YA, Arroyo A, Vigne JL, Zhao Q, Tyurin VA, Hubel CA, Gandley RE, Vladimirov YA, Taylor RN, Kagan VE* (2003) Binding of fatty acids facilitates oxidation of cysteine-34 and converts copper-albumin complexes from antioxidants to prooxidants. Arch Biochem Biophys 413: 53–66.
https://doi.org/10.1016/S0003-9861(03)00091-2
53. *Jarabak R, Westley J* (1991) Localization of the sulfur-cyanolysis site of serum albumin to subdomain 3-ab. J Biochem Toxicol 6: 65–70.
https://doi.org/10.1002/jbt.2570060109
54. *Ratliff BB, Abdulmahdi W, Pawar R, Wolin MS* (2016) Oxidant mechanisms in renal injury and disease. Antioxidants Redox Signal. 25: 119–146.
https://doi.org/10.1089/ars.2016.6665
55. *Zunszain PA, Ghuman J, McDonagh AF, Curry S* (2008) Crystallographic Analysis of Human Serum Albumin Complexed with 4Z,15E-Bilirubin-IXα. J Mol Biol 381: 394–406.
https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.06.016
56. *Gounden V, Ngu M, Anastasopoulou C, Jialal I* (2020) Fructosamine. In: Stat Pearls. Stat Pearls Publ. Treasure Island (FL).
57. *Belsare S, Coté G* (2021) Development of a colorimetric paper fluidic dipstick assay for measurement of glycated albumin to monitor gestational diabetes at the point-of-care. Talanta 223.
https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121728
58. *Bettiga A, Fiorio F, Di Marco F, Trevisani F, Romani A, Porrini E, Salonia A, Montorsi F, Vago R* (2019) The modern western diet rich in advanced glycation end-products (AGEs): An overview of its impact on obesity and early progression of renal pathology. Nutrients 11(8): 1748.
https://doi.org/10.3390/nu11081748
59. *Bohlender JM, Franke S, Stein G, Wolf G* (2005) Advanced glycation end products and the kidney. Am J Physiol Ren Physiol 289(4): F645–F659.
https://doi.org/10.1152/ajprenal.00398.2004
60. *Pötzsch S, Blankenhorn A, Navarrete Santos A, Silber RE, Somoza V, Simm A* (2013) The effect of an AGE-rich dietary extract on the activation of NF-κB depends on the cell model used. Food Funct 4: 1023–1031.
https://doi.org/10.1039/c3fo30349g
61. *Vlassara H, Uribarri J* (2014) Advanced glycation end products (AGE) and diabetes: Cause, effect, or both? Curr Diab Rep 14: 453.
https://doi.org/10.1007/s11892-013-0453-1
62. *Frimat M, Daroux M, Litke R, Nevière R, Tessier FJ, Boulanger E* (2017) Kidney, heart and brain: Three organs targeted by ageing and glycation. Clin Sci 131: 1069–1092.
https://doi.org/10.1042/CS20160823

63. *Fritz G* (2011) RAGE: A single receptor fits multiple ligands. Trends Biochem Sci 36: 625–632. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.08.008
64. *Gill V, Kumar V, Singh K, Kumar A, Kim JJ* (2019) Advanced glycation end products (AGEs) may be a striking link between modern diet and health. Biomolecules 9(12): 888. https://doi.org/10.3390/biom9120888
65. *Smith PK* (2017) Do advanced glycation end-products cause food allergy? Curr Opin Allergy Clin Immunol 17: 325–331. https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000385
66. *Sukkar MB, Wood LG, Tooze M, Simpson JL, McDonald VM, Gibson PG, Wark PAB* (2012) Soluble RAGE is deficient in neutrophilic asthma and COPD. Eur Respir J 39: 721–729. https://doi.org/10.1183/09031936.00022011
67. *Morales ME, Rojas RA, Monasterio AV, González BI, Figueroa CI, Manques M B, Romero EJ, Llanos LJ, Valdés ME, Cofré LC* (2013) Lesiones gástricas en pacientes infectados con Helicobacter pylori: Expresión de RAGE (receptor de productos de glicosilización avanzada) y otros inmunomarcadores. Rev Med Chil 141: 1240–1248. https://doi.org/10.4067/S0034-98872013001000002
68. *Kumar Pasupulati A, Chitra PS, Reddy GB* (2016) Advanced glycation end products mediated cellular and molecular events in the pathology of diabetic nephropathy. Biomol Concepts 7: 293–299. https://doi.org/10.1515/bmc-2016-0021
69. *Perkins TN, Oczypok EA, Milutinovic PS, Dutz RE, Oury TD* (2019) RAGE-dependent VCAM-1 expression in the lung endothelium mediates IL-33-induced allergic airway inflammation. Allergy Eur J Allergy Clin Immunol 74: 89–99. https://doi.org/10.1111/all.13500
70. *Sotokawauchi A, Matsui T, Higashimoto Y, Yamagishi SI* (2019) Fructose causes endothelial cell damage via activation of advanced glycation end products–receptor system. Diabetes Vasc Dis Res 16: 556–561. https://doi.org/10.1177/1479164119866390
71. *Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL* (2001) Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. Am J Physiol Endocrinol Metab 280: E685–E694. https://doi.org/10.1152/ajpendo.2001.280.5.e685
72. *Tanaka N, Yonekura H, Yamagishi SI, Fujimori H, Yamamoto Y, Yamamoto H* (2000) The receptor for advanced glycation end products is induced by the glycation products themselves and tumor necrosis factor-α through nuclear factor-κB, and by 17β-Estradiol through sp-1 in human vascular endothelial cells. J Biol Chem 275: 25781–25790. https://doi.org/10.1074/jbc.M001235200
73. *Li L-M, Hou D-X, Guo Y-L, Yang J-W, Liu Y, Zhang C-Y, Zen K* (2011) Role of MicroRNA-214–Targeting Phosphatase and Tensin Homolog in Advanced Glycation End Product-Induced Apoptosis Delay in Monocytes. J Immunol 186: 2552–2560. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001633
74. *Lyons TJ, Jenkins A* (1997) Glycation, oxidation, and lipoxidation in the development of the complications of diabetes: a carbonyl stress hypothesis. Diabetes Rev 5: 365–391.
75. *Neviere R, Yu Y, Wang L, Tessier F, Boulanger E* (2016) Implication of advanced glycation end products (Ages) and their receptor (Rage) on myocardial contractile and mitochondrial functions. Glycoconj J 33: 607–617. https://doi.org/10.1007/s10719-016-9679-x
76. *Ahmad S, Siddiqui Z, Rehman S, Khan MY, Khan H, Khanum S, Alouffi S, Saeed M* (2017) A Glycation Angle to Look into the Diabetic Vasculopathy: Cause and Cure. Curr Vasc Pharmacol 15: 352–364. https://doi.org/10.2174/1570161115666170327162639
77. *Copur S, Siriopol D, Afsar B, Comert MC, Uzunkopru G, Sag AA, Ortiz A, Covic A, van Raalte DH, Cherney DZ, Rossing P, Kanbay M* (2021) Serum glycated albumin predicts all-cause mortality in dialysis patients with diabetes mellitus: meta-analysis and systematic review of a predictive biomarker. Acta Diabetol 58: 81–91. https://doi.org/10.1007/s00592-020-01581-x
78. *Vijayaraghavan B, Padmanabhan G, Ramanathan K* (2020) Determination of serum glycated albumin and high sensitivity c-reactive protein in the insight of cardiovascular complications in diabetic chronic kidney disease patients. Afr Health Sci 20: 308–313. https://doi.org/10.4314/ahs.v20i1.36
79. *Giglio RV, Lo Sasso B, Agnello L, Bivona G, Maniscalco R, Ligi D, Mannello F, Ciaccio M* (2020) Recent Updates and Advances in the Use of Glycated Albumin for the Diagnosis and Monitoring of Diabetes and Renal, Cerebro- and Cardio-Metabolic Diseases. J Clin Med 9: 3634. https://doi.org/10.3390/jcm9113634
80. *Sarmah S, Das S, Roy AS* (2020) Protective actions of bioactive flavonoids chrysin and luteolin on the glyoxal induced formation of advanced glycation end products and aggregation of human serum

albumin: In vitro and molecular docking analysis. Int J Biol Macromol 165: 2275–2285. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.023

81. *Rondeau P, Bourdon E* (2011) The glycation of albumin: Structural and functional impacts. Biochimie 93: 645–658. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.12.003
82. *Das A, Basak P, Pramanik A, Majumder R, Ghosh A, Hazra S, Guria M, Bhattacharyya M, Banik SP* (2020) Ribosylation induced structural changes in Bovine Serum Albumin: understanding high dietary sugar induced protein aggregation and amyloid formation. Heliyon 6: e05053. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05053
83. *Vlassopoulos A, Lean MEJ, Combet E* (2013) Role of oxidative stress in physiological albumin glycation: A neglected interaction. Free Radic Biol Med 60: 318–324. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.010
84. *Ledesma-Osuna AI, Ramos-Clamont G, Vázquez-Moreno L* (2008) Characterization of bovine serum albumin glycated with glucose, galactose and lactose. Acta Biochim Pol 55: 491–497.
85. *Soboleva A, Mavropulo-Stolyarenko G, Karonova T, Thieme D, Hoehenwarter W, Ihling C, Stefanov V, Grishina T, Frolov A* (2019) Multiple glycation sites in blood plasma proteins as an integrated biomarker of type 2 diabetes mellitus. Int J Mol Sci 20: 2329. https://doi.org/10.3390/ijms20092329
86. *Qiu H, Jin L, Chen J, Shi M, Shi F, Wang M, Li D, Xu X, Su X, Yin X, Li W, Zhou X, Linhardt RJ, Wang Z, Chi L, Zhang Q* (2020) Comprehensive glycomic analysis reveals that human serum albumin glycation specifically affects the pharmacokinetics and efficacy of different anticoagulant drugs in diabetes. Diabetes 69: 760–770. https://doi.org/10.2337/db19-0738
87. *Korça E, Piskovatska V, Börgermann J, Navarrete Santos A, Simm A* (2020) Circulating antibodies against age-modified proteins in patients with coronary atherosclerosis. Sci Rep 10: 17105. https://doi.org/10.1038/s41598-020-73877-5
88. *Qian H, Cao Y, Sun J, Zu J, Ma L, Zhou H, Tang X, Li Y, Yu H, Zhang M, Bai Y, Xu C, Ishii N, Hashimoto T, Li X* (2020) Anti-human serum albumin autoantibody may be involved in the pathogenesis of autoimmune bullous skin diseases. FASEB J 34: 8574–8595. https://doi.org/10.1096/fj.201903247RR
89. *Nass N, Bayreuther K, Simm A* (2017) Systemic activation of NF-κB driven luciferase activity in transgenic mice fed advanced glycation end products modified albumin. Glycoconj J 34: 157–161. https://doi.org/10.1007/s10719-017-9762-y
90. *Freitas PAC, Ehlert LR, Camargo JL* (2017) Glycated albumin: A potential biomarker in diabetes. Arch Endocrinol Metab 61: 296–304. https://doi.org/10.1590/2359-3997000000272
91. *Roohk HV, Zaidi AR, Patel D* (2018) Glycated albumin (GA) and inflammation: role of GA as a potential marker of inflammation. Inflamm Res 67: 21–30. https://doi.org/10.1007/s00011-017-1089-4
92. *Prasanna G, Jing P* (2021) Polyphenol binding disassembles glycation-modified bovine serum albumin amyloid fibrils. Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc 246: 119001. https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119001
93. *Bourdon E, Loreau N, Blache D* (1999) Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin. FASEB J 13: 233–244. https://doi.org/10.1096/fasebj.13.2.233
94. *Chesne S, Rondeau P, Armenta S, Bourdon E* (2006) Effects of oxidative modifications induced by the glycation of bovine serum albumin on its structure and on cultured adipose cells. Biochimie 88: 1467–1477. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.05.011
95. *Martinez Fernandez A, Regazzoni L, Brioschi M, Gianazza E, Agostoni P, Aldini G, Banfi C* (2019) Pro-oxidant and pro-inflammatory effects of glycated albumin on cardiomyocytes. Free Radic Biol Med 144: 245–255. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.06.023
96. *Belinskaia DA, Terpilovskii MA, Batalova AA, Goncharov NV* (2019) Effect of Cys34 Oxidation State of Albumin on Its Interaction with Paraoxon according to Molecular Modeling Data. Russ J Bioorganic Chem 45: 535–544. https://doi.org/10.1134/S1068162019060086
97. *Anthony-Regnitz CM, Wilson AE, Sweazea KL, Braun EJ* (2020) Fewer Exposed Lysine Residues May Explain Relative Resistance of Chicken Serum Albumin to In Vitro Protein Glycation in Comparison to Bovine Serum Albumin. J Mol Evol 88: 653–661. https://doi.org/10.1007/s00239-020-09964-y
98. *Martinez del Rio C, Gutiérrez-Guerrero YT* (2020) An Evolutionary Remedy for an Abominable Physiological Mystery: Benign Hyperglycemia in Birds. J Mol Evol 88: 715–719. https://doi.org/10.1007/s00239-020-09970-0

99. *Myers GJ, Wegner J* (2017) Endothelial Glycocalyx and Cardiopulmonary Bypass. J Extra Corpor Technol 49: 174–181.
100. *Perrin RM, Harper SJ, Bates DO* (2007) A role for the endothelial glycocalyx in regulating microvascular permeability in diabetes mellitus. Cell Biochem Biophys 49: 65–72. https://doi.org/10.1007/s12013-007-0041-6
101. *Bruegger D, Rehm M, Jacob M, Chappell D, Stoeckelhuber M, Welsch U, Conzen P, Becker BF* (2008) Exogenous nitric oxide requires an endothelial glycocalyx to prevent postischemic coronary vascular leak in guinea pig hearts. Crit Care 12: R73. https://doi.org/10.1186/cc6913
102. *Bundgaard M* (1984) The three-dimensional organization of tight junctions in a capillary endothelium revealed by serial-section electron microscopy. J Ultrasructure Res 88: 1–17. https://doi.org/10.1016/S0022-5320(84)90177-1
103. *Michel CC, Curry FE* (1999) Microvascular permeability. Physiol Rev 79:703–761. https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.3.703
104. *Erickson HP* (2009) Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. Biol Proced Online 11: 32–51. https://doi.org/10.1007/s12575-009-9008-x
105. *Aukland K, Kramer GC, Renkin EM* (1984) Protein concentration of lymph and interstitial fluid in the rat tail. Am J Physiol Hear Circ Physiol 247(1 Pt 2): H74–H79. https://doi.org/10.1152/ajpheart.1984.247.1.h74
106. *Rutili G, Arfors KE* (1977) Protein Concentration in Interstitial and Lymphatic Fluids from the Subcutaneous Tissue. Acta Physiol Scand 99: 1–8. https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1977.tb10345.x
107. *Millici AJ, Watrous NE, Stukenbrok H, Palade GE* (1987) Transcytosis of albumin in capillary endothelium. J Cell Biol 105: 2603–2612. https://doi.org/10.1083/jcb.105.6.2603
108. *Miyawaki-Shimizu K, Predescu D, Shimizu J, Broman M, Predescu S, Malik AB* (2006) siRNA-induced caveolin-1 knockdown in mice increases lung vascular permeability via the junctional pathway. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 290: L405–L413. https://doi.org/10.1152/ajplung.00292.2005
109. *Schubert W, Frank PG, Razani B, Park DS, Chow CW, Lisanti MP* (2001) Caveolae-deficient Endothelial Cells Show Defects in the Uptake and Transport of Albumin in Vivo. J Biol Chem 276: 48619–48622. https://doi.org/10.1074/jbc.C100613200
110. *Larsen MT, Kuhlmann M, Hvam ML, Howard KA* (2016) Albumin-based drug delivery: harnessing nature to cure disease. Mol Cell Ther 4: 3. https://doi.org/10.1186/s40591-016-0048-8
111. *Armstrong SM, Khajoee V, Wang C, Wang T, Tigdi J, Yin J, Kuebler WM, Gillrie M, Davis SP, Ho M, Lee WL* (2012) Co-regulation of transcellular and paracellular leak across microvascular endothelium by dynamin and Rac. Am J Pathol 180: 1308–1323. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.12.002
112. *Schubert W, Frank PG, Woodman SE, Hyogo H, Cohen DE, Chow CW, Lisanti MP* (2002) Microvascular hyperpermeability in caveolin-1 (–/–) knock-out mice. Treatment with a specific nitric-oxide synthase inhibitor, L-name, restores normal microvascular permeability in Cav-1 null mice. J Biol Chem 277: 40091–40098. https://doi.org/10.1074/jbc.M205948200
113. *Berde CB, Hudson BS, Simoni RD, Sklar LA* (1979) Human serum albumin. Spectroscopic studies of binding and proximity relationships for fatty acids and bilirubin. J Biol Chem 254: 391–400.
114. *Baldo G, Fellin R, Manzatoa E, Baiocchi MR, Ongaro G, Baggio G, Fabiani F, Pauluzzi S, Crepaldi G* (1983) Characterization of hyperlipidemia m two patients with analbuminemia. Clin Chim Acta 128: 307–319. https://doi.org/10.1016/0009-8981(83)90330-3
115. *Cormode EJ, Lyster DM, Israels S* (1975) Analbuminemia in a neonate. J Pediatr 86: 862–867. https://doi.org/10.1016/S0022-3476(75)80215-0
116. *Schnitzer JE, Carley WW, Palade GE* (1988) Albumin interacts specifically with a 60-kDa microvascular endothelial glycoprotein. Proc Natl Acad Sci U S A 85: 6773–6777. https://doi.org/10.1073/pnas.85.18.6773
117. *Tiruppathi C, Song W, Bergenfeldt M, Sass P, Malik AB* (1997) Gp60 activation mediates albumin transcytosis in endothelial cells by tyrosine kinase-dependent pathway. J Biol Chem 272: 25968–25975. https://doi.org/10.1074/jbc.272.41.25968
118. *Kuebler WM, Wittenberg C, Lee WL, Reppien E, Goldenberg NM, Lindner K, Gao Y, Winoto-Morbach S, Drab M, Mühlfeld C, Dombrowsky H, Ochs M, Schütze S, Uhlig S* (2016) Thrombin stimulates albumin transcytosis in lung microvascular endothelial cells via activation of acid

sphingomyelinase. Am J Physiol – Lung Cell Mol Physiol 310: L720–L732.
https://doi.org/10.1152/ajplung.00157.2015

119. *John TA, Vogel SM, Tiruppathi C, Malik AB, Minshall RD* (2003) Quantitative analysis of albumin uptake and transport in the rat microvessel endothelial monolayer. Am J Physiol – Lung Cell Mol Physiol 284: L187–L196.
https://doi.org/10.1152/ajplung.00152.2002
120. Сарапульцев АП, Ремпель СВ, Кузнецова ЮВ, Сарапульцев ГП (2016) Взаимодействие наночастиц с биологическими объектами (обзор). Вестн Урал Мед Акад Наук 3:97–111. [Sarapultsev AP, Rempel SV, Kuznetsova JuV, Sarapultsev GP (2016) Nanoparticle's interactions with biological objects (The Review). J Ural Med Acad Sci 3: 97–111. (In Russ)].
https://doi.org/10.22138/2500-0918-2016-15-3-97-111
121. *Aird WC* (2007) Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. Circ Res 100: 174–190.
https://doi.org/10.1161/01.RES.0000255690.03436.ae
122. *Raheel H, Ghaffari S, Khosraviani N, Mintsopoulos V, Auyeung D, Wang C, Kim YH, Mullen B, Sung HK, Ho M, Fairn G, Neculai D, Febbraio M, Heit B, Lee WL* (2019) CD36 mediates albumin transcytosis by dermal but not lung microvascular endothelial cells: Role in fatty acid delivery. Am J Physiol – Lung Cell Mol Physiol 316: L740–L750.
https://doi.org/10.1152/ajplung.00127.2018
123. *Goncharov NV, Popova PI, Avdonin PP, Kudryavtsev IV, Serebryakova MK, Korf EA, Avdonin PV* (2020) Markers of Endothelial Cells in Normal and Pathological Conditions. Biochem Suppl Ser A Membr Cell Biol 14: 167–183.
https://doi.org/10.1134/S1990747819030140
124. *Park L, Wang G, Moore J, Girouard H, Zhou P, Anrather J, Iadecola C* (2014) The key role of transient receptor potential melastatin-2 channels in amyloid-β-induced neurovascular dysfunction. Nat Commun 5: 5318.
https://doi.org/10.1038/ncomms6318
125. *Suresh K, Servinsky L, Reyes J, Undem C, Zaldumbide J, Rentsendorj O, Modekurty S, Dodd-o JM, Scott A, Pearse DB, Shimoda LA* (2016) CD36 mediates H_2O_2-induced calcium influx in lung microvascular endothelial cells. Am J Physiol – Lung Cell Mol Physiol 312: L143–L153.
https://doi.org/10.1152/ajplung.00361.2016
126. *Hawighorst T, Oura H, Streit M, Janes L, Nguyen L, Brown LF, Oliver G, Jackson DG, Detmar M* (2002) Thrombospondin-1 selectively inhibits early-stage carcinogenesis and angiogenesis but not tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in transgenic mice. Oncogene 21: 7945–7956.
https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205956
127. *Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL* (2001) CD36: A class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. J Clin Invest 108: 785–791.
https://doi.org/10.1172/JCI14006
128. *Ibrahimi A, Abumrad NA* (2002) Role of CD36 in membrane transport of long-chain fatty acids. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 5: 139–145.
https://doi.org/10.1097/00075197-200203000-00004
129. *Glatz JFC, Luiken JJFP* (2018) Dynamic role of the transmembrane glycoprotein CD36 (SR-B2) in cellular fatty acid uptake and utilization. J Lipid Res 59: 1084–1093.
https://doi.org/10.1194/jlr.R082933
130. *Peters TJr* (1977) Serum albumin: recent progress in the understanding of its structure and biosynthesis. Clin Chem 391–400.
131. *van der Vusse GJ* (2009) Albumin as fatty acid transporter. Drug Metab Pharmacokinet 24:300–307.
https://doi.org/10.2133/dmpk.24.300
132. *Nergiz-Unal R, Rademakers T, Cosemans J, Heemskerk J* (2011) CD36 as a Multiple-Ligand Signaling Receptor in Atherothrombosis. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem 9: 42–55.
https://doi.org/10.2174/187152511794182855
133. *Nagase S, Shimamune K, Shumiya S* (1979) Albumin-deficient rat mutant. Science 205: 590–591.
https://doi.org/10.1126/science.451621
134. Lin MH, Khnykin D (2014) Fatty acid transporters in skin development, function and disease. Biochim Biophys Acta – Mol Cell Biol Lipids 1841: 362–368.
https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.09.016
135. *Robertson S, Colombo ES, Lucas SN, Hall PR, Febbraio M, Paffett ML, Campen MJ* (2013) CD36 mediates endothelial dysfunction downstream of circulating factors induced by O3 exposure. Toxicol Sci 134: 304–311.
https://doi.org/10.1093/toxsci/kft107
136. *Traoré B, Muanza K, Looareesuwan S, Supavej S, Khusmith S, Danis M, Viriyavejakul P, Gay F* (2000) Cytoadherence characteristics of Plasmodium falciparum isolates in Thailand using an

in vitro human lung endothelial cells model. Am J Trop Med Hyg 62: 38–44.
https://doi.org/10.4269/ajtmh.2000.62.38

137. *Pillon NJ, Azizi PM, Li YE, Liu J, Wang C, Chan KL, Hopperton KE, Bazinet RP, Heit B, Bilan PJ, Lee WL, Klip A* (2015) Palmitate-induced inflammatory pathways in human adipose microvascular endothelial cells promote monocyte adhesion and impair insulin transcytosis. Am J Physiol – Endocrinol Metab 309: E35–E44.
https://doi.org/10.1152/ajpendo.00611.2014
138. *Amore A, Cirina P, Conti G, Cerutti F, Bagheri N, Emancipator SN, Coppo R* (2004) Amadori-configurated albumin induces nitric oxide-dependent apoptosis of endothelial cells: A possible mechanism of diabetic vasculopathy. Nephrol Dial Transplant 19: 53–60.
https://doi.org/10.1093/ndt/gfg428
139. *Moon JH, Chae MK, Kim KJ, Kim HM, Cha BS, Lee HC, Kim YJ, Lee BW* (2012) Decreased endothelial progenitor cells and increased serum glycated albumin are independently correlated with plaque-forming carotid artery atherosclerosis in type 2 diabetes patients without documented Ischemic disease. Circ J 76: 2273–2279.
https://doi.org/10.1253/circj.CJ-11-1499
140. *Popov D, Simionescu M* (2006) Cellular mechanisms and signalling pathways activated by high glucose and AGE-albumin in the aortic endothelium. Arch Physiol Biochem 112: 265–273.
https://doi.org/10.1080/13813450601094573
141. *Rubenstein DA, Maria Z, Yin W* (2011) Glycated albumin modulates endothelial cell thrombogenic and inflammatory responses. J Diabetes Sci Technol 5: 703–713.
https://doi.org/10.1177/193229681100500325
142. *Rubenstein DA, Maria Z, Yin W* (2014) Combined incubation of platelets and endothelial cells with glycated albumin: Altered thrombogenic and inflammatory responses. Diabetes Vasc Dis Res 11: 235–242.
https://doi.org/10.1177/1479164114531298
143. *Nizheradze K* (2006) Concanavalin A, but not glycated albumin, increases subendothelial deposition of von Willebrand factor in vitro. Endothel J Endothel Cell Res 13: 245–248.
https://doi.org/10.1080/10623320600903916
144. *Wang S, Hirschberg R* (2009) Diabetes-relevant regulation of cultured blood outgrowth endothelial cells. Microvasc Res 78: 174–179.
https://doi.org/10.1016/j.mvr.2009.06.002
145. *Rashid G, Benchetrit S, Fishman D, Bernheim J* (2004) Effect of advanced glycation end-products on gene expression and synthesis of TNF-α and endothelial nitric oxide synthase by endothelial cells. Kidney Int 66: 1099–1106.
https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00860.x
146. *Wang HJ, Lo WY, Lin LJ* (2013) Angiotensin-(1-7) decreases glycated albumin-induced endothelial interleukin-6 expression via modulation of miR-146a. Biochem Biophys Res Commun 430: 1157–1163.
https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.12.018
147. *Bala K, Gomes J, Gohil NK* (2011) Interaction of glycated human serum albumin with endothelial cells in a hemodynamic environment: Structural and functional correlates. Mol Biosyst 7: 3036–3041.
https://doi.org/10.1039/c1mb05015j
148. *Kunt T, Forst T, Harzer O, Buchert G, Pfutzner A, Lobig M, Zschabitz A, Stofft E, Engelbach M, Beyer J* (1998) The influence of advanced glycation endproducts (AGE) on the expression of human endothelial adhesion molecules. Exp Clin Endocrinol Diabetes 106: 183–188.
https://doi.org/10.1055/s-0029-1211974
149. *Higai K, Shimamura A, Matsumoto K* (2006) Amadori-modified glycated albumin predominantly induces E-selectin expression on human umbilical vein endothelial cells through NADPH oxidase activation. Clin Chim Acta 367: 137–143.
https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.12.008
150. *Paradela-Dobarro B, Bravo SB, Rozados-Luís A, González-Peteiro M, Varela-Román A, González-Juanatey JR, García-Seara J, Alvarez E* (2019) Inflammatory effects of in vivo glycated albumin from cardiovascular patients. Biomed Pharmacother 113: 108763.
https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108763
151. *Rodiño-Janeiro BK, González-Peteiro M, Ucieda-Somoza R, González-Juanatey JR, Álvarez E* (2010) Glycated albumin, a precursor of advanced glycation end-products, up-regulates NADPH oxidase and enhances oxidative stress in human endothelial cells: Molecular correlate of diabetic vasculopathy. Diabetes Metab Res Rev 26: 550–558.
https://doi.org/10.1002/dmrr.1117
152. *Nagasu H, Satoh M, Kiyokage E, Kidokoro K, Toida K, Channon KM, Kanwar YS, Sasaki T, Kashihara N* (2016) Activation of endothelial NAD(P)H oxidase accelerates early glomerular injury in diabetic mice. Lab Investig 96: 25–36.
https://doi.org/10.1038/labinvest.2015.128

153. *Rodiño-Janeiro BK, Paradela-Dobarro B, Raposeiras-Roubín S, González-Peteiro M, González-Juanatey JR, Álvarez E* (2015) Glycated human serum albumin induces NF-κB activation and endothelial nitric oxide synthase uncoupling in human umbilical vein endothelial cells. J Diabetes Complications 29: 984–992.
https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2015.07.016
154. *Amore A, Cirina P, Mitola S, Peruzzi L, Gianoglio B, Rabbone I, Sacchetti C, Cerutti F, Grillo C, Coppo R* (1997) Nonenzymatically glycated albumin (Amadori adducts) enhances nitric oxide synthase activity and gene expression in endothelial cells. Kidney Int 51: 27–35.
https://doi.org/10.1038/ki.1997.4
155. *Chakravarthy U, Hayes RG, Stitt AW, McAuley E, Archer DB* (1998) Constitutive nitric oxide synthase expression in retinal vascular endothelial cells is suppressed by high glucose and advanced glycation end products. Diabetes 47: 945–952.
https://doi.org/10.2337/diabetes.47.6.945
156. *Dobi A, Bravo SB, Veeren B, Paradela-Dobarro B, Álvarez E, Meilhac O, Viranaicken W, Baret P, Devin A, Rondeau P* (2019) Advanced glycation end-products disrupt human endothelial cells redox homeostasis: new insights into reactive oxygen species production. Free Radic Res 53: 150–169.
https://doi.org/10.1080/10715762.2018.1529866
157. *Jing Cao, Zhang G, Liu Z, Xu Q, Li C, Cheng G, Shi R* (2021) Peroxidasin promotes diabetic vascular endothelial dysfunction induced by advanced glycation end products via NOX2/HOCl/Akt/eNOS pathway. Redox Biol 45: 102031.
https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102031
158. *Ravi R, Ragavachetty Nagaraj N, Subramaniam Rajesh B* (2020) Effect of advanced glycation end product on paraoxonase 2 expression: Its impact on endoplasmic reticulum stress and inflammation in HUVECs. Life Sci 246: 117397.
https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117397
159. *Soaita I, Yin W, Rubenstein DA* (2017) Glycated albumin modifies platelet adhesion and aggregation responses. Platelets 28: 682–690.
https://doi.org/10.1080/09537104.2016.1260703
160. *Son KH, Son M, Ahn H, Oh S, Yum Y, Choi CH, Park KY, Byun K* (2016) Age-related accumulation of advanced glycation end-products-albumin, S100β, and the expressions of advanced glycation end product receptor differ in visceral and subcutaneous fat. Biochem Biophys Res Commun 477: 271–276.
https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.06.056
161. *Takeshita Y, Sato R, Kanda T* (2021) Blood–nerve barrier (BNB) pathology in diabetic peripheral neuropathy and in vitro human BNB model. Int J Mol Sci 22: 1–15.
https://doi.org/10.3390/ijms22010062
162. *Goldsammler M, Merhi Z, Buyuk E* (2018) Role of hormonal and inflammatory alterations in obesity-related reproductive dysfunction at the level of the hypothalamic-pituitary-ovarian axis. Reprod Biol Endocrinol 16: 45.
https://doi.org/10.1186/s12958-018-0366-6
163. *Kuniyasu A, Ohgami N, Hayashi S, Miyazaki A, Horiuchi S, Nakayama H* (2003) CD36-mediated endocytic uptake of advanced glycation end products (AGE) in mouse 3T3-L1 and human subcutaneous adipocytes. FEBS Lett 537: 85–90.
https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00096-6
164. *Harati Y* (2007) Diabetic Neuropathies: Unanswered Questions. Neurol Clin 25: 303–317.
https://doi.org/10.1016/j.ncl.2007.01.002
165. *Linn T, Ortac K, Laube H, Federlin K* (1996) Intensive therapy in adult insulin-dependent diabetes mellitus is associated with improved insulin sensitivity and reserve: A randomized, controlled, prospective study over 5 years in newly diagnosed patients. Metabolism 45: 1508–1513.
https://doi.org/10.1016/S0026-0495(96)90180-8
166. *Ismail-Beigi F, Craven T, Banerji MA, Basile J, Calles J, Cohen RM, Cuddihy R, Cushman WC, Genuth S, Grimm RH, Hamilton BP, Hoogwerf B, Karl D, Katz L, Krikorian A, O'Connor P, Pop-Busui R, Schubart U, Simmons D, Taylor H, Thomas A, Weiss D, Hramiak I* (2010) Effect of intensive treatment of hyperglycaemia on microvascular outcomes in type 2 diabetes: An analysis of the ACCORD randomised trial. Lancet 376: 419–430.
https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60576-4
167. *Ang L, Jaiswal M, Martin C, Pop-Busui R* (2014) Glucose Control and Diabetic Neuropathy: Lessons from Recent Large Clinical Trials. Curr Diab Rep 14: 1–15.
https://doi.org/10.1007/s11892-014-0528-7
168. *Lassén E, Daehn IS* (2020) Molecular mechanisms in early diabetic kidney disease: Glomerular endothelial cell dysfunction. Int J Mol Sci 21: 1–21.
https://doi.org/10.3390/ijms21249456
169. *Sol M, Kamps JAAM, van den Born J, van den Heuvel MC, van der Vlag J, Krenning G, Hillebrands JL* (2020) Glomerular Endothelial Cells as Instigators of Glomerular Sclerotic Diseas-

es. Front Pharmacol 11: 573557.
https://doi.org/10.3389/fphar.2020.573557

170. *Dejana E, Hirschi KK, Simons M* (2017) The molecular basis of endothelial cell plasticity. Nat Commun 8: 14361.
https://doi.org/10.1038/ncomms14361

171. *Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB, Neilson EG, Sayegh MH, Izumo S, Kalluri R* (2007) Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. Nat Med 13: 952–961.
https://doi.org/10.1038/nm1613

172. *Ruan B, Duan JL, Xu H, Tao KS, Han H, Dou GR, Wang L* (2021) Capillarized Liver Sinusoidal Endothelial Cells Undergo Partial Endothelial-Mesenchymal Transition to Actively Deposit Sinusoidal ECM in Liver Fibrosis. Front Cell Dev Biol 9: 671081.
https://doi.org/10.3389/fcell.2021.671081

173. *Adjuto-Saccone M, Soubeyran P, Garcia J, Audebert S, Camoin L, Rubis M, Roques J, Binétruy B, Iovanna JL, Tournaire R* (2021) TNF-α induces endothelial–mesenchymal transition promoting stromal development of pancreatic adenocarcinoma. Cell Death Dis 12: 649.
https://doi.org/10.1038/s41419-021-03920-4

174. *Peng H, Li Y, Wang C, Zhang J, Chen Y, Chen W, Cao J, Wang Y, Hu Z, Lou T* (2016) ROCK1 Induces Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Glomeruli to Aggravate Albuminuria in Diabetic Nephropathy. Sci Rep 6: 20304.
https://doi.org/10.1038/srep20304

175. *Oldfield MD, Bach LA, Forbes JM, Nikolic-Paterson D, McRobert A, Thallas V, Atkins RC, Osicka T, Jerums G, Cooper ME* (2001) Advanced glycation end products cause epithelial-myofibroblast transdifferentiation via the receptor for advanced glycation end products (RAGE). J Clin Invest 108: 1853–1863.
https://doi.org/10.1172/JCI11951

176. *Chen S, Cohen MP, Ziyadeh FN* (2000) Amadori-glycated albumin in diabetic nephropathy: Pathophysiologic connections. Kidney Int Suppl 77: S40–S44.
https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.07707.x

177. *Chen S, Cohen MP, Lautenslager GT, Shearman CW, Ziyadeh FN* (2001) Glycated albumin stimulates TGF-β1 production and protein kinase C activity in glomerular endothelial cells. Kidney Int 59: 673–681.
https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.059002673.x

178. *Patschan D, Schwarze K, Henze E, Patschan S, Müller GA* (2016) Endothelial autophagy and Endothelial-to-Mesenchymal Transition (EndoMT) in eEPC treatment of ischemic AKI. J Nephrol 29: 637–644.
https://doi.org/10.1007/s40620-015-0222-0

179. *Wang J, Feng Y, Wang Y, Xiang D, Zhang X, Yuan F* (2017) Autophagy regulates Endothelial-Mesenchymal transition by decreasing the phosphorylation level of Smad3. Biochem Biophys Res Commun 487: 740–747.
https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.04.130

180. *Rodriguez-Morales AJ, Cardona-Ospina JA, Gutiérrez-Ocampo E, Villamizar-Peña R, Holguin-Rivera Y, Escalera-Antezana JP, Alvarado-Arnez LE, Bonilla-Aldana DK, Franco-Paredes C, Henao-Martinez AF, Paniz-Mondolfi A, Lagos-Grisales GJ, Ramírez-Vallejo E, Suárez JA, Zambrano LI, Villamil-Gómez WE, Balbin-Ramon GJ, Rabaan AA, Harapan H, Dhama K, Nishiura H, Kataoka H, Ahmad T, Sah R* (2020) Clinical, laboratory and imaging features of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. Travel Med Infect Dis 34: 101623.
https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101623

181. *Rahmani-Kukia N, Abbasi A, Pakravan N, Hassan ZM* (2020) Measurement of oxidized albumin: An opportunity for diagnoses or treatment of COVID-19. Bioorg Chem 105: 104429.
https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104429

182. *Chiappalupi S, Salvadori L, Vukasinovic A, Donato R, Sorci G, Riuzzi F* (2021) Targeting RAGE to prevent SARS-CoV-2-mediated multiple organ failure: Hypotheses and perspectives. Life Sci 272: 119251.
https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119251

183. *Chiappalupi S, Salvadori L, Donato R, Riuzzi F, Sorci G* (2021) Hyperactivated rage in comorbidities as a risk factor for severe covid-19—the role of rage-ras crosstalk. Biomolecules 11: 876.
https://doi.org/10.3390/biom11060876

184. *Dobi A, Rosanaly S, Devin A, Baret P, Meilhac O, Harry GJ, D'Hellencourt CL, Rondeau P* (2021) Advanced glycation end-products disrupt brain microvascular endothelial cell barrier: The role of mitochondria and oxidative stress. Microvasc Res 133: 104098.
https://doi.org/10.1016/j.mvr.2020.104098

185. *Swissa E, Serlin Y, Vazana U, Prager O, Friedman A* (2019) Blood–brain barrier dysfunction in status epileptics: Mechanisms and role in epileptogenesis. Epilepsy Behav 101(Pt B): 106285.
https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.04.03

186. *Aird WC* (2012) Endothelial cell heterogeneity. Cold Spring Harb Perspect Med 2: a006429. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006429
187. *Ivens S, Kaufer D, Flores LP, Bechmann I, Zumsteg D, Tomkins O, Seiffert E, Heinemann U, Friedman A* (2007) TGF-β receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis. Brain 130: 535–547. https://doi.org/10.1093/brain/awl317
188. *Kim SY, Senatorov V V., Morrissey CS, Lippmann K, Vazquez O, Milikovsky DZ, Gu F, Parada I, Prince DA, Becker AJ, Heinemann U, Friedman A, Kaufer D* (2017) TGFβ signaling is associated with changes in inflammatory gene expression and perineuronal net degradation around inhibitory neurons following various neurological insults. Sci Rep 7: 7711. https://doi.org/10.1038/s41598-017-07394-3
189. *Senatorov VV, Friedman AR, Milikovsky DZ, Ofer J, Saar-Ashkenazy R, Charbash A, Jahan N, Chin G, Mihaly E, Lin JM, Ramsay HJ, Moghbel A, Preininger MK, Eddings CR, Harrison HV, Patel R, Shen Y, Ghanim H, Sheng H, Veksler R, Sudmant PH, Becker A, Hart B, Rogawski MA, Dillin A, Friedman A, Kaufer D* (2019) Blood-brain barrier dysfunction in aging induces hyperactivation of TGFβ signaling and chronic yet reversible neural dysfunction. Sci Transl Med 11: eaaw8283. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaw8283
190. *Weissberg I, Wood L, Kamintsky L, Vazquez O, Milikovsky DZ, Alexander A, Oppenheim H, Ardizzone C, Becker A, Frigerio F, Vezzani A, Buckwalter MS, Huguenard JR, Friedman A, Kaufer D* (2015) Albumin induces excitatory synaptogenesis through astrocytic TGF-β/ALK5 signaling in a model of acquired epilepsy following blood-brain barrier dysfunction. Neurobiol Dis 78: 115–125. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.02.029
191. *Vega-Zelaya L, Ortega GJ, Sola RG, Pastor J* (2014) Plasma albumin induces cytosolic calcium oscilations and DNA synthesis in human cultured astrocytes. Biomed Res Int 2014: 539140. https://doi.org/10.1155/2014/539140
192. *Gatta A, Verardo A, Bolognesi M* (2012) Hypoalbuminemia. Int Emerg Med 7: S193–S199. https://doi.org/10.1007/s11739-012-0802-0
193. *Fischer K, Kettunen J, Würtz P, Haller T, Havulinna AS, Kangas AJ, Soininen P, Esko T, Tammesoo ML, Mägi R, Smit S, Palotie A, Ripatti S, Salomaa V, Ala-Korpela M, Perola M, Metspalu A* (2014) Biomarker Profiling by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for the Prediction of All-Cause Mortality: An Observational Study of 17,345 Persons. PLoS Med 11: e1001606. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001606
194. *Deelen J, Kettunen J, Fischer K, van der Spek A, Trompet S, Kastenmüller G, Boyd A, Zierer J, van den Akker EB, Ala-Korpela M, Amin N, Demirkan A, Ghanbari M, van Heemst D, Ikram MA, van Klinken JB, Mooijaart SP, Peters A, Salomaa V, Sattar N, Spector TD, Tiemeier H, Verhoeven A, Waldenberger M, Würtz P, Davey Smith G, Metspalu A, Perola M, Menni C, Geleijnse JM, Drenos F, Beekman M, Jukema JW, van Duijn CM, Slagboom PE* (2019) A metabolic profile of all-cause mortality risk identified in an observational study of 44,168 individuals. Nat Commun 10: 3346. https://doi.org/10.1038/s41467-019-11311-9
195. *Tsirpanlis G, Bagos P, Ioannou D, Bleta A, Marinou I, Lagouranis A, Chatzipanagiotou S, Nicolaou C, do Nascimento MM, Stenvinkel P, Riella M, Lindholm B* (2005) Serum albumin: A late-reacting negative acute-phase protein in clinically evident inflammation in dialysis patients. Nephrol Dial Transplant 20: 658–660. https://doi.org/10.1093/ndt/gfh663
196. *Ngan DTT, Binh NG, Lan LTH, Nguyen CTT, Huong PT* (2019) Evaluation of urinary L-FABP as an early marker for diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients. J Med Biochem 39: 224–230. https://doi.org/10.2478/jomb-2019-0037
197. *Chen L, Jin C, Chen L, Li M, Zhong Y, Xu Y* (2021) Value of microalbuminuria in the diagnosis of heart failure with preserved ejection fraction. Herz 46: 215–221. https://doi.org/10.1007/s00059-020-04985-1
198. *Arogundade FA* (2020) Detection of Early Renal Disease In Children With Sickle Cell Anaemia Using Microalbuminuria As A Surrogate Marker. West Afr J Med 37: 327
199. *Hwang JC, Jiang MY, Lu YH, Wang CT* (2015) Precedent fluctuation of serum hs-CRP to albumin ratios and mortality risk of clinically stable hemodialysis patients. PLoS One 10: e0120266. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120266
200. *Минигалин АД, Войтенко НГ, Воробьев АА, Корф ЕА, Новожилов АВ, Петухова ОВ, Баранова ТИ, Гончаров НВ* (2015) Исследование взаимосвязей физиологических и биохимических показателей человека в динамике после выполнения предельной физической нагрузки. Леч Физкульт Спорт Мед 132: 14–18. [*Minigalin AD, Voitenko NG, Vorobyov AA, Korf EA, Novozhilov AV, Petukhova OV, Baranova TI, Goncharov NV* (2015) Investigation of re-

lations between physiological and biochemical parameters of human beings in dynamics after performing a maximal workload. Physiother Sport Med 132: 14–18. (In Russ)].

201. *Suominen A, Jahnukainen T, Ojala TH, Sarkola T, Turanlahti M, Saarinen-Pihkala UM, Jahnukainen K* (2020) Long-term renal prognosis and risk for hypertension after myeloablative therapies in survivors of childhood high-risk neuroblastoma: A nationwide study. Pediatr Blood Cancer 67: e28209.
https://doi.org/10.1002/pbc.28209
202. *Violi F, Cangemi R, Romiti GF, Ceccarelli G, Oliva A, Alessandri F, Pirro M, Pignatelli P, Lichtner M, Carraro A, Cipollone F, D'Ardes D, Pugliese F, Mastroianni CM* (2021) Is Albumin Predictor of Mortality in COVID-19? Antioxidants Redox Signal 35: 139–142.
https://doi.org/10.1089/ars.2020.8142
203. *Fukuhara S, Yasukawa K, Sato M, Ikeda H, Inoguchi Y, Etoh T, Masakado M, Umeda F, Yatomi Y, Yamauchi T, Inoguchi T* (2020) Clinical usefulness of human serum nonmercaptalbumin to mercaptalbumin ratio as a biomarker for diabetic complications and disability in activities of daily living in elderly patients with diabetes. Metabolism 103: 153995.
https://doi.org/10.1016/j.metabol.2019.153995
204. *Chen Z, He Y, Shi B, Yang D* (2013) Human serum albumin from recombinant DNA technology: Challenges and strategies. Biochim Biophys Acta – Gen Subj 1830: 5515–5525.
https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.04.037
205. *Liumbruno GM, Bennardello F, Lattanzio A, Piccoli P, Rossetti G* (2009) Recommendations for the use of albumin and immunoglobulins. Blood Transfus 7: 216–234.
https://doi.org/10.2450/2009.0094-09
206. *Tullis JL* (1977) Albumin: 1. Background and Use. JAMA J Am Med Assoc 237: 355–360.
https://doi.org/10.1001/jama.1977.03270310039005
207. *Melia D, Post B* (2021) Human albumin solutions in intensive care: A review. J Intensive Care Soc 22: 248–254.
https://doi.org/10.1177/1751143720961245
208. *Schneider F, Dureau A-F, Hellé S, Betscha C, Senger B, Cremel G, Boulmedais F, Strub J-M, Corti A, Meyer N, Guillot M, Schaaf P, Metz-Boutigue M-H* (2019) A Pilot Study on Continuous Infusion of 4% Albumin in Critically Ill Patients. Crit Care Explor 1: e0044.
https://doi.org/10.1097/cce.0000000000000044
209. *Ikeda M, Ishima Y, Kinoshita R, Chuang VTG, Tasaka N, Matsuo N, Watanabe H, Shimizu T, Ishida T, Otagiri M, Maruyama T* (2018) A novel S-sulfhydrated human serum albumin preparation suppresses melanin synthesis. Redox Biol 14: 354–360.
https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.10.007
210. *Yilmaz M, Sebe A, Ay MO, Gumusay U, Topal M, Atli M, Icme F, Satar S* (2013) Effectiveness of therapeutic plasma exchange in patients with intermediate syndrome due to organophosphate intoxication. Am J Emerg Med 31: 953–957.
https://doi.org/10.1016/j.ajem.2013.03.016
211. *Tarin Remohi MJ, Sanchez Arcos A, Santos Ramos B, Bautista Paloma J, Guerrero Aznar MD* (2000) Costs related to inappropriate use of albumin in Spain. Ann Pharmacother 34: 1198–1205.
https://doi.org/10.1345/aph.19385
212. *Arola-Arnal A, López De Las Hazas MC, Iglesias-Carres L, Mantilla-Escalante DC, Suárez M, Busto R, Visioli F, Bladé C, Dávalos A* (2020) Exosomes transport trace amounts of (poly)phenols. Food Funct 11: 7784–7792.
https://doi.org/10.1039/d0fo01824d
213. *Sakurai K, Kato T, Tanabe H, Taguchi-Atarashi N, Sato Y, Eguchi A, Watanabe M, Ohno H, Mori C* (2020) Association between gut microbiota composition and glycoalbumin level during pregnancy in Japanese women: Pilot study from Chiba Study of Mother and Child Health. J Diabetes Investig 11: 699–706.
https://doi.org/10.1111/jdi.13177
214. *Hong M, Zhang R, Liu Y, Wu Z, Weng P* (2021) The interaction effect between tea polyphenols and intestinal microbiota: Role in ameliorating neurological diseases. J Food Biochem 2021: e13870.
https://doi.org/10.1111/jfbc.13870
215. *Vlassopoulos A, Lean MEJ, Combet E* (2014) Protein-phenolic interactions and inhibition of glycation-combining a systematic review and experimental models for enhanced physiological relevance. Food Funct 5: 2646–2655.
https://doi.org/10.1039/c4fo00568f
216. *Harris GK, Qian Y, Leonard SS, Sbarra DC, Shi X* (2006) Luteolin and chrysin differentially inhibit cyclooxygenase-2 expression and scavenge reactive oxygen species but similarly inhibit prostaglandin-E 2 formation in RAW 264.7 cells. J Nutr 136: 1517–1521.
https://doi.org/10.1093/jn/136.6.1517
217. *Khan MWA, Al Otaibi A, Sherwani S, Khan WA, Alshammari EM, Al-Zahrani SA, Saleem M, Khan SN, Alouffi S* (2020) Glycation and oxidative stress increase autoantibodies in the elderly.

Molecules 25: 3675.
https://doi.org/10.3390/molecules25163675
218. *Anwar S, Khan S, Almatroudi A, Khan AA, Alsahli MA, Almatroodi SA, Rahmani AH* (2021) A review on mechanism of inhibition of advanced glycation end products formation by plant derived polyphenolic compounds. Mol Biol Rep 48: 787–805.
https://doi.org/10.1007/s11033-020-06084-0

Integrative Role of Albumin: Evolutionary, Biochemical and Pathophysiological Aspects

D. A. Belinskaia[a, *], P. A. Voronina[a], and N. V. Goncharov[a, b]

[a] *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

[b] *Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Kuzmolovsky, Vsevolozhsky District of Leningrad Oblast, Russia*

**e-mail: daria.belinskaya@iephb.ru*

Being one of the main proteins in the human body and many animal species, albumin plays a decisive role in the transport of various ions, electrically neutral molecules and in maintaining the colloidal osmotic pressure of the blood. Albumin is able to bind almost all known drugs, many nutraceuticals and toxic substances, largely determining their pharmaco- and toxicokinetics. However albumin is not only the passive but also the active participant of the pharmacokinetic and toxicokinetic processes possessing a number of enzymatic activities. Due to the thiol group of Cys34, albumin can serve as a trap for reactive oxygen and nitrogen species, thus participating in redox processes. The interaction of the protein with blood cells, blood vessels, and also with tissue cells outside the vascular bed is of great importance. The interaction of albumin with endothelial glycocalyx and vascular endothelial cells largely determines its integrative role. This review provides information of a historical nature, information on evolutionary changes, inflammatory and antioxidant properties of albumin, on its structural and functional modifications and their significance in the pathogenesis of some diseases.

Keywords: albumin, blood plasma, oxidative stress, endothelium, glycocalyx, transport function, transcytosis

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2021, том 107, № 12, с. 1490–1504

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

РАЗВИТИЕ ГИППОКАМП-АССОЦИИРОВАННЫХ КОГНИТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ У МЫШЕЙ С МОДЕЛЬЮ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА

© 2021 г.
Н. А. Красковская[1, *], А. И. Ерофеев[1], Е. Д. Гришина[1], С. А. Пушкарева[1], Е. И. Герасимов[1], О. Л. Власова[1], И. Б. Безпрозванный[1, 2, **]

[1]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

[2]Юго-Западный Медицинский Центр Университета Штата Техас, Даллас, Техас, США

**E-mail: ninakraskovskaya@gmail.com*

***E-mail: mnlabspb@gmail.com*

Поступила в редакцию 17.09.2021 г.
После доработки 24.09.2021 г.
Принята к публикации 24.09.2021 г.

Болезнь Хантингтона – наследственное неизлечимое нейродегенеративное заболевание, которое характеризуется двигательными нарушениями – прогрессирующим хореическим гиперкинезом, а также когнитивными и психическими расстройствами, включающими нарушения памяти, депрессию, панические атаки, навязчивые состояния и др. Согласно данным литературы, небольшие когнитивные нарушения начинают проявляться еще до возникновения первых моторных симптомов. Считается, что основную роль в развитии когнитивной дисфункции играет нейродегенерация коры и стриатума. При этом патологические изменения в гиппокампе, которые также могут вызывать когнитивные нарушения, изучены в гораздо меньшей степени. В настоящем исследовании с использованием электрофизиологических экспериментов, морфофункционального анализа, а также поведенческих тестов, мы произвели комплексную оценку гиппокамп-ассоциированных изменений на трансгенной линии мышей YAC128, моделирующей болезнь Хантингтона. Выявленные нарушения механизмов синаптической пластичности и изменения морфологии синапсов в гиппокампе у мышей линии YAC128 носят прогрессирующий характер и наблюдаются раньше, чем нарушения в координации движений. Таким образом, полученные результаты подтверждают гипотезу о развитии нейродегенеративных изменений в гиппокампе, которые вносят вклад в развитие когнитивной дисфункции при болезни Хантингтона.

Ключевые слова: болезнь Хантингтона, гиппокамп, долговременная потенциация, дендритные шипики, водный лабиринт Морриса, когнитивные нарушения, поведенческие тесты

DOI: 10.31857/S0869813921120050

Болезнь Хантингтона (БХ) – аутосомно-доминантное, наследственное неизлечимое нейродегенеративное заболевание. Данная нейропатология относится к группе патологий, называемых экспансиями тринуклеотидных повторов, характе-

Принятые сокращения: БХ – болезнь Хантингтона, ДВП – долговременная потенциация, mHTT – мутантный хантингтин, ВПСП – возбуждающий постсинаптический потенциал, ПТП – посттетаническое потенцирование.

ризующихся повышением числа таких повторов в регуляторной или транслируемой части генов. В случае БХ имеет место увеличение CAG повтора, кодирующего аминокислоту глутамин в первом экзоне гена белка хантингтина, что приводит к формированию полуглутаминового тракта в белке и развитию фенотипа БХ [1]. Когнитивные и моторные нарушения при нейродегенеративных заболеваниях связаны с морфофункциональными изменениями, происходящими в высших отделах центральной нервной системы. Хотя БХ и считается двигательным расстройством [2], у пациентов также наблюдаются когнитивные нарушения, которые проявляются еще до моторных симптомов [3]. Подобное обстоятельство свидетельствует, что помимо стриатума при БХ патологические процессы затрагивают и другие отделы мозга, ответственные за когнитивные функции [4, 5]. При БХ основными "очагами" нейропатологий считаются стриатум, кора головного мозга, таламус и гиппокамп. При этом последний является наименее изученным среди всех перечисленных образований. К гиппокамп-ассоциированным нарушениям относят нарушения памяти, особенно пространственной, внимания, способности к обучению и запоминанию новой информации. Ключ к пониманию патогенеза дегенеративных процессов, которые происходят в гиппокампе при БХ, лежит в изучении изменений синаптической пластичности и деградации синаптических связей нейронов [6]. Стабильная связь между нейрональными клетками поддерживается контактами аксональных бутонов с постсинаптическими структурами – дендритными шипиками [7]. Однако в результате накопления мутантного белка, количество дендритных шипиков сокращается, вследствие чего развивается синаптическая дисфункция, ведущая в дальнейшем к когнитивным и двигательным нарушениям. Развитие кортико-стриатной синаптической дисфункции и элиминация дендритных шипиков в областях коры и стриатума при БХ детально описана [8–13]. Однако развитие дефектов синаптической пластичности в гиппокампе и их взаимосвязь со снижением количества синапсов и поведенческими нарушениями практически не изучены или исследованы на "агрессивных" мышиных моделях БХ, линиях R6/1 и R6/2, с трансгенной вставкой, несущей только фрагмент *mhtt* (1 экзон). Основным их недостатком считается быстрое развитие фенотипа заболевания, в то время как БХ, как и другие нейродегенеративные заболевания, являются возраст-ассоциированными патологиями, и развитие характерных клинических симптомов начинается в зрелом возрасте. В данном исследовании в качестве модели БХ использовались мыши линии YAC128, несущие трансгенную вставку с полноразмерным геном *mhtt* человека. Использование этой модели позволило в лучшей степени моделировать возраст-ассоциированный фенотип заболевания и при помощи электрофизиологических, морфологических и поведенческих тестов оценить прогрессирование гиппокамп-ассоциированной синаптической дисфункции и когнитивных нарушений.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Трансгенные животные

Исследование проводилось на мышах линии Tg(YAC128)53Hay-M (сокращенно YAC128), которые несут полноразмерный ген человеческого белка хантингтина в составе искусственной хромосомы дрожжей. Также в эксперименте в качестве контроля использовались мыши дикого типа (WT) того же бэкграунда. Гетерозиготных самцов линии FVB-Tg(YAC128)53Hay/J в возрасте 3–6 мес. скрещивали с самками дикого типа такого же возраста. Наличие трансгенной вставки определяли при помощи полимеразной цепной реакции с праймерами к первому экзону гена хантингтина человека (последовательность прямого праймера: 5'-CCG CTC-AGG TTC TGC TTT TA-3' и обратного: 5'-TGG AAG GAC TTG AGG GAC TC-3').

Наличие в пробе зоны на уровне ~170 пар оснований свидетельствовало о наличии трансгенной вставки. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям комиссии по биоэтике Института биомедицинских систем и технологий Санкт-Петербургского Политехнического университета Петра Великого.

Транскардиальная перфузия и приготовление переживающих срезов головного мозга

Перед транскардиальной перфузией мышь анестезировали газовой смесью кислорода с изофлураном (1.5–3%). Перфузию проводили ледяным раствором искусственной спинномозговой жидкости (ИСМЖ) № 1 (в мМ: 92 NMDG, 2.5 KCl, 1.2 NaH_2PO_4, 30 $NaHCO_3$, 20 HEPES, 25 D-глюкозы, 2 тиомочевины, 5 аскорбата натрия, 3 пирувата натрия, 0.5 $CaCl_2$, 10 $MgSO_4$, 6 N-ацетилцистеина) (0–2°C, pH 7.3–7.4), аэрируемой карбогеном (5% O_2 + 95% CO_2). После декапитации мозг быстро извлекали с последующим удалением мозжечка, помещали в ледяной раствор ИСМЖ № 1 на 1 мин. Дорсальную часть мозга фиксировали цианакрилатным клеем на специальной подложке, после чего помещали в ледяной карбогенируемый раствор ИСМЖ № 1 для последующего получения горизонтальных срезов гиппокампа.

Получение горизонтальных срезов гиппокампа осуществляли на вибрационном микротоме Leica VT1200 с амплитудой 1 см и скоростью 0.8 мм/с в дорсовентральной плоскости (рис. 3–4). Толщина срезов составляла 400 мкм для регистрации долговременной потенциации. Далее из полученного среза с помощью скальпеля вырезали область гиппокампа, которую затем переносили в раствор ИСМЖ № 1 комнатной температуры. Через 10 мин полученные срезы гиппокампа переносили в водяную баню для инкубации при температуре 34°C в течение 30 мин. По окончании 30 мин срезы инкубировали в течении 1 ч в растворе ИСМЖ № 2 (в мМ: 92 NaCl, 2.5 KCl, 1.2 NaH_2PO_4, 30 $NaHCO_3$, 20 HEPES, 25 D-глюкозы, 2 тиомочевины, 5 аскорбата натрия, 3 пирувата натрия , 2 $CaCl_2$, 2 $MgSO_4$, 6 N-ацетилцистеина) (0–2°C, pH 7.3–7.4), насыщенном карбогеном, при комнатной температуре. После инкубационного периода проводилась регистрация локальных полевых возбуждающих постсинаптических потенциалов (пВПСП).

Метод регистрации электрофизиологической внеклеточной активности

Для изучения механизмов синаптической пластичности в срезах гиппокампа мышей дикого типа и мышей линии YAC128 использовался электрофизиологический метод, основанный на явлении долговременной потенциации (ДВП). Перед началом регистрации возбуждающих постсинаптических потенциалов срезы переносили в специальную ванночку, заполненную раствором ИСМЖ № 3 (в мМ: 124 NaCl, 2.5 KCl, 1.2 NaH_2PO_4, 24 $NaHCO_3$, 5 HEPES, 12.5 D-глюкозы, 2 $CaCl_2$, 2 $MgSO_4$), насыщенном карбогеном, с постоянным потоком (5 мл/мин) и поддерживаемой температурой на уровне 32°C, и инкубировали в течение 20 мин. В эксперименте использовали 5–6 срезов от каждой мыши. Для регистрации пВПСП и индукции ДВП использовали стимулирующий биполярный электрод (двойная скрученная нить изолированной нихромовой проволоки диаметром 50 мкм (A-M Systems, США)) и регистрирующий стеклянный микроэлектрод. Стимулирующий биполярный электрод располагали на границе областей CA1 и CA2 гиппокампа по ходу расположения коллатералей Шаффера, регистрирующий электрод, заполненный раствором ИСМЖ № 3, – в область CA1. Регистрация пВПСП осуществлялась с помощью усилителя Multiclamp 700B (Molecular devices, США) и цифро-аналого-

вого преобразователя Digidata серии 1440A (Molecular devices, США) с использованием программного обеспечения MultiClamp Commander и pClamp 10.7 (Axon Instruments, США). Запись пВПСП до индукции ДВП осуществляли каждые 20 с парными электрическими импульсами с длительность 0.1 мс и межстимульным интервалом равным 50 мс. Электрические импульсы использовали в диапазоне от 25 до 300 мкА. Силу электрической стимуляции, используемую в эксперименте, подбирали следующим образом. Электрическая стимуляция среза производилась с нулевого значения тока с постепенным увеличением тока с шагом 10 мкА до появления излома у нисходящей фазы пВПСП или появления популяционного спайка. Итоговый ток стимуляции был на 10 мкА (значение равно шагу, с которым производился подбор) меньше тока, при котором появлялся популяционный спайк или излом нисходящей фазы пВПСП. С подобранным током записывали базовую линию (до индукции пВПСП) и производили индукцию ДВП.

Перед индукцией ДВП осуществляли запись пВПСП в течение 20 мин (базовая линия). При этом к индукции ДВП приступали только в случае, если зависимость угла наклона (slope) пВПСП от силы электрической стимуляции не менялась более чем на 10% от первоначального значения. Долговременную потенциацию вызывали с помощью высокочастотной электрической стимуляции (HFS): 100 импульсов в течение 1 с с двухкратным повтором через 200 мс. Регистрацию потенцированных пВПСП после высокочастотной стимуляции производили в течение 60 мин. Для оценки постсинаптической потенциации в срезе усредняли нормированные значения угла наклона в течение первых 3-х мин после высокочастотной стимуляции. Нормированные значения угла наклона рассчитывались как отношение угла наклона после индукции ДВП к среднему значению угла наклона базовой линии.

Приготовление фиксированных срезов головного мозга и анализ морфологии дендритных шипиков

Для визуализации морфологии шипиков на конфокальном микроскопе и дальнейшего анализа был проведен кроссбридинг мышей линии YAC128 с мышами линии Tg(Thy1-EGFP)MJrs/J (линия M). У мышей линии M в одиночных нейронах головного мозга экспрессируется зеленый флуоресцентный белок, что позволяет контрастно выделить тело и отростки отдельных нейронов гиппокампа. В результате скрещивания был получен гибрид двух линий, который затем скрещивали с мышью линии M в рамках одного бэкграунда. Животные 4-го и 5-го поколений составили экспериментальные группы. Всего было сформировано 4 группы из мышей обоих генотипов в возрасте 6 и 9 месяцев, каждая возрастная группа состояла из 5 мышей. Для получения фиксированных срезов головного мозга после анестезии животного уретаном (250 мг/мл разведенные в 0.9%-ном растворе хлорида натрия) производилась транскардиальная перфузия 4%-ным раствором параформальдегида, растворенном в фосфатно-солевом буфере (pH 7.2). Фиксированные срезы были сделаны на вибрационном микротоме Campden Instruments Ltd. Среднее количество срезов составило 35–40 микрофотографий. Микрофотографии дендритов нейронов гиппокампа были сделаны с помощью конфокального микроскопа ThorLabs. Параметры съемки: объектив Olympus UPlanSApo ×100, разрешение 1024 × 1024, толщина среза 0.2 мкм/пиксель, толщина серии срезов составляла 4–5 мкм. От каждой мыши было получено не менее 10 микрофотографий с фрагментами дендритов длиной не менее 40 мкм, на расстоянии 50 мкм от тела нейронов, которые в дальнейшем обрабатывались в программе Imaris. Затем на основе получившихся изображений производился “слепой” анализ морфологии и количества дендритных шипиков вторичных апикальных дендритов нейронов CA1 области гиппокампа с использованием программного обеспечения NeuronStudio soft-

ware package. Шипики классифицировались согласно следующим параметрам: минимальный размер пенькового шипика (min stubby size) – 10; непенькового (non-stubby) – 10; отношение размеров головки шипика к шейке (neck ratio) – 1.1; соотношение сторон для тонкого шипика (thin ratio) – 2.5; размер грибовидного шипика (mushroom size) – 0.3.

Поведенческий тест "водный лабиринт Морриса"

Для исследования пространственной памяти у животных использовался тест "водный лабиринт Морриса", основу которого составлял бассейн из полипропилена диаметром 1.5 м. Навигация для поиска платформы осуществляется при помощи четырех черно-белых ориентиров, расположенных за пределами бассейна и ориентированных в соответствии со сторонами света. Регистрация трека животного осуществляется видеосистемой VS 1304-1 при помощи интерфейса Gigabit Ethernet. Поведенческий тест проводится в течение 5 дней, в ходе которых мышь при помощи черно-белых ориентиров ищет платформу, погруженную в непрозрачную воду в круглом бассейне при температуре воды 21–23°C. Обучающая сессия состоит из 4-ех испытаний в день с интервалом не менее 15 мин и проводится ежедневно в одно и то же время. В течение 90 с мышь ищет в бассейне погруженную платформу. На 5-й день проводится одно тестовое испытание в отсутствие платформы также в течение 90 с. Анализ трека животного осуществлялся в программе "Minopontikos" [14]. Были подсчитаны стандартные параметры: процентное время нахождения в квадранте в тестовый день, где ранее располагалась платформа и количество пересечений платформы. Подсчитывалось также количество успешных попыток во время обучающих сессий.

Статистическая обработка результатов

Для проверки экспериментальных выборок на нормальность распределения использовали критерий Шапиро–Уилка. Если группы демонстрировали дисперсионную однородность, достоверность различий между двумя выборками выявляли с помощью *t*-критерия Стьюдента и между несколькими выборками – однофакторным дисперсионным анализом с последующим применением апостериорного теста Тьюки. При ненормальном распределения данных для выявления различий между двумя выборками использовали U-критерий Манна–Уитни, при нескольких выборках использовали критерий Краскела–Уоллиса и метод Беньямини–Йекутили. Результаты считали достоверными, если вероятность (p) нарушения гипотезы об отсутствии различий между выборками была меньше 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Нарушение долговременной потенциации у мышей с моделью болезни Хантингтона

Для выявления нарушений синаптической пластичности у мышей с моделью БХ измеряли величину ДВП у мышей контрольной (дикий тип, WT) и экспериментальной групп (модель БХ, линия YAC128) в возрасте 4-ех и 6-ти мес. Сравнения проводились между животными одинакового возраста. Регистрация ДВП осуществлялась в переживающих срезах гиппокампа. Сравнение значений ДВП в контроле у мышей дикого типа и мышей линии YAC128 в возрасте 4-ех мес. подтверждают наличие нарушений синаптической пластичности у последних: значение ДВП составило 2.24 ± 0.22 и 1.53 ± 0.15 соответственно (критерий Манна–Уитни, $p < 0.05$; рис. 1*a*). Сравнение значений ДВП у мышей дикого типа и линии YAC128 в возрасте 6-ти месяцев также подтверждают наличие нарушений у последних (рис. 1*b*). У мышей дикого типа среднее значение ДВП составило 1.75 ± 0.13,

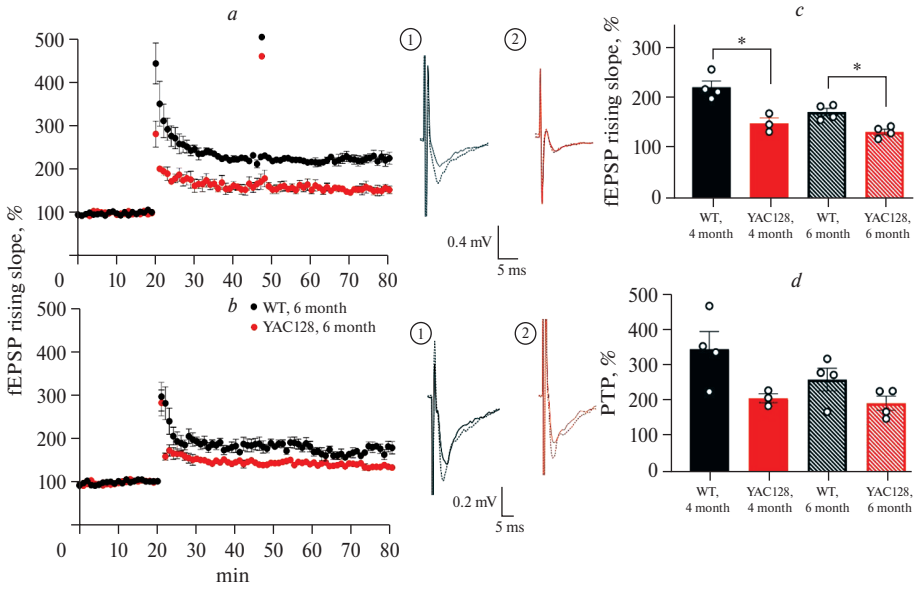


Рис. 1. Долговременная потенциация ослаблена в поле CA1 гиппокампа мышей с моделью БХ в возрасте 4 и 6 месяцев. *a* – примеры записей и нормализованное значение угла наклона пВПСП до (отмечено сплошной линией) и после (отмечено пунктирной линией) высокочастотной стимуляции у мышей дикого типа WT ($n = 4$) и мышей линии YAC128 ($n = 3$) в 4 мес. *b* – примеры записей и нормализованное значение угла наклона пВПСП до (отмечено сплошной линией) и после (отмечено пунктирной линией) высокочастотной стимуляции у мышей дикого типа WT ($n = 4$) и мышей линии YAC128 ($n = 4$) в 6 мес. *c* – диаграмма, иллюстрирующие различия в величине ДВП между мышами дикого типа и мышами с моделью БХ в возрасте 4-ех и 6-ти мес. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего, * $p < 0.05$ достоверность рассчитана по критерию Манна–Уитни. *d* – диаграмма, иллюстрирующая значения ПТП между мышами дикого типа и мышами с моделью БХ в возрасте 4-ех и 6-ти мес. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего.

что статистически значимо отличается (критерий Манна-Уитни, $p < 0.05$) от значения у мышей линии YAC128 (1.35 ± 0.09). Обобщенные результаты представлены на рис. 1*c* в виде диаграмм, иллюстрирующих изменение значения ДВП после высокочастотной стимуляции в контрольной и экспериментальной группах мышей в возрасте 4-ех и 6-ти мес. Кроме оценки уровня ДВП в разных возрастных группах мышей дикого типа и мышей с моделью БХ дополнительно была проведена оценка посттетанического потенцирования (ПТП). Несмотря на то, что статистически значимых различий обнаружено не было, прослеживается тренд к уменьшению значение ПТП у мышей с моделью БХ по сравнению с мышами дикого типа в 4 месяца: 3.49 ± 0.43 и 2.11 ± 0.1 соответственно. В 6 месяцев статистически значимых различий в значении ПТП обнаружено не было: у мышей дикого типа значение ПТП составило 2.6 ± 0.3, а у мышей линии YAC128 – 1.97 ± 0.17 (рис. 1*d*).

2. Морфологические изменения дендритных шипиков нейронов CA1 области гиппокампа у мышей с моделью болезни Хантингтона

Для исследования морфологии дендритных шипиков нейронов в результате кроссбридинга была выведена новая трансгенная линия мышей YAC128-M. У данной линии, помимо mHTT, в одиночных нейронах разных отделов головного мозга

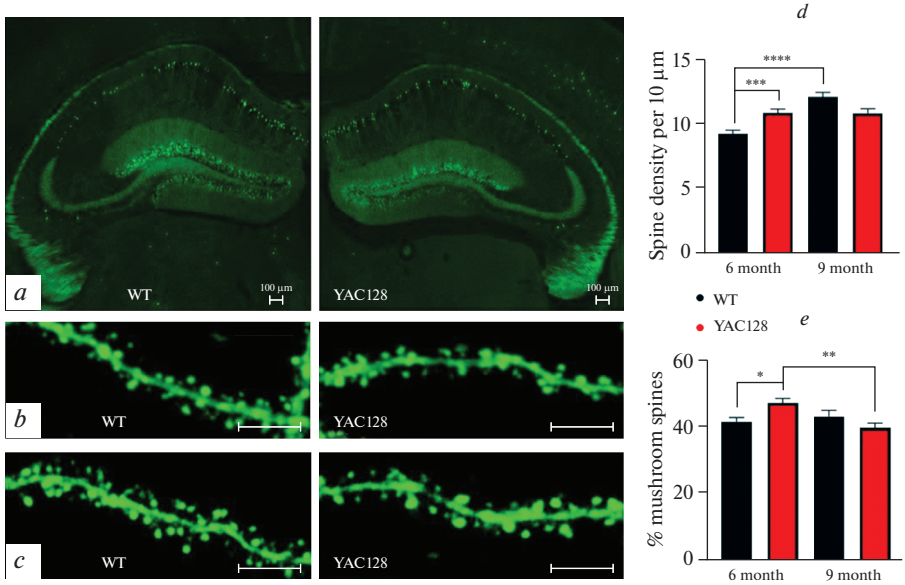


Рис. 2. Изменение морфологии и количества постсинаптических дендритных шипиков у мышей с моделью болезни Хантингтона. *a* – экспрессия зеленого флуоресцентного белка в нейронах гиппокампа на срезах головного мозга мышей дикого типа (WT) и мышей линии YAC128, скрещенных с мышами линии M. Конфокальная микроскопия, ×4. Длина масштабного отрезка 100 мкм. *b* и *c* – микрофотографии фрагментов дендритного древа, иллюстрирующие морфологию дендритных шипиков нейронов CA1 области гиппокампа мышей дикого типа WT ($n = 5$) и мышей линии YAC128 ($n = 5$) в возрасте (*b*) 6-ти и (*c*) 9-ти мес. Конфокальная микроскопия, ×100. Длина масштабного отрезка 10 мкм. *d* – гистограмма, иллюстрирующая плотность дендритных шипиков нейронов CA1 области гиппокампа мышей дикого типа (WT) и мышей с моделью БХ (YAC128) в возрасте 6-ти и 9-ти месяцев. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего, $^{**}p < 0.005$. *e* – гистограмма, иллюстрирующая количество грибовидных дендритных шипиков нейронов CA1 области гиппокампа мышей дикого типа (WT) и мышей с моделью БХ (YAC128) в возрасте 6-ти и 9-ти мес. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего, $^{***}p < 0.001$.

этих животных, в том числе пирамидных нейронах гиппокампа, экспрессируется зеленый флуоресцентный белок, который контролируется нейрон-специфичным промотором Thy1. Это свойство позволяет визуализировать структуру нейрональных клеток для дальнейшего изучения морфологии дендритного древа. Важно отметить, что наличие трансгенной вставки не влияло на уровень флуоресценции белка у мышей с моделью БХ (рис. 2*a*).

Для оценки морфологических различий дендритных шипиков нейронов CA1 области гиппокампа были получены серии микрофотографий фрагментов дендритов мышей в возрасте 6-ти и 9-ти месяцев. В возрасте 6-ти месяцев наблюдались значительные различия в плотности дендритных шипиков у диких и трансгенных мышей (WT – 9.3 ± 0.3 на 10 мкм; YAC128 – 10.9 ± 0.3 на 10 мкм; $p < 0.001$; рис. 2*b*). Наибольший вклад в эту разницу внесло увеличение числа грибовидных шипиков (WT – 41.8 ± 1.3%; YAC128 – 47. 5 ± 1.4%; $p = 0.03$). Однако к возрасту 9-ти месяцев плотность дендритных шипиков нейронов CA1 области гиппокампа у мышей дикого типа оказалась выше, чем у мышей с моделью БХ (WT – 12.1 ± 0.3 на 10 мкм; YAC128 – 10.9 ± 0.3 на 10 мкм; $p = 0.01$; рис. 2*c*). Количество грибовидных шипиков у мышей с БХ оказалось незначительно ниже, чем у мышей дикого типа (WT –

43.3 ± 1.9%; YAC128 – 40 ± 1.4%, YAC128 6 мес. – 47.4 ± 1.3%; $p = 0.15$). У CA1 нейронов мышей дикого типа с возрастом наблюдается тенденция к увеличению плотности дендритных шипиков (WT 6 мес. – 9.2 ± 0.3 на 10 мкм; WT 9 мес. – 12.1 ± 0.3 на 10 мкм; $p = 0.0001$), в то время как у животных с моделью БХ этот показатель практически не изменился (YAC128 в возрасте 6-ти мес. – 10.9 ± 0.3 на 10 мкм; YAC128 в возрасте 9-ти мес. – 10.9 ± 0.3 на 10 мкм; $p = 0.9$) (рис. 2*d*). Кроме того, количество грибовидных шипиков CA1 нейронов мышей трансгенной линии в возрасте 9-ти мес. снижено по сравнению с показателем более молодых животных того же генотипа (YAC128 6 мес. – 47.4 ± 1.3%; YAC128 9 мес. – 40 ± 1.4%; $p = 0.004$) (рис. 2*e*).

3. Нарушения в формировании пространственной памяти у мышей с моделью болезни Хантингтона

Для анализа когнитивных нарушений у мышей с моделью БХ использовался наиболее распространенный тест – водный лабиринт Морриса, позволяющий оценить гиппокамп-ассоциированные нарушения в формировании памяти, в том числе при приобретении новых навыков и запоминания информации. На рис. 3*a* и 3*b* представлены треки мышей дикого типа и мышей линии YAC128 в возрасте 6-ти и 9-ти мес. в тестовый день.

Согласно полученным результатам, мыши линии YAC128 в возрасте 6-ти месяцев в тестовый день в среднем проводили одинаковое количество времени в квадранте, где во время обучения располагалась платформа (28.0 ± 5.1% и 21.6 ± 4.2%) (рис. 3*c*). Мы также рассчитали количество пересечений с областью, где располагалась платформа в обучающих сессиях. Мыши дикого типа в среднем пересекали область расположения платформы чаще – количество пересечений в тестовый день составило 1.81 ± 0.5 раза, а для трансгенных мышей этот показатель составил 1 ± 0.4 раз. Однако статистически значимых значений этот показатель также не достигал (рис. 3*e*). Далее мы оценили способность мышей к обучению, проанализировав количество успешных попыток нахождения платформы в 1-й и 4-й день. Согласно полученным данным, мыши дикого типа к концу обучающих сессий успешнее справлялись с поиском платформы и в среднем находили ее в половине попыток, в то время как количество успешных попыток у мышей с моделью БХ были заметно ниже по сравнению с мышами дикого типа и в среднем состояло из одной успешной попытки ($p = 0.04$). Количество успешных попыток в первый день обучения было одинаковым у мышей обоих генотипов и в среднем состояло из одной попытки. Таким образом, мыши линии дикого типа продемонстрировали способность к обучению и запоминанию новой информации, увеличив количество успешных попыток с 1-й до 2-х к 4-му дню обучения ($p = 0.02$), в то время как мыши линии YAC128 количество успешных попыток в 1-й и 4-й день осталось одинаковым (рис. 3*g*).

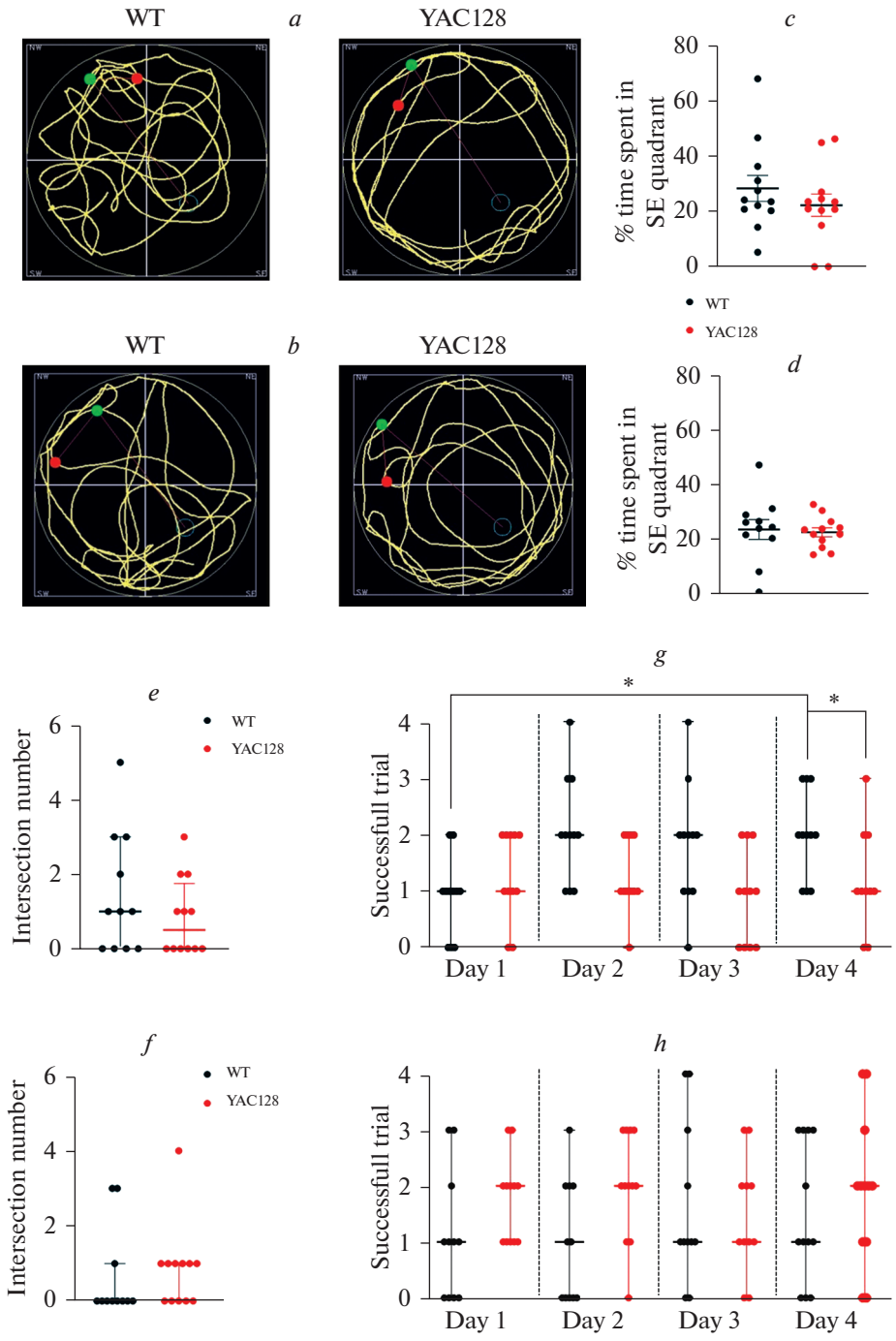
К возрасту 9-ти мес. способность к обучению у мышей обоих генотипов в целом снизилась: в среднем они проводили одинаковое количество времени в квадранте, где во время тренировочных сессий находилась платформа (24.16 ± 3.6% и 23.14 ± 1.7% для мышей дикого типа и линии YAC128 соответственно) (рис. 3*d*). В тестовый день количество пересечений зоны, где ранее находилась платформа, также достоверно не отличалось и составило 0.72 ± 0.3 и 1 ± 0.3 для диких и трансгенных мышей соответственно (рис. 3*f*). При оценке количества успешных попыток также не было обнаружено различий как между генотипами, так и мышами одного генотипа в первый и последний день обучающих сессий, их количество составило 1 и 2 для мышей дикого типа и мышей линии YAC128 соответственно (рис. 3*h*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Долгое время считалось, что когнитивная дисфункция у пациентов с БХ вызвана патологическими изменениями в кортико-стриатном пути. Об этом свидетельствовали данные, полученные как на моделях мышей, так и исследования среди пациентов с БХ [15]. Однако в ряде исследований было отмечено, что патологические процессы в гиппокампе, возникающие вследствие mhtt, могут вносить вклад в развитие когнитивной дисфункции. Об этом свидетельствует прогрессирующее с возрастном накопление mHTT в ядрах клеток гиппокампа с формированием нейрональных внутриядерные включений [16, 17]. Кроме того, в поддержку данной гипотезы свидетельствуют эксперименты по изучению механизмов ДВП в гиппокампе животных с моделью БХ. ДВП представляет собой усиление синаптической передачи между двумя нейронами, сохраняющееся в течение длительного времени после прекращения действия стимула. Согласно концепции современной нейробиологии данный процесс лежит в основе клеточных механизмов памяти и обучения. Впервые нарушение механизмов ДВП в гиппокампе мышей с моделью БХ было показано в статье [18]. Дальнейшие исследования показали взаимосвязь между снижением ДВП и поведенческим фенотипом, выражающимся в нарушении пространственного восприятия [19], причем указанные нарушения имеют место еще до гибели нейрональных клеток. Впоследствии этот феномен был зарегистрировано на различных моделях БХ, в том числе на трансгенной (knock-in) модели Hu97/18 [20], которая уникальна тем, что содержит только ген хантингтина человека. У мышей модели Hu97/18 в возрасте 9 месяцев авторы обнаружили полное отсутствие ДВП в срезах через 50–60 мин после высокочастотной стимуляции, что согласуется с данными [18, 19, 21], при этом в возрасте 3 месяцев было показано, что ДВП не нарушена [22], т.е. когнитивные нарушения в модели Hu97/18 имеют прогрессивный характер. В нашем исследовании ДВП в возрасте 4-ех мес. мы также зарегистрировали снижение величины пластичности после высокочастотной стимуляции у мышей с моделью БХ по сравнению с мышами дикого типа. В возрасте 6-ти мес. также наблюдалось различие ДВП между генотипами.

Функциональные изменения, происходящие в нейронах гиппокампа при БХ, находят отражение в морфологических изменениях. Как и при других нейродеге-

Рис. 3. Нарушения в формировании пространственной памяти у мышей с моделью болезни Хантингтона. *a* – траектория движения мышей дикого типа WT (n = 11) и мышей линии YAC128 (n =11) в бассейне в возрасте 6-ти месяцев в тестовый день. *b* – траектория движения мышей дикого типа WT (n = 12) и мышей линии YAC128 (n = 10) в бассейне в возрасте 9-ти месяцев в тестовый день. *c* – график, иллюстрирующий индивидуальные значения процентного времени нахождения в квадранте бассейна SE в тестовый день, где при обучении находилась скрытая платформа мышей дикого типа WT и мышей линии YAC128 в возрасте 6-ти мес. Данные представлены как среднее значение ± ошибка среднего. *d* – график, иллюстрирующий индивидуальные значения процентного времени нахождения в квадранте бассейна SE в тестовый день, где при обучении находилась скрытая платформа мышей дикого типа WT и мышей линии YAC128 в возрасте 9-ти мес. Данные представлены как среднее значение ± ошибка среднего. *e* – график, иллюстрирующий количество пересечений платформы в тестовый день для мышей дикого типа WT и мышей линии YAC128 в возрасте 6-ти мес. Данные представлены как медиана ± межквартильный интервал. *f* – график, иллюстрирующий индивидуальное количество успешных попыток нахождения платформы в каждый из дней обучения мышей дикого типа WT и мышей линии YAC128 в возрасте 9-ти мес. Данные представлены как медиана ± межквартильный интервал. *g* – график, иллюстрирующий количество пересечений платформы в тестовый день для мышей дикого типа WT и мышей линии YAC128 в возрасте 6-ти мес. Данные представлены как медиана ± межквартильный интервал, $p < 0.05$. *h* – график, иллюстрирующий индивидуальное количество успешных попыток нахождения платформы в каждый из дней обучений мышей дикого типа WT и мышей линии YAC128 в возрасте 9-ти мес. Данные представлены как медиана ± межквартильный интервал.


WT
a
YAC128
c
% time spent in SE quadrant
80
60
40
20
0
WT
YAC128
WT
b
YAC128
d
% time spent in SE quadrant
80
60
40
20
0
e
Intersection number
6
4
2
0
WT
YAC128
g
*
*
Successfull trial
4
3
2
1
0
Day 1
Day 2
Day 3
Day 4
f
Intersection number
6
4
2
0
WT
YAC128
h
Successfull trial
4
3
2
1
0
Day 1
Day 2
Day 3
Day 4

нативных заболеваниях, при БХ наблюдаются изменения структуры дендритного древа нейронов, в особенности дендритных шипиков [13]. Шипики являются весьма динамичными постсинаптическими структурами, поэтому изменения в морфологии шипиков отражают функциональные изменения, происходящие в синапсе при синаптической передаче. Их плотность и морфология тесно коррелирует с активностью множества клеточных процессов, некоторые из которых вовлечены в механизмы регуляции синаптической пластичности, которая, в свою очередь, является субстратом когнитивных функций, таких как обучение и память [23]. Элиминация шипиков приводит к потере синаптических связей между нейронами и лежит в основе клеточных механизмов когнитивных нарушения. Ранее был проведен анализ морфологии апикальных дендритов пирамидных нейронов CA1 области гиппокампа только у мышей модели R6/2, который выявил снижение плотности дендритных шипиков, преимущественно за счет снижения фракции грибовидных шипиков по сравнению с контрольной группой. Кроме того, авторы также отметили увеличение количества филоподиеподобных структур у мышей с моделью БХ [24]. Исследования морфологии дендритных шипиков проводилось также на культивируемых нейронах гиппокампа. Было показано, что грибовидные дендритные шипики больше остальных подвержены элиминации вблизи агрегатов mHTT [25]. Однако у мышей линии YAC128 агрегаты мутантного белка наблюдаются с возраста 12 месяцев [2], поэтому не могут негативно влиять на морфофункциональные изменения в синапсах. В нашем исследовании мы наблюдали сначала увеличение плотности дендритных шипиков и количества грибовидных дендритных шипиков по сравнению с диким типом в возрасте 6 месяцев и затем постепенное снижение плотности шипиков к 9 месяцам, что не может быть объяснено агрегацией mHTT, которая еще не наблюдается в данной возрасте в гиппокампе. Ранее анализ электрофизиологической активности клеток выявил повышенный выброс глутамата из аксонных терминалей кортикальных нейронов, которое было зарегистрировано на данной модели [26]. Эксперименты по изучению колокализации пре- и постсинаптических маркерных белков VGLUT1 и GluA2 также продемонстрировали увеличение грибовидных шипиков в культивируемых нейронах коры, выделенных из мышей линии YAC128 [27]. Еще одно объяснение результатов исследований может вытекать из нормальной функции белка HTT, который в норме усиливает экспрессию нейротрофического фактора мозга (BDNF). Геном мышей трансгенной линии кроме гена, кодирующего собственный HTT, содержит ген человеческого HTT. Поэтому в досимптоматический период повышенный уровень BDNF может приводить к увеличению фракции грибовидных шипиков, важную роль в поддержании структуры которых как раз и играет BDNF. Однако с прогрессированием нейропатологии наблюдается снижение уровня BDNF, которое ранее было показано в статье, описывающей взаимосвязь между структурными изменениями в дендритных шипиках и нарушением синаптической пластичности в гиппокампе при БХ [21]. Как отмечалось выше, морфология синапсов тесно коррелирует с их функциональной активностью, поэтому снижение уровня BDNF при БХ в конечном итоге приводило к снижению полимеризации актина – основного биохимического процесса, ответственного за структурную организацию цитоскелета дендритного шипика.

Нарушение пространственной памяти вследствие агрегации mHTT у мышей линии R6/2 детектируется раньше других поведенческих изменений [28]. У мышей линии YAC128 в возрасте 8-ми мес. также наблюдается нарушения пространственной памяти, выявленное в упрощенном плавательном тесте, отличающимся от теста Морриса малым размером бассейна и временем испытания. У мышей линии Hu97/18 также ухудшается пространственное обучение, детектируемое в тесте

“узнавание известного объекта в новой локации”. В этом тесте у модели БХ нарушения пространственного обучения было отмечено с возраста в 6 месяцев [22].

У пациентов с БХ гиппокамп-ассоциированные нарушения в пространственной ориентации также были выявлены при помощи виртуального бассейна, разделенного на 4 квадранта, в котором осуществляется поиск скрытой платформы. Согласно полученным данным, в среднем контрольная группа и группа пациентов с БХ в доманифестный период проводили большую часть время поиска платформы в правильном квадранте, а пациенты с ранней стадией БХ проводят значительно меньше времени в правильном квадранте по схеме, предполагающей случайный поиск. Кроме того, в ходе исследования испытуемые также выполняли тест парных ассоциаций, оценивающий визуальную и ассоциативную память. Данный тест используется для диагностики болезни Альцгеймера и активирует область гиппокампа, что было показано при помощи функциональной магнитно-резонансной томографии. Пациенты с ранней стадией БХ делали ошибки гораздо чаще, чем здоровые добровольцы. Кроме того, среди пациентов в доманифестный период наблюдалось в три раза больше ошибок в заданиях с шестью и восемью образцами, причем частота ошибок коррелировала с расчетным временем до манифестации болезни [29]. В нашем исследовании мы также наблюдали нарушение в формировании пространственной памяти, начиная с возраста 6-ти мес. И хотя в тестовый день различий в процентном времени и количестве пересечений зоны платформы не было обнаружено, мыши дикого типа в целом лучше справлялись с поиском платформы по окончанию обучающих сессии, в то время как мыши с моделью БХ не были способны запоминать новую информацию и не улучшали свои показатели к концу обучающих сессий, что хорошо коррелирует со снижением синаптической пластичности, наблюдаемое в этом возрасте.

Таким образом, полученные нами данные указывают на непосредственную вовлеченность нейродегенеративных изменений в гиппокампе в развитие когнитивных нарушений, наблюдаемых при БХ. Полученные нами результаты о нарушениях в гиппокампе указывают на системную синаптическую дисфункцию при данной нейропатологии в разных отделах головного мозга, наблюдаемую даже в отсутствие агрегатов мутантного белка в нейронах.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-15-00184) и Министерством науки и высшего образования Российской Федерации в рамках программы Исследовательского центра мирового уровня “Передовые цифровые технологии” (договор № 075-15-2020-934 от 17.11.2020). Финансовая поддержка осуществлялась следующим образом: эксперименты на рис. 1, 2*b*–*e*, 3 были выполнены при поддержке Российского научного фонда. Эксперимент на рис. 2*a* был выполнен при поддержке программы Исследовательского центра мирового уровня.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея и планирование эксперимента (Н.А.К., А.И.Е., И.Б.Б.), сбор данных (Н.А.К., А.И.Е., Е.Д.Г., С.А.П., Г.Е.И.), обработка данных (Н.А.К., А.И.Е., Е.Д.Г., С.А.П., Г.Е.И.), написание и редактирование манускрипта (Н.А.К., А.И.Е., О.Л.В., И.Б.Б.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *The Huntington's Disease Collaborative Research Group* (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. Cell 72: 971–983.
https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90585-e
2. *Van Raamsdonk JM, Warby SC, Hayden MR* (2007) Selective degeneration in YAC mouse models of Huntington disease. Brain Res Bull 72: 124–131.
https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2006.10.018
3. *Van Raamsdonk JM, Pearson J, Slow EJ, Hossain SM, Leavitt BR, Hayden MR* (2005) Cognitive dysfunction precedes neuropathology and motor abnormalities in the YAC128 mouse model of Huntington's disease. J Neurosci 25: 4169–4180.
https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0590-05.2005
4. *Lichter DG, Hershey LA* (2010) Before chorea: pre-Huntington mild cognitive impairment. Neurology 75: 490–491.
https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181ec805b
5. *Lawrence AD, Hodges JR, Rosser AE, Kershaw A, French-Constant C, Rubinsztein DC, Robbins TW, Sahakian BJ* (1998) Evidence for specific cognitive deficits in preclinical Huntington's disease. Brain 121 (Pt 7): 1329–1341.
https://doi.org/10.1093/brain/121.7.1329
6. *Nithianantharajah J, Hannan A* (2013) Dysregulation of synaptic proteins, dendritic spine abnormalities and pathological plasticity of synapses as experience-dependent mediators of cognitive and psychiatric symptoms in Huntington's disease. Neuroscience 251: 66–74.
https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.05.043
7. *Tonnesen J, Nagerl UV* (2016) Dendritic Spines as Tunable Regulators of Synaptic Signals. Front Psychiatry 7: 101.
https://doi.org/10.3389/fpsyt.2016.00101
8. *Wu J, Ryskamp DA, Liang X, Egorova P, Zakharova O, Hung G, Bezprozvanny I* (2016) Enhanced Store-Operated Calcium Entry Leads to Striatal Synaptic Loss in a Huntington's Disease Mouse Model. J Neurosci 36: 125–141.
https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1038-15.2016
9. *Cepeda C, Hurst RS, Calvert CR, Hernandez-Echeagaray E, Nguyen OK, Jocoy E, Christian LJ, Ariano MA, Levine MS* (2003) Transient and progressive electrophysiological alterations in the corticostriatal pathway in a mouse model of Huntington's disease. J Neurosci 23: 961–969.
https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-03-00961.2003
10. *Indersmitten T, Tran CH, Cepeda C, Levine MS* (2015) Altered excitatory and inhibitory inputs to striatal medium-sized spiny neurons and cortical pyramidal neurons in the Q175 mouse model of Huntington's disease. J Neurophysiol 113: 2953–2966.
https://doi.org/10.1152/jn.01056.2014
11. *Murmu RP, Li W, Holtmaat A, Li JY* (2013) Dendritic spine instability leads to progressive neocortical spine loss in a mouse model of Huntington's disease. J Neurosci 33: 12997–13009.
https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5284-12.2013
12. *Schmidt ME, Buren C, Mackay JP, Cheung D, Dal Cengio L, Raymond LA, Hayden M* (2018) Altering cortical input unmasks synaptic phenotypes in the YAC128 cortico-striatal co-culture model of Huntington disease. BMC Biol 16: 58.
https://doi.org/10.1186/s12915-018-0526-3
13. *Spires TL, Grote HE, Garry S, Cordery PM, Van Dellen A, Blakemore C, Hannan AJ* (2004) Dendritic spine pathology and deficits in experience-dependent dendritic plasticity in R6/1 Huntington's disease transgenic mice. Eur J Neurosci 19: 2799–2807.
https://doi.org/10.1111/j.0953-816X.2004.03374.x
14. *Chernyuk DP, Zorin AG, Derevtsova KZ, Efimova EV, Prikhodko VA, Sysoev YI, Vlasova OL, Bolsunovskaia MV, Bezprozvanny IB* (2021) Automatic analysis of the "Morris water maze" behavioral test data. Zhurn Vysshei Nervn Deyatelnosti Im IP Pavlova. 71: 126–135.
https://doi.org/10.31857/S0044467721010044
15. *Montoya A, Price BH, Menear M, Lepage M* (2006) Brain imaging and cognitive dysfunctions in Huntington's disease. J Psychiatry Neurosci 31: 21–29.
16. *Milnerwood AJ, Cummings DM, Dallerac GM, Brown JY, Vatsavayai SC, Hirst MC, Rezaie P, Murphy KP* (2006) Early development of aberrant synaptic plasticity in a mouse model of Huntington's disease. Hum Mol Genet 15: 1690–1703.
https://doi.org/10.1093/hmg/ddl092
17. *Paldino E, Giampa C, Montagna E, Angeloni C, Fusco FR* (2019) Modulation of Phospho-CREB by Systemically Administered Recombinant BDNF in the Hippocampus of the R6/2 Mouse Model of Huntington's Disease. Neurosci J 2019: 8363274.
https://doi.org/10.1155/2019/8363274

18. *Usdin MT, Shelbourne PF, Myers RM, Madison DV* (1999) Impaired synaptic plasticity in mice carrying the Huntington's disease mutation. Hum Mol Genet 8: 839–846. https://doi.org/10.1093/hmg/8.5.839
19. *Murphy KP, Carter RJ, Lione LA, Mangiarini L, Mahal A, Bates GP, Dunnett SB, Morton AJ* (2000) Abnormal synaptic plasticity and impaired spatial cognition in mice transgenic for exon 1 of the human Huntington's disease mutation. J Neurosci 20: 5115–5123. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-13-05115.2000
20. *Kolodziejczyk K, Parsons MP, Southwell AL, Hayden MR, Raymond LA* (2014) Striatal synaptic dysfunction and hippocampal plasticity deficits in the Hu97/18 mouse model of Huntington disease. PLoS One 9: e94562. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094562
21. *Lynch G, Kramar EA, Rex CS, Jia Y, Chappas D, Gall CM, Simmons DA.* (2007) Brain-derived neurotrophic factor restores synaptic plasticity in a knock-in mouse model of Huntington's disease. J Neurosci 27: 4424–4434. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5113-06.2007
22. *Southwell AL, Warby SC, Carroll JB, Doty CN, Skotte NH, Zhang W, Villanueva EB, Kovalik V, Xie Y, Pouladi MA, Collins JA, Yang XW, Franciosi S, Hayden MR* (2013) A fully humanized transgenic mouse model of Huntington disease. Hum Mol Genet 22: 18–34. https://doi.org/10.1093/hmg/dds397
23. *McCann RF, Ross DA* (2017) A Fragile Balance: Dendritic Spines, Learning, and Memory. Biol Psychiatry 82: e11–e13. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.05.020
24. *Bulley SJ, Drew CJ, Morton AJ* (2012) Direct Visualisation of Abnormal Dendritic Spine Morphology in the Hippocampus of the R6/2 Transgenic Mouse Model of Huntington's Disease. J Huntingtons Dis 1: 267–273. https://doi.org/10.3233/JHD-120024
25. *Richards P, Didszun C, Campesan S, Simpson A, Horley B, Young KW, Glynn P, Cain K, Kyriacou CP, Giorgini F, Nicotera P* (2011) Dendritic spine loss and neurodegeneration is rescued by Rab11 in models of Huntington's disease. Cell Death Differ 18: 191–200. https://doi.org/10.1038/cdd.2010.127
26. *Koch ET, Woodard CL, Raymond LA* (2018) Direct assessment of presynaptic modulation of cortico-striatal glutamate release in a Huntington's disease mouse model. J Neurophysiol 120: 3077–3084. https://doi.org/10.1152/jn.00638.2018
27. *Smith-Dijak AI, Nassrallah WB, Zhang LYJ, Geva M, Hayden MR, Raymond LA* (2019) Impairment and Restoration of Homeostatic Plasticity in Cultured Cortical Neurons From a Mouse Model of Huntington Disease. Front Cell Neurosci 13: 209. https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00209
28. *Lione LA, Carter RJ, Hunt MJ, Bates GP, Morton AJ, Dunnett SB* (1999) Selective discrimination learning impairments in mice expressing the human Huntington's disease mutation. J Neurosci 19: 10428–10437. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-23-10428.1999
29. *Begeti F, Schwab LC, Mason SL, Barker RA* (2016) Hippocampal dysfunction defines disease onset in Huntington's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry 87: 975–981. https://doi.org/10.1136/jnnp-2015-312413

Development of Hippocampus-Associated Cognitive Disfunction in Huntington's Disease Mouse Model

N. A. Kraskovskaya[a, *], A. I. Erofeev[a], E. D. Grishina[a], S. A. Pushkareva[a], E. I. Gerasimov[a], O. L. Vlasova[a], and I. B. Bezprozvanny[a, b, **]

[a] *Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University, Saint-Petersburg, Russia*
[b] *Department of Physiology, UT Southwestern Medical Center at Dallas, Dallas, USA*
**e-mail: ninakraskovskaya@gmail.com*
***e-mail: mnlabspb@gmail.com*

Huntington's disease is a hereditary, incurable neurodegenerative disease characterized by movement disorders – progressive choreic hyperkinesis, as well as cognitive and mental disturbances, including memory impairments, depression, panic attacks, obsessive compulsions, etc. According to literature data, mild cognitive impairments begin to appear even before the first motor symptoms. It is believed that the neurodegeneration of the cortex and striatum plays a major role in the development of cognitive dysfunction.

At the same time, pathological changes in the hippocampus, which can also cause cognitive impairment, have been studied to a much lesser extent. In the present study, using electrophysiological experiments, morphofunctional analysis, and behavioral tests, we performed a comprehensive assessment of hippocampus-associated changes in a YAC128 transgenic mouse strain that model Huntington's disease. The revealed disturbances in the mechanisms of synaptic plasticity and changes in the morphology of synapses in the hippocampus in YAC128 mice are progressive and are observed earlier than disturbances in the coordination of movements. Thus, the results obtained support the hypothesis of the development of neurodegenerative changes in the hippocampus, which contribute to the cognitive dysfunction in Huntington's disease.

Keywords: Huntington's disease, hippocampus, long-term potentiation, dendritic spines, Morris water maze, cognitive impairment, behavioral tests

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2021, том 107, № 12, с. 1505–1517

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ВЛИЯНИЕ БЛОКАДЫ СИНТЕЗА NO НА ОСМОРЕГУЛИРУЮЩУЮ ФУНКЦИЮ ПОЧЕК В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ ГИПОТИРЕОЗА У КРЫС С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ ВАЗОПРЕССИНА В КРОВИ

© 2021 г. П. Д. Правикова[1], *, Л. Н. Иванова[1]

[1]*Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия*

**E-mail: PollyPravi@yandex.ru*

Поступила в редакцию 17.09.2021 г.
После доработки 28.09.2021 г.
Принята к публикации 29.09.2021 г.

Исследовано влияние блокады синтеза оксида азота (NO) на осморегулирующую функцию почек у крыс линии WAG, а также у вазопрессин-дефицитных крыс линии Brattleboro в условиях моделирования гипотиреоза раствором метимазола. Установлено, что NO модулирует гидроосмотический эффект вазопрессина, влияя на параметры гидруреза вне зависимости от уровня синтеза тиреоидных гормонов. Между тем выявлено, что NO играет существенную роль в развитии антинатрийуреза у крыс в условиях блокады синтеза тиреоидных гормонов, причем данный эффект не зависит от уровня эндогенного вазопрессина в крови. У крыс WAG и вазопрессин-дефицитной линии Brattleboro моделирование гипотиреоза способствует развитию антинатрийуретической реакции, в то время как устранение действия NO на фоне блокады синтеза тиреоидных гормонов приводит к развитию натрийуреза. Результаты исследования свидетельствуют о существенной роли NO в подавлении экскреции натрия почками при гипотиреозе. Обсуждаются возможные механизмы, лежащие в основе влияния NO на параметры натрийуретической функции почек у крыс линий WAG и Brattleboro в условиях подавления синтеза тиреоидных гормонов.

Ключевые слова: тиреоидная система, оксид азота (II), вазопрессин, линии крыс WAG и Brattleboro, осморегулирующая функция почек

DOI: 10.31857/S0869813921120086

Почка млекопитающих является основным эффектором в системе регуляции водно-электролитного баланса благодаря способности в широких пределах варьировать экскрецию воды и натрия в ответ на изменение уровня в крови ряда системных гормонов: вазопрессина (ВП), окситоцина, глюкокортикоидов, минералкортикоидов и др. [1]. Тиреоидная система непосредственно оказывает влияние на процесс формирования и роста почечной ткани [2], на почечную гемодинамику [3] и участвует в регуляции экскреции солей и воды [4, 5]. Дисфункция щитовидной железы является причиной значительных изменений в регуляции водно-солевого гомеостаза, механизмы которых нуждаются в дальнейшем изучении. Гипотиреоз, как известно, сопровождается снижением скорости клубочковой фильтрации [6], нарушением способности к разведению мочи вследствие гиперсекреции вазопрессина (СНПВ), приводящего к значительному удержанию воды [7, 8]. В то же время при гиперсекреции щитовидной железы, напротив, выявляется полиурия [9] вследствие ускорения скорости клубочковой фильтрации [10].

Адекватность и устойчивость работы любой регуляторной системы у высших животных зависит от функционирования механизмов, модулирующих эффект основного стимулирующего фактора по принципу отрицательной обратной связи. Одним из таких факторов, эндогенным субстратом для синтеза которого служит L-аргинин, является оксид азота, NO, который будучи почечным аутакоидом модулирует процесс осмотического концентрирования благодаря прямому ингибирующему влиянию на транспорт натрия в почечных канальцах [11, 12], а также ВП-независимой активацией транспорта воды [13, 14]. В то же время известно, что в условиях гипотиреоза фиксируется увеличение уровня NO во многих тканях организма [15, 16], в том числе почечной медулле [17], что указывает на роль тиреоидной системы в модуляции синтеза почечного аутакоида NO.

Принимая во внимание важность активности локального фактора почки NO в регуляции водно-солевого гомеостаза на фоне дисфункции щитовидной железы, целью данной работы явилось исследование влияния NO на функцию осмотического концентрирования у крыс с различным уровнем эндогенного ВП в крови в условиях гипотиреоза.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В опытах использованы крысы в возрасте 60-ти дней и массой 150–200 г из вивария конвенциональных животных Института цитологии и генетики СО РАН, содержавшиеся в условиях стандартного рациона со свободным доступом к питьевой воде и сухому корму. Эксперименты проведены на крысах инбредной линии WAG (Wistar Albino Glaxo) с высоким уровнем ВП в крови и на гомозиготных крысах линии Brattleboro, лишенных ВП вследствие мутации гена, кодирующего предшественник гормона [18]. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ (Приложение к Приказу Министерства здравоохранения РФ № 267 от 19.06.2003), а также с учетом международных рекомендаций по работе с экспериментальными животными.

Все животные были разделены на 4 экспериментальные группы для каждой линии (по 9 особей в каждой): 1) контрольная группа; 2) крысы в условиях блокады синтеза тиреоидных гормонов раствором метимазола; 3) блокада синтеза NO введением L-NAME в течение 2-х сут; 4) гипотиреоидные особи на фоне блокады синтеза NO. Крысы WAG в течение 6 нед. потребляли 0.05%-ный раствор метимазола (Тирозол, Merk, Германия), блокирующий пероксидазу, участвующую в йодировании тиреоидных гормонов [19]. В то же время, учитывая межлинейные различия в суточном объеме потребляемой жидкости, для уравнивания суточной дозы препарата особи Brattleboro имели свободный доступ к 0.01%-ному раствору метимазола, поскольку суточное потребление жидкости у интактных особей Brattleboro было в пять раз больше по сравнению с контрольными крысами WAG. Контрольные особи двух линий потребляли дистиллированную воду.

Учитывая данные литературы об увеличении в условиях гипотиреоза уровня NO во многих тканях организма, в том числе почечной ткани [17], для выявления эффекта NO на концентрирующую функцию почек при гипотиреозе была предпринята серия экспериментов, в которых блокада синтеза тиреоидных гомонов раствором метимазола осуществлялась на фоне внутрибрюшинного введения неселективного ингибитора синтаз NO (L-NAME) дважды в день в течение последних 2 сут в дозе 3 мг на 100 г массы тела [20]. Контрольным особям линий WAG и Brattleboro, содержавшимся в условиях стандартного потребления воды, устранение действия NO осуществлялось на фоне введения L-NAME (дважды в сутки в течение 2-х дней, 3 мг/100 г массы тела).

В течение всего экспериментального периода ежедневно подсчитывали объем выпитой жидкости, каждую неделю животных взвешивали и на 2 ч помещали в индивидуальные клетки с проволочным дном для сбора спонтанно экскретируемой мочи. По окончании эксперимента животных анестезировали тиопенталом натрия (10 мг/100 г массы тела, внутрибрюшинно), декапитировали и забирали пробы крови.

Осмоляльность мочи и сыворотки крови определяли криоскопическим методом (миллиосмометр ОСКР-1М КИВИ, Россия). Концентрацию креатинина в моче и сыворотке крови определяли методом Яффе на спектрофотометре (BioPhotometr plus, “Eppendorf”, Германия, 490 нм), скорость клубочковой фильтрации рассчитывали по клиренсу эндогенного креатинина. Концентрацию общего уровня тетрайодтиронина в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом (Rat thyroxine (T4) ELISA Kit, Cusabio, CSB-E05082r). Содержание катионов натрия в пробах мочи и сыворотке крови измеряли методом пламенной фотометрии (Flame photometer 410 Sherwood, Великобритания). По стандартным формулам рассчитывали клиренс осмотически активных веществ (Сосм), максимальную реабсорбцию $\left(T^{C}_{H_2O}\right)$, осмотически свободной воды, экскрецию натрия (E_{Na}) и экскретируемую фракцию натрия (FE_{Na}).

Данные представлены в виде среднего значения ± ошибка среднего ($M \pm SEM$). Достоверность межлинейных различий оценивали в программе Statistica 8.0 с помощью апостериорного LSD критерия Фишера для множественных сравнений. Для парного сравнения средних внутри линий применялся критерий Стьюдента для независимых выборок. Различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Базальный уровень тетрайодтиронина (T4) в сыворотке крови у контрольных групп WAG и Brattleboro был достаточно высоким и не имел межлинейных различий (рис. 1). У крыс обеих линий, содержавшихся в течение 6 недель в условиях подавления метимазолом синтеза тиреоидных гормонов, было выявлено значительное снижение общего уровня тетрайодтиронина (T4), более выраженное у ВП-дефицитных крыс Brattleboro (рис. 1).

У контрольных крыс линии WAG и Brattleboro, содержавшихся в условиях стандартного потребления жидкости и корма, в течение двух месяцев экспериментального цикла был зафиксирован прогрессирующий рост массы тела (рис. 2). У крыс WAG при шестинедельной блокаде синтеза тиреоидных гормонов метимазолом динамика массы тела не имела существенных различий по сравнению с контрольной группой, в то время как у крыс Brattleboro в условиях потребления метимазола масса тела оставалась на низком исходном уровне в течение всего экспериментального периода (рис. 2). Отсутствие существенного роста массы тела у ВП-дефицитных крыс Brattleboro в условиях моделирования гипотиреоза является следствием устранения активирующего влияния тиреоидной системы на скорость основного обмена, являющуюся ключевым условием роста и развития организма [4]. Кроме того, количество рецепторов в печени к соматотропному гормону, а также активность в плазме гормона соматомедина, существенно снижена у крыс Brattleboro [21], это является возможным объяснением того, что линия Brattleboro более чувствительна к любым нарушениям регуляции роста. В то же время у крыс WAG наличие эндогенного ВП в крови явилось фактором, компенсирующим подавление обменных процессов организма на фоне потребления раствора метимазола.

Как известно, чувство жажды регулируется содержанием электролитов в плазме крови, а также объемом циркулирующей крови: при увеличении натрия в экстрак-

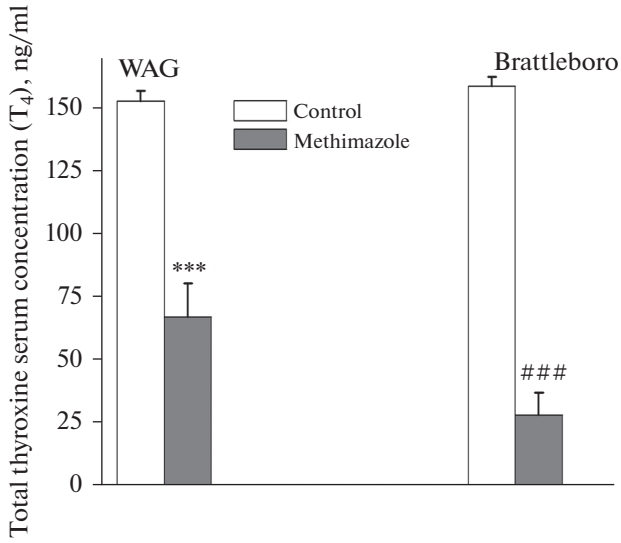


Рис. 1. Концентрация гормона Т4 в сыворотке крови крыс линии WAG и ВП-дефицитной линии Brattleboro в контрольных условиях и при хроническом подавлении синтеза тиреоидных гормонов (гипотиреоз).

Достоверность различий: *** $p < 0.01$ – сравнение с контрольными показателями крыс WAG; $^{###}p < 0.001$ – сравнение с контрольными показателями крыс Brattleboro.

леточном пространстве, сопровождаемого гиповолемией, активируется гипоталамический центр жажды [22]. В экспериментах использованы крысы Brattleboro, потреблявшие за сутки объем воды, превышающий 60 мл, что характерно для ВП-дефицитных гомозигот [18]. В то же время крысы WAG с нормальным уровнем ВП в крови выпивали за сутки объем жидкости не более 14 мл (рис. 3). У крыс WAG в течение двух недель эксперимента при моделировании раствором метимазола гипотиреоза было выявлено достоверное снижение суточного объема потребляемого раствора, которое сохранялось в течение 2-х нед., а затем объем увеличивался до значений, характерных для контрольных особей (рис. 3). Между тем у ВП-дефицитных крыс Brattleboro было выявлено снижение объема выпитого раствора на протяжении всего эксперимента с первой недели опыта (рис. 3), что согласуется с ранее зафиксированным снижением потребления воды у крыс в условиях гипотиреоза [23].

Нарушение питьевого поведения у крыс Brattleboro отражается на параметрах гидруретической функции при потреблении метимазола (рис. 4). У ВП-дефицитных крыс Brattleboro было выявлено снижение скорости мочеотделения вследствие увеличения реабсорбции осмотически свободной воды (рис. 4) на фоне закономерного уменьшения скорости клубочковой фильтрации при гипотиреозе (рис. 5) [6]. Между тем у крыс WAG моделирование гипотиреоза раствором метимазола не привело к изменению гидруретической функции почек по сравнению с контрольными особями, потреблявшими дистиллированную воду (рис. 4) несмотря на значительное снижение скорости клубочковой фильтрации (рис. 5). По-видимому, наличие ВП оказывает преобладающее влияние на показатели гидруретической функции, компенсируя эффект блокады синтеза тиреоидных гормонов. В то же время выявленное увеличение показателя реабсорбции осмотически свободной

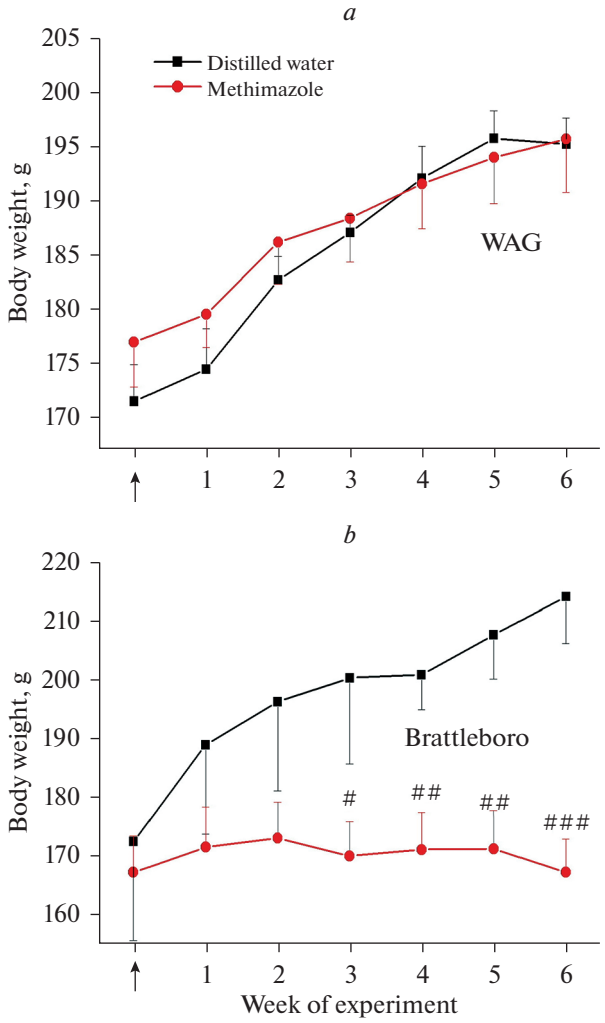


Рис. 2. Динамика массы тела в течение 6 недель у крыс линии WAG (*a*) и ВП-дефицитной линии Brattleboro (*b*) в условиях потребления раствора метимазола по сравнению с контрольными особями.

Достоверность различий: $^{\#}p < 0.05$; $^{\#\#}p < 0.01$; $^{\#\#\#}p < 0.001$ — сравнение с контрольными показателями крыс линии Brattleboro.

воды у крыс Brattleboro в условиях потребления метимазола является следствием устранения тонического ингибирующего влияния тиреоидной системы на факультативную реабсорбцию воды. Ранее было обнаружено, что моделирование гипофункции щитовидной железы приводило к увеличение экспрессии аквапорина AQP1-3 в ткани почки, проводящее к задержке воды [19, 24], в то время как введение в течение двух недель крысам тироксина способствовало развитию полиурии, которая была следствием снижения экспрессии аквапоринов AQP1 и AQP2 в корковом и мозговом веществе почки [9]. Зафиксированная антидиуретическая реакция у крыс Brattleboro подтверждает ранее выявленный факт о ВП-независимых механизмах, лежащих в основе нарушения экскреции воды при гипотиреозе [25].

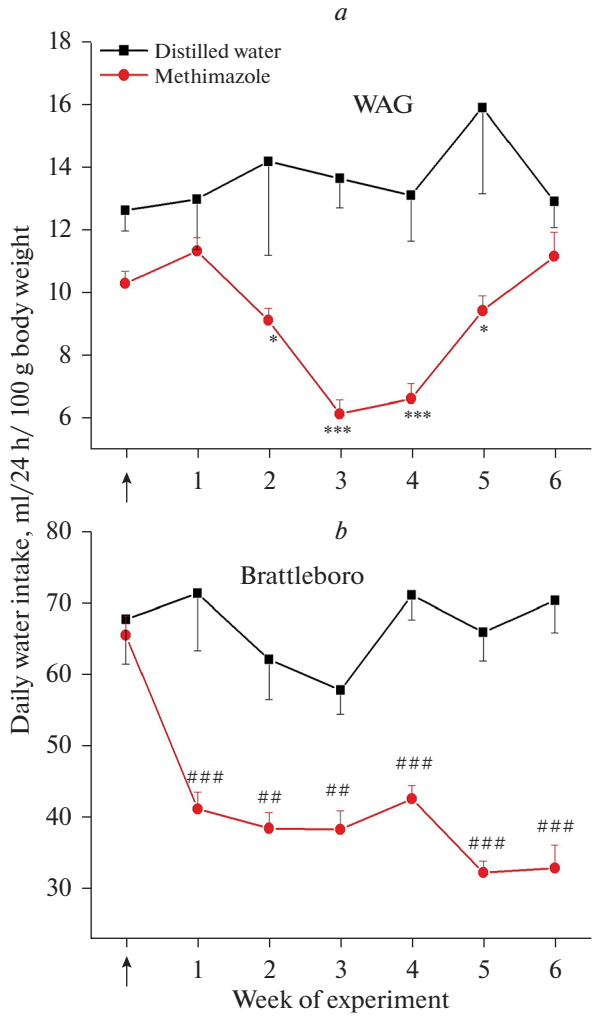


Рис. 3. Изменение суточного потребления жидкости в течение 6 нед. у крыс линии WAG (*a*) и ВП-дефицитной линии Brattleboro (*b*) в условиях потребления раствора метимазола по сравнению с контрольными особями.
Достоверность различий: $^{*}p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$ —сравнение с контрольными показателями крыс WAG; $^{\#\#}p < 0.01$; $^{\#\#\#}p < 0.001$—сравнение с контрольными показателями крыс линии Brattleboro.

Поскольку в условиях гипотиреоза ранее было зафиксировано увеличение как уровня NO в сыворотке крови, так и экспрессии iNOS в щитовидной железе [15], а также рост NOS-активности в почечной медулле [17], представляло интерес оценить функцию осмотического концентрирования в условиях гипотиреоза на фоне блокады синтеза NO. NO — локальный фактор, синтез которого в почке регулирует сам ВП, формируя негативную обратную связь [26]. NO модулирует процесс осмотического концентрирования благодаря прямому ингибирующему влиянию на транспорт натрия в почечных канальцах [27], а также ВП-независимой активацией транспорта воды [14]. Как было показано нами ранее [28], устранение действия NO

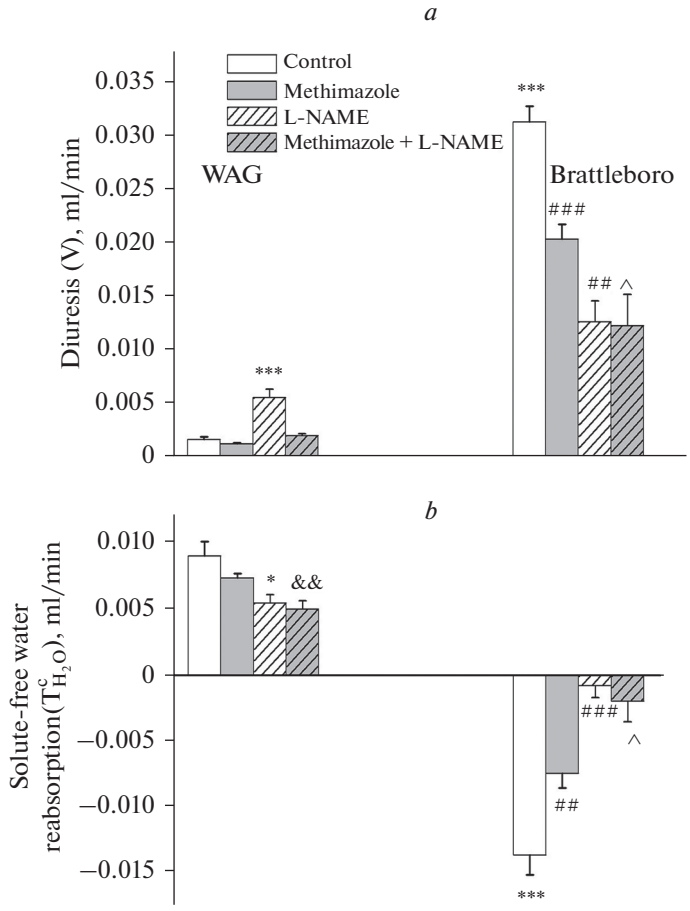


Рис. 4. Параметры гидруретической функции почек в условиях подавления активности тиреоидной системы на фоне блокады синтеза NO введением L-NAME у крыс линий WAG и Brattleboro ($M \pm SEM$).

a — скорость мочеотделения (V); *b* — реабсорбция осмотически свободной воды $\left(T^C_{H_2O}\right)$. Достоверность различий: $^{*}p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$ — сравнение с контрольными показателями крыс линии WAG; $^{\&\&}p < 0.01$ — сравнение с гипотиреоидной группой WAG; $^{\#\#}p < 0.01$; $^{\#\#\#}p < 0.001$ — сравнение с контрольными показателями крыс линии Brattleboro; $^{\wedge}p < 0.05$ — сравнение с гипотиреоидной группой крыс линии Brattleboro.

при введении L-NAME вызывает разнонаправленные изменения гидруретической функции почек у крыс двух линий при существенном снижении скорости клубочковой фильтрации в связи с вазоконстрикторным эффектом блокады [29]. У крыс WAG, потреблявших дистиллированную воду, в условиях блокады синтеза NO наблюдалось снижение реабсорбции осмотически свободной воды, которое также было зафиксировано в условиях подавления синтеза тиреоидных гормонов раствором метимазола (рис. 4). Блокада синтеза NO привела к снижению эффективности концентрирования мочи вследствие торможения реабсорбции воды, что указывает на стимулирующее влияние NO на водопроницаемость эпителия почечных канальцев, выявленное ранее в экспериментах *in vitro*, согласно которым активация

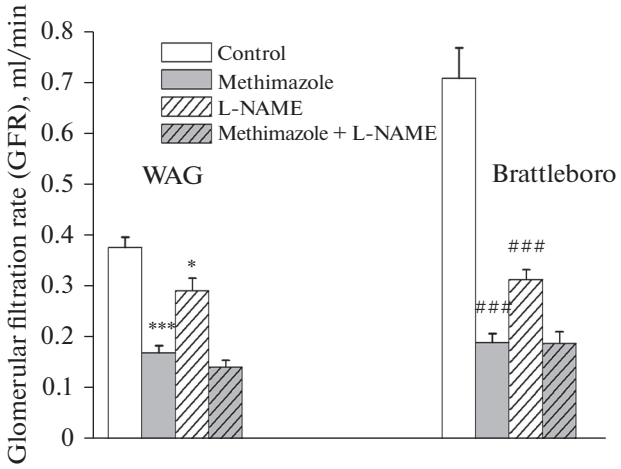


Рис. 5. Скорость клубочковой фильтрации в условиях подавления активности тиреоидной системы на фоне блокады синтеза NO (L-NAME) у крыс линий WAG и Brattleboro ($M \pm SEM$).
Достоверность различий: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ — сравнение с контрольными показателями крыс WAG; ### $p < 0.001$ — сравнение с контрольными показателями крыс линии Brattleboro.

синтеза NO индуцирует транслокацию аквапорина AQP2 в апикальную мембрану эпителиоцитов собирательных трубок [30]. В то же время блокада синтеза NO у ВП-дефицитных крыс Brattleboro привела как в условиях нормального уровня синтеза тиреоидных гормонов, так и при подавлении их секреции к проявлению принципиально иной реакции по сравнению с крысами WAG – к развитию антидиуреза (рис. 4), что является, очевидно, следствием устранения тонического ингибирующего действия эндогенного NO на процесс реабсорбции воды [31]. Учитывая полученные данные, можно заключить, что NO модулирует гидруретическую функцию почек вне зависимости от уровня синтеза тиреоидных гормонов.

Основным катионом внеклеточной жидкости организма является натрий, динамика выведения которого почками вносит несомненный вклад в концентрирование мочи и в осморегулирующий процесс в целом. Реабсорбция натрия осуществляется эпителием всех сегментов нефрона и собирательных трубок и находится под контролем комплекса гормональных и местных гуморальных факторов. Почечный аутакоид NO, как известно, принимает участие в модуляции различных физиологических процессов в почке, включая регуляцию реабсорбции солей и воды [32]. NO оказывает преимущественный ингибирующий эффект на транспорт натрия вдоль нефрона и собирательных трубок: активация синтеза NO блокирует активность эпителиального натриевого канала EnaC и приводит к развитию натрийуреза [27], а блокада нейрональной синтазы NO (NOS1), напротив, снижает экскрецию натрия [33]. Устранение действия NO в условиях введения L-NAME контрольным крысам, потреблявшим дистиллированную воду, способствовало изменению натрийуретической функции лишь у ВП-дефицитных крыс Brattleboro: снижение экскреции и экскретируемой фракции натрия (рис. 6). В то же время у крыс WAG на фоне введения L-NAME не было выявлено существенных изменений параметров натрийуреза (рис. 6), что обусловлено сохранением преимущественного активирующего влияния эндогенного ВП на реабсорбцию натрия.

Известно, что тиреоидные гормоны регулируют работу многих ионных транспортеров в канальцах почки, усиливая как активность Na-P-котранспортера,

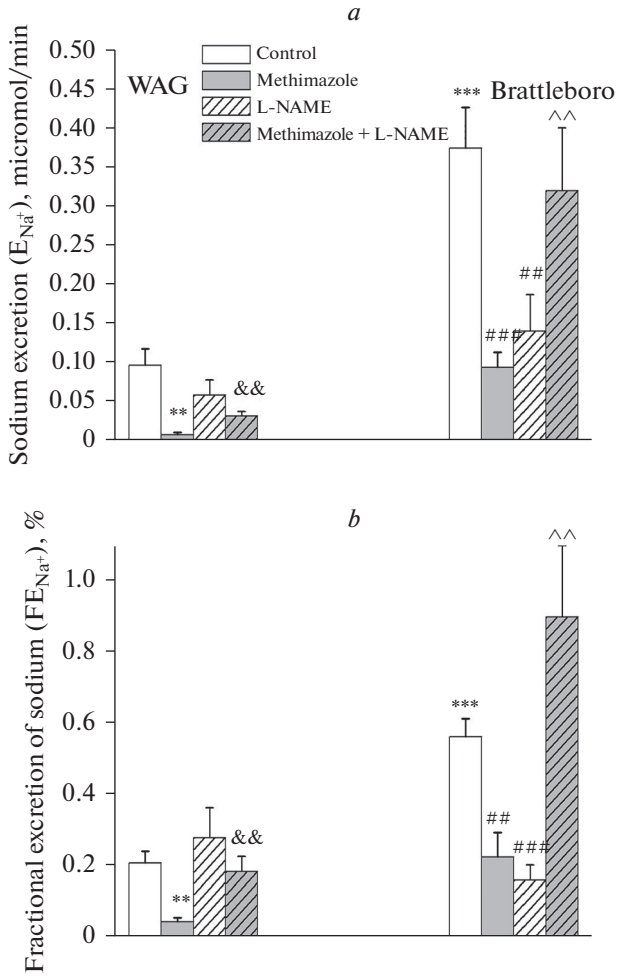


Рис. 6. Параметры натрийуретической функции в условиях подавления активности тиреоидной системы на фоне блокады синтеза NO введением L-NAME у крыс линий WAG и Brattleboro ($M \pm SEM$). *a* – скорость экскреции натрия (E_{Na}); *b* — экскретируемая фракция натрия (FE_{Na}).

Достоверность различий: $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$ — сравнение с контрольными показателями крыс WAG; $^{\#\#}p < 0.01$; $^{\#\#\#}p < 0.001$ — сравнение с контрольными показателями крыс линии Brattleboro; $^{\&\&}p < 0.01$ — сравнение с гипотиреоидной группой WAG; $^{\wedge\wedge}p < 0.01$ — сравнение с гипотиреоидной группой крыс линии Brattleboro.

Na-H-обменника, Na/K-насоса, так и влияя на их экспрессию при связывании с промоторами соответствующих генов [34, 35]. Подавление синтеза тиреоидных гормонов вне зависимости от уровня эндогенного ВП способствовало развитию антинатрийуретической реакции (рис. 6). У крыс WAG и у крыс Brattleboro было выявлено снижение скорости экскреции и экскретируемой фракции натрия, что, очевидно, является следствием усиления реабсорбции катиона. Антинатрийуретическая реакция у крыс Brattleboro, по-видимому, способствовала увеличению реабсорбции воды (рис. 4) вследствие прироста кортико-медуллярного градиента на-

трия и активации функции противоточно-множительной системы. Выявленное увеличение реабсорбции натрия в условиях гипотиреоза подтверждается данными на тиреоидэктомированных животных, у которых по прошествии 45 дней эксперимента было зафиксировано снижение экскреции натрия [36]. Кроме того, ранее было показано, что антинатрийуретическая реакция явилась следствием увеличения уровня экспрессии NKCC2-котранспортера и эпителиального натриевого канала ENaC у крыс в условиях хронической блокады синтеза тиреоидных гормонов [37, 38]. Как известно, при снижении уровня синтеза тиреоидных гормонов усиливается секреция тиреотропного гормона (ТТГ), который, связываясь с G_s-рецепторами щитовидной железы, активирует по аденилатциклазному пути высвобождение T_3 и T_4 [39]. Почечная ткань в том числе является мишенью действия ТТГ, поскольку известно, что в ней экспрессируются рецепторы к гормону (TSHR): в сосудах, включая артериолы клубочка, а также в клетках почечных канальцев [40, 41]. По всей видимости, выявленная у крыс обеих линий антинатрийуретическая реакция в условиях гипотиреоза объясняется активирующим влиянием ТТГ на транспорт натрия в собирательных трубках и в дистальных частях нефрона в результате активации аденилатциклазного пути при связывании с TSHR, что аналогично стимулирующему эффекту на реабсорбцию натрия в условиях действия cAMP-зависимого сигнального пути при связывании с V_2-рецепторами ВП [42]. В то же время блокада синтеза NO на фоне потребления метимазола приводит как у крыс WAG, так и у крыс Brattleboro к принципиально иной реакции – к натрийурезу, указывая на значимость NO в стимуляции реабсорбции натрия при гипотиреозе (рис. 6). Учитывая данные об увеличенной активности NO-системы в почечной ткани в условиях подавления синтеза тиреоидных гормонов [17], можно заключить, что антинатрийуретическая реакция у крыс WAG и Brattleboro в условиях гипотиреоза обусловлена в том числе активацией NO/cGMP/PKG-сигнального пути. Известно, что активация гуанилатциклазной системы приводит к усилению транспорта натрия через ENaC, как было выявлено на эпителиоцитах мочевого пузыря лягушки [12], что является следствием взаимодействия аденилатциклазной и гуанилатциклазной систем.

Таким образом, NO модулирует гидроосмотический эффект ВП, влияя на параметры гидруреза вне зависимости от уровня синтеза тиреоидных гормонов. В то же время NO играет одну из ключевых ролей в развитии антинатрийуреза у крыс в условиях хронической блокады синтеза тиреоидных гормонов, причем данный эффект не зависит от уровня эндогенного ВП в крови. Предполагается, что усиление реабсорбции натрия у крыс линий WAG и Brattleboro в условиях гипотиреоза является следствием взаимодействия аденилатциклазной и гуанилатциклазной систем в условиях активации действия ТТГ и NO соответственно.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 20-04-00298 А), а также за счет средств бюджетного финансирования по государственному заданию № 0259-2021-0011.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы (Л.Н.И.), планирование эксперимента (Л.Н.И., П.Д.П.), сбор данных (П.Д.П.), обработка данных (П.Д.П.), написание манускрипта (Л.Н.И., П.Д.П.), редактирование манускрипта (Л.Н.И.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Seifter JL, Chang HY* (2017) Extracellular acid-Base balance and ion transport between body fluid compartments. Physiology (Bethesda) 32: 367–379. https://doi.org/10.1152/physiol.00007.2017
2. *Kumar J, Gordillo R, Kaskel FJ, Druschel CM, Woroniecki RP* (2009) Increased prevalence of renal and urinary tract anomalies in children with congenital hypothyroidism. J Pediatr 154: 263–266. https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2008.08.023
3. *den Hollander JG, Wulkan RW, Mantel MJ, Berghout A* (2005) Correlation between severity of thyroid dysfunction and renal function. Clinical Endocrinol 62: 423–427. https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2005.02236.x
4. *Iglesias P, Bajo MA, Selgas R, Díez JJ* (2009) Thyroid dysfunction and kidney disease. Eur J Endocrinol 160: 503–515. https://doi.org/10.1007/s11154-016-9395-7
5. *Mariani LH, Berns JS* (2012) The renal manifestations of thyroid disease. J Am Soc Nephrol 23(1): 22–26. https://doi.org/10.1681/ASN.2010070766
6. *Vargas F, Moreno JM, Rodríguez-Gómez I, Wangensteen R, Osuna A, Alvarez-Guerra M, García-Estañ J* (2006) Vascular and renal function in experimental thyroid disorders. Eur J Endocrinol 2: 197–212. https://doi.org/10.1530/eje.1.02093
7. *Skowsky WR, Kikuchi TA* (1978) The role of vasopressin in the impaired water excretion of myxedema. Am J Med 64(4): 613–621. https://doi.org/10.1016/0002-9343(78)90581-8
8. *Chen YC, Cadnapaphornchai MA, Yang J, Summer SN, Falk S, Li C, Wang W, Schrier RW* (2005) Nonosmotic release of vasopressin and renal aquaporins in impaired urinary dilution in hypothyroidism. Am J Physiol: Renal Physiol 289: 672–678. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00384.2004
9. *Wang W, Li C, Summer SN, Falk S, Schrier RW* (2007) Polyuria of thyrotoxicosis: downregulation of aquaporin water channels and increased solute excretion. Kidney Int 72: 1088–1094. https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002475
10. *Syme HM* (2007) Cardiovascular and renal manifestations of hyperthyroidism. Vet Clin North Am Small Anim Pract 4: 723–743. https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2007.05.011
11. *Oliveira CJ, Schindler F, Ventura AM, Morais MS, Arai RJ, Debbas V, Stern A, Monteiro HP* (2003) Nitric oxide and cGMP activate the Ras-MAP kinase pathway-stimulating protein tyrosine phosphorylation in rabbit aortic endothelial cells. Free Radic Biol Med 35: 381–396. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(03)00311-3
12. *Yamada T, Matsuda K, Uchiyama M* (2006) Atrial natriuretic peptide and cGMP activate sodium transport through PKA-dependent pathway in the urinary bladder of the Japanese tree frog. J Compar Physiol [B] 176: 203–212. https://doi.org/10.1007/s00360-005-0041-z
13. *Bouley R, Pastor-Soler N, Cohen O, McLaughlin M, Breton S, Brown D* (2005) Stimulation of AQP2 membrane insertion in renal epithelial cells in vitro and in vivo by the cGMP phosphodiesterase inhibitor sildenafil citrate (Viagra). Am J Physiol Renal Physiol 288: 1103–1112. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00337.2004
14. *Sanches TR, Volpini RA, Massola Shimizu MH, Braganca AC, Oshiro-Monreal F, Seguro AC,Andrade L* (2012) Sildenafil reduces polyuria in rats with lithium-induced NDI. Am J Physiol Renal Physiol 302: 216–225. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00439.2010
15. *Rong S, Gao Y, Yang Y, Shao H, Okekunle AP, Lv C, Du Y, Sun H, Jiang Y, Darko GM, Sun D* (2018) Nitric oxide is involved in the hypothyroidism with significant morphology changes in female Wistar rats induced by chronic exposure to high water iodine from potassium iodate. Chemosphere 206: 320–329. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.015
16. *Zhou J, Cheng G, Pang H, Liu Q, Liu Y* (2018) The effect of 131I-induced hypothyroidism on the levels of nitric oxide (NO), interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF-α), total nitric oxide synthase (NOS) activity, and expression of NOS isoforms in rats. Bosn J Basic Med Sci 18(4): 305–312. https://doi.org/10.17305/bjbms.2018.2350
17. *Sarati LI, Toblli JE, Martinez CR, Uceda A, Feldman M, Balaszczuk AM, Fellet AL* (2013) Nitric oxide and aqp2 in hypothyroid rats: A link between aging and water homeostasis. Metabolism 62: 1287–1295. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.04.013

18. *Valtin H, Schroeder HA* (1997) Familial hypothalamic diabetes insipidus in rats (Brattleboro rata).1964 [classical article]. J Am Soc Nephrol 8: 1333–1341.
https://doi.org/10.1681/ASN.V881333
19. *Schmitt R, Klussmann E, Kahl T, Ellison DH, Bachmann S* (2003) Renal expression of sodium transporters and aquaporin-2 in hypothyroid rats. Am J Physiol Renal Physiol 284: 1097–1104.
https://doi.org/10.1152/ajprenal.00368.2002
20. *Tain YL, Huang LT, Lee CT, Chan JY, Hsu CN* (2015) Maternal citrulline supplementation prevents prenatal NG-nitro-l-arginine-methyl ester (l-NAME)-induced programmed hypertension in rats. Biol Reprod 92: 1–7.
https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.121384
21. *Bullier-Picard F, Wolf BA, Hugues JN, Durand D, Voirol MJ, Charrier J, Czernichow P, Postel-Vinay MC* (1985) The Brattleboro rat: normal growth hormone secretion, decreased hepatic growth hormone receptors and low plasma somatomedin activity. Mol Cell Endocrinol 45(1): 49–56.
https://doi.org/10.1016/0303-7207(86)90081-X
22. *Egan G, Silk T, Zamarripa F, Williams J, Federico P, Cunnington R, Carabott L, Blair-West J, Shade R, McKinley M, Farrell M, Lancaster J, Jackson G, Fox P, Denton D* (2003) Neural correlates of the emergence of consciousness of thirst. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 15241–15246.
https://doi.org/10.1073/pnas.2136650100
23. *Fadlalla MB, Wei Q, Fedail JS, Mehfooz A, Mao D, Shi F* (2017) Effects of hyper- and hypothyroidism on the development and proliferation of testicular cells in prepubertal rats. Anim Sci J 88: 1943–1954.
https://doi.org/10.1111/asj.12883
24. *Yeum CH, Kim SW, Kim NH, Choi KC, Lee J* (2002) Increased expression of aquaporin water channels in hypothyroid rat kidney. Pharmacol Res 46: 85–88.
https://doi.org/10.1016/S1043-6618(02)00036-1
25. *Iwasaki Y, Oiso Y, Yamauchi K, Takatsuki K, Kondo K, Hasegawa H, Tomita A* (1990) Osmoregulation of plasma vasopressin in myxedema. J Clin Endocrinol Metab 70(2): 534–539.
https://doi.org/10.1210/jcem-70-2-534
26. *Martin PY, Bianchi M, Roger F, Niksic L, Feraille E* (2002) Arginine vasopressin modulates expression of neuronal NOS in rat renal medulla. Am J Physiol Renal Physiol 283: 559–568.
https://doi.org/10.1152/ajprenal.00309.2001
27. *Hyndman KA, Mironova EV, Giani JF, Dugas C, Collins J, McDonough AA, Stockand JD, Pollock JS* (2017) Collecting Duct Nitric Oxide Synthase 1-beta Activation Maintains Sodium Homeostasis During High Sodium Intake Through Suppression of Aldosterone and Renal Angiotensin II Pathways. J Am Heart Assoc 6(10): e006896.
https://doi.org/10.1161/JAHA.117.006896
28. *Правикова ПД, Иванова ЛН* (2018) Влияние блокады синтеза оксида азота на диуретическую и натрийуретическую функции почки у крыс с различным уровнем эндогенного вазопрессина в крови. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 104(1): 97–103. [*Pravikova PD, Ivanova LN* (2018) Effect of nitric oxide (II) synthesis inhibition on the diurethic and natriuretic kidney functions in rats with various blood vasopressin levels. Russ J Physiol 104(1): 96–102 2018. (In Russ)].
29. *Böger RH, Bode-Böger SM, Gerecke U, Frölich JC* (1994) Long-term administration of L-arginine, L-NAME, and the exogenous NO donor molsidomine modulates urinary nitrate and cGMP excretion in rats. Cardiovasc Res 28(4): 494–499.
https://doi.org/10.1093/cvr/28.4.494
30. *Boone M, Kortenoeven M, Robben JH, Deen PM* (2010) Effect of the cgmp pathway on aqp2 expression and translocation: Potential implications for nephrogenic diabetes insipidus. Nephrol Dial Transpl 25: 48–54.
https://doi.org/10.1093/ndt/gfp409
31. *Ortiz PA, Garvin JL* (2002) Role of nitric oxide in the regulation of nephron transport. Am J Physiol Renal Physiol. 282: 777–784.
https://doi.org/10.1152/ajprenal.00334.2001
32. *Stoos BA, Garcia NH, Garvin JL* (1995) Nitric oxide inhibits sodium reabsorption in the isolated perfused cortical collecting duct. J Am Soc Nephrol 6: 89–94.
https://doi.org/10.1681/ASN.V6189
33. *Nakano D, Pollock JS, Pollock DM* (2008) Renal medullary ETB receptors produce diuresis and natriuresis via NOS1. Am J Physiol Renal Physiol 294: 1205–1211.
https://doi.org/10.1152/ajprenal.00578.2007
34. *Li X, Misik AJ, Rieder CV, Solaro RJ, Lowen A, Fliegel L* (2002) Thyroid hormone receptor alpha 1 regulates expression of the Na^+/H^+ exchanger (NHE1). J Biol Chem 277: 28656–28662.
https://doi.org/10.1074/jbc.M203221200
35. *Basu G, Mohapatra A* (2012) Interactions between thyroid disorders and kidney disease. Indian J Endocrinol Metab 16(2): 204–213.
https://doi.org/10.4103/2230-8210.93737

36. *Compare JA, Aguirre JA, Ibarra FR, Barontini M, Armando I* (2001) Effects of thyroid hormone on the renal dopaminergic system. Endocrine 15: 297–303.
https://doi.org/10.1385/ENDO:15:3:297
37. *Schmitt R, Kahl T, Mutig K* (2004) Bachmann S. Selectively reduced expression of thick ascending limb TammHorsfall protein in hypothyroid kidneys. Histochem Cell Biol 121(4): 319–327.
https://doi.org/10.1007/s00418-004-0638-4
38. *Moreno JM, Perez-Abud R Wangensteen, Rodrıguez Gomez I, Opez Merino IL, Osuna A* (2012) Function and expression of renal epithelial sodium transporters in rats with thyroid dysfunction. J Endocrinol Invest 35: 735–741.
https://doi.org/10.3275/8064
39. *Allen MD, Neumann S, Gershengorn MC* (2011) Occupancy of both sites on the thyrotropin (TSH) receptor dimer is necessary for phosphoinositide signaling. FASEB J 25: 3687–3694.
https://doi.org/10.1096/fj.11-188961
40. *Beau I, Misrahi M, Gross B, Vannier B, Loosfelt H, Hai MT, Pichon C, Milgrom E* (1997) Basolateral localization and transcytosis of gonadotropin and thyrotropin receptors expressed in Madin-Darby canine kidney cells. J Biol Chem 272: 5241–5248.
https://doi.org/10.1074/jbc.272.8.5241
41. *Sellitti DF, Akamizu T, Doi SQ, Kim GH, Kariyil JT, Kopchik JJ, Koshiyama H* (2000) Renal expression of two 'thyroid-specifific' genes: thyrotropin receptor and thyroglobulin. Exp Nephrol 8: 235–243.
https://doi.org/10.1159/000020674
42. *Boulkroun S, Ruffieux-Daidié D, Vitagliano JJ, Poirot O, Charles RP, Lagnaz D, Firsov D, Kellenberger S, Staub O* (2008) Vasopressin-inducible ubiquitinspecific protease 10 increases ENaC cell surface expression by deubiquitylating and stabilizing sorting nexin 3. Am J Physiol Renal Physiol 295: F889–F900.
https://doi.org/10.1152/ajprenal.00001.2008

Effect of NO Synthesis Blockade under Hypothyroidism on the Osmoregulating Renal Function in Rats with Different Blood Vasopressin Level

P. D. Pravikova[a], * and L. N. Ivanova[a]

[a] *Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

**e-mail: PollyPravi@yandex.ru*

We studied the effect of NO synthesis blockade on the osmoregulating renal function in pharmacologically hypothyroid by methimazole solution WAG and vasopressin-deficient Brattleboro rats. We show that NO modulates the hydroosmotic effect of vasopressin by influencing the parameters of hydruretic function regardless of blood thyroid hormones level. In the same time, it was found that NO plays a key role in the development of antinatriuretic response under conditions of thyroid hormone synthesis blockade, and this effect is independent on the blood AVP level. Pharmacological hypothyroidism in WAG and vasopressin-deficient Brattleboro rats promotes the development of antinatriuretic response, while elimination of the NO action upon thyroid hormone synthesis blockade leads to the development of natriuresis. The results of the study indicate a significant role of NO in the suppression of sodium excretion in hypothyroidism. The possible mechanisms underlying the effect of NO on the parameters of natriuretic renal function in WAG and Brattleboro rats under conditions of thyroid hormone synthesis blockade were discussed.

Keywords: thyroid system, NO, vasopressin, WAG, Brattleboro, osmoregulation process

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2021, том 107, № 12, с. 1518–1529

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ПОВЫШЕНИЕ СИСТЕМНОГО УРОВНЯ ЭНДОТОКСИНА ОСЛАБЛЯЕТ БАРОРЕФЛЕКС И КАРДИОВАСКУЛЯРНЫЕ ЭФФЕКТЫ ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИИ ИНФРАЛИМБИЧЕСКОЙ КОРЫ АНЕСТЕЗИРОВАННОЙ КРЫСЫ

© 2021 г.
Т. С. Туманова[1, 2], Т. Н. Кокурина[1], Г. И. Рыбакова[1], В. Г. Александров[1, *]

[1]*Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Москва, Россия*
[2]*Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург, Россия*
**E-mail: aleksandrovv@infran.ru*

Поступила в редакцию 04.08.2021 г.
После доработки 18.09.2021 г.
Принята к публикации 30.09.2021 г.

Известно, что повышение уровня эндотоксина (бактериального липополисахарида, ЛПС) приводит к гиперцитокинемии и развитию системной воспалительной реакции, которая сопровождается нарушениями кровообращения. Согласно современным представлениям, кровообращение контролируется цереброкардиальной осью, на высшем уровне которой располагается инфралимбическая кора (ИЛ). Важнейшим рефлекторным механизмом, регулирующим уровень артериального давления (АД), является барорефлекс. Целью настоящей работы стала проверка гипотезы о том, что нарушение нервного контроля является одним из факторов, способствующих расстройству кровообращения при эндотоксемии. В острых опытах на крысах Вистар регистрировали АД в бедренной артерии, тестировали барорефлекторную чувствительность путем внутривенного введения фенилэфрина, а также подвергали микроэлектростимуляции ИЛ. Введение ЛПС крысам экспериментальной группы (n = 10) вызывало первоначальное повышение и последующее снижение среднего АД; частота сердечных сокращений (ЧСС) постепенно повышалась. В контрольной группе (n = 11) АД и ЧСС оставались стабильнымы. Было установлено, что после введения ЛПС происходит ослабление БРЧ и снижение депрессорных ответов на стимуляцию ИЛ. Эти результаты свидетельствуют о возможном ослаблении кортикального и рефлекторного контроля кровообращения в условиях эндотоксемии. Они подтверждают выдвинутую гипотезу и позволяют предполагать, что изменение уровня провоспалительных цитокинов оказывает модулирующее влияние на состояние цереброкардиальной оси и рефлекторные механизмы регуляции кровообращения.

Ключевые слова: эндотоксемия, бактериальный липополисахарид, кровообращение, цереброкардиальная ось, инфралимбическая кора, барорефлекс, крыса

DOI: 10.31857/S0869813921120104

Эндотоксин (бактериальный липополисахарид ЛПС) представляет собой компонент внешней мембраны грамотрицательных бактерий, который обеспечивает поддержание ее целостности и взаимодействие с другими клетками [1, 2]. В частности, взаимодействие ЛПС с комплексом TLR4/MD-2, который экспрессируется на поверхности макрофагов, моноцитов, дендритных и эпителиальных клеток, запускает синтез провоспалительных цитокинов этими клетками [3]. Инициирова-

ние провоспалительных сигнальных каскадов направлено на уничтожение бактерий, однако при сепсисе, в условиях бактериемии, содержание эндотоксина в плазме крови возрастает многократно [4, 5]. Тяжелый сепсис, который традиционно рассматривается в качестве одного из вариантов системной воспалительной реакции, характеризуется эндотоксемией, устойчивой гипотензией, тахикардией и острыми нарушениями гемодинамики, которые приводят к гипоперфузии тканей и, в тяжелых случаях, к полиорганной недостаточности [4, 6]. Ключевую роль в патогенезе сепсиса играет перепрограммирование клеток эндотелия сосудов в сторону проапоптотического, провоспалительного, проадгезивного и прокоагулянтного фенотипов [7]. Одним из факторов, запускающих этот процесс, являются провоспалительные цитокины, которые выделяются активированными миелоидными клетками [8]. Результатом является снижение сосудистого тонуса и увеличение проницаемости сосудистой стенки, которые и приводят к нарушению микроциркуляции в органах, снижению объема циркулирующей крови и гипотонии.

Вместе с тем, следует иметь в виду, что провоспалительные цитокины влияют на клетки глии и нейроны [9, 10], а повышение их системного уровня изменяет состояние центральной нервной системы, включая те ее отделы, которые участвуют в контроле автономных функций [11]. Согласно современным представлениям, нервный контроль кровообращения осуществляется так называемой цереброкардиальной осью, которая образована центральной автономной сетью, автономной нервной системой и органами системы кровообращения [12]. Центральная автономная сеть представляет собой сложную систему, в состав которой входят структуры, расположенные на разных уровнях нервной оси, от коры больших полушарий (инфралимбическая, поясная, островковая) до продолговатого мозга, и охваченные многочисленными прямыми и опосредованными связями [13, 14]. Именно центральная автономная сеть контролирует и координирует преганглионарные, нейросекреторные и респираторные выходы. Структуры нижнего уровня центральной автономной сети, а именно ядра блуждающего нерва (ядро солитарного тракта и дорсальное моторное ядро), а также группы пресимпатических нейронов вентролатеральной области продолговатого мозга, образуют дугу артериального барорефлекса, который является важнейшим механизмом быстрого [15], а, возможно, и долговременного [16] контроля артериального давления.

На высшем уровне цереброкардиальной оси размещают полифункциональную инфралимбическую кору (ИЛ), которая по совокупности признаков рассматривается как висцеральная сенсорно-моторная область [17]. Циркуляторные эффекты стимуляции ИЛ воспроизводились разными исследователями неоднократно, причем было установлено, что они реализуются при участии других структур, входящих в центральную автономную сеть. Поэтому можно полагать, что при экспериментальных воздействиях, затрагивающих не только ИЛ, но и центральную автономную сеть и цереброкардиальную ось в целом, ответы на стимуляцию ИЛ будут изменяться.

Целью настоящего исследования стала проверка предположения о том, что одной из причин развития расстройств кровообращения при системной воспалительной реакции является нарушение центральных механизмов регуляции кровообращения, вызванное повышением системного уровня эндотоксина. С этой целью было изучено влияние внутривенного введения бактериального ЛПС на циркуляторные эффекты стимуляции ИЛ и барорефлекторную чувствительность анестезированной крысы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на крысах линии Вистар из центра коллективного пользования “Биоколлекция” Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (самцы, массой тела 250–300 г, $n = 21$). Все процедуры, выполненные в исследовании, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Биоэтического комитета Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Животных подвергали общей анестезии (уретан, 1.6 г/кг, в/б); глубину анестезии контролировали, ориентируясь по реакции на болевой стимул (ущемление хвоста) и выраженности роговичного рефлекса. Температуру тела измеряли и поддерживали на уровне 36.5–37.5°C при помощи гомеотермического контроллера (ML295/R, ADInstruments, Австралия). Хирургическая подготовка к эксперименту предусматривала, прежде всего, трахеостомию для обеспечения свободного дыхания, а также катетеризацию правой бедренной артерии и вены. Затем крыс помещали в стереотаксический аппарат (SR-6R-HT, Narishige, Япония), в прональной позиции. Голову фиксировали в горизонтальном положении и проводили локальную краниотомию по средней линии над точкой введения раздражающего электрода.

Артериальный катетер, заполненный гепаринизированным физиологическим раствором (50 Ед/мл), присоединяли к датчику артериального давления (MLT1199), камера которого была заполнена тем же раствором. Датчик подключали ко входу мостового усилителя (FE224), сигнал с выхода усилителя подавали на вход устройства сбора данных PowerLab 8/35. На протяжении всего эксперимента непрерывно регистрировали артериальное давление (АД); среднее АД (АДср) и частоту сердечных сокращений (ЧСС) рассчитывали в режиме онлайн при помощи программного пакета LabChart 7.0. При дальнейших расчетах величину АДср и ЧСС измеряли каждые 10 мин непосредственно перед экспериментальным воздействием и выражали в процентах к ее величине на 60-й минуте эксперимента.

Венозный катетер был соединен со шприцем объемом 5 мл, который заполняли физиологическим раствором, содержавшим 0.05% фенилэфрина гидрохлорида (Merk, Германия), и устанавливали в шприцевый насос (AL-300, WPI, США). Для тестирования барорефлекторной чувствительности 135 мкл раствора фенилэфрина вводили в бедренную вену со скоростью 45 мкл/с. Фенилэфрин является избирательным альфа-адреномиметиком, который вызывает сокращение гладких мышц кровеносных сосудов, увеличение периферического сопротивления и подъем АД, что в свою очередь приводит к рефлекторному снижению ЧСС. Изменение барорефлекторной чувствительности оценивали по изменению наклона прямой линии, аппроксимирующей зависимость между увеличением АДср и соответствующим уменьшением ЧСС. Для определения величины наклона на записях, отражающих увеличение АДср, вызванное введением фенилэфрина, и, соответственно, снижение ЧСС, выделяли временной интервал 2.0–2.5 с, в котором оба параметра изменялись линейно. В этом интервале определяли величину прироста АДср (ΔАДср) и соответствующего падения ЧСС (ΔЧСС). Наклон рассчитывали, как отношение ΔЧСС (уд./мин)/ΔМАР (мм рт. ст.) = наклон ((уд./мин)/мм рт. ст.).

Для стимуляции ИЛ металлический электрод (TM33B01, WPI, США) погружали через трепанационное отверстие на глубину 4 мм от поверхности мозга, в точку с координатами +2.5 мм относительно уровня bregma и 0.5 мм левее сагиттальной плоскости. Индифферентный электрод вводили в мышцы шеи. Серии монополярных отрицательных прямоугольных импульсов тока (150–200 мкА, длительность 1 мс, частота 50 имп/с, продолжительность серий 20 с), подавали, используя изолированный стимулятор (модель 4100, A-M Systems, США).

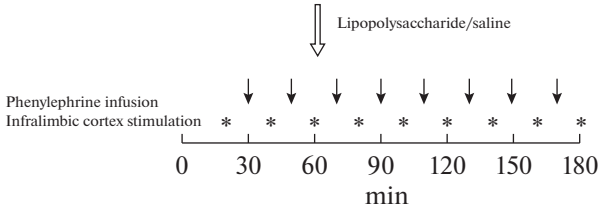


Рис. 1. Экспериментальный протокол.
На оси – время от начала регистрации. Светлая стрелка – момент введения растворов, темные стрелки – инфузии фенидэфрина, звездочки – электрическая стимуляция ИЛ.

Длительность эксперимента составляла 3 ч. В течение этого времени у животного непрерывно регистрировали температуру тела и АД. В режиме реального времени рассчитывали АДср и ЧСС. Через 20 мин после начала регистрации производили первую стимуляцию ИЛ, через 30 мин – первое введение фенилэфрина. В дальнейшем эти экспериментальные воздействия повторяли с интервалом 20 мин (рис. 1). На 60-й минуте животным экспериментальной группы (n = 10) вводили внутривенно 1 мл раствора ЛПС (L 2630, Sigma-Aldrich, 40 мг/кг); животным контрольной группы (n = 11) вводили 1 мл физиологического раствора.

После окончания эксперимента животное умерщвляли передозировкой анестетика, мозг извлекали, фиксировали в формалине и проводили гистологический контроль места введения раздражающего электрода.

Изменения учитываемых параметров оценивали, рассчитывая их среднюю величину и среднюю квадратичную ошибку. Влияние ЛПС оценивали, сравнивая значения учитываемых показателей после введения вещества с их значениями до введения (фон), а также с соответствующими значениями, полученными в экспериментах с введением физиологического раствора (контроль). Достоверность изменений определяли, используя метод однофакторного дисперсионного анализа и U-критерий Манна–Уитни. Критический уровень значимости при проверке нулевой гипотезы принимался равным 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Средняя величина АДср до введения растворов не отличалась в контрольной и экспериментальной группах и не претерпевала статистически значимых колебаний внутри групп. Непосредственно перед введением растворов она составляла 96 ± 5 мм рт. ст. в контрольной и 94 ± 6 мм рт. ст. в экспериментальной группе, различия между этими величинами оказались статистически недостоверными (p = 0.88). В контрольной группе не было зафиксировано статистически значимых изменений АДср после введения физиологического раствора (p = 0.99). Введение ЛПС приводило к увеличению АДср, которое достигало максимальной величины через 30–40 мин после введения, достоверно отличаясь как от фоновых, так и от контрольных значений (рис. 2*а*). Затем этот эффект постепенно ослабевал, АД начинало падать. Через 90 мин после введения ЛПС величина АДср была достоверно ниже исходных и контрольных значений и продолжала уменьшаться до конца эксперимента. Фоновые значения ЧСС в контрольной и экспериментальной группах не проявили достоверных различий.

Непосредственно перед введением физиологического раствора средняя величина ЧСС составляла 391 ± 15 уд./мин, а перед введением ЛПС 365 ± 32 уд./мин, эти различия оказались недостоверными (p = 0.097). Рост ЧСС имел место как в кон-

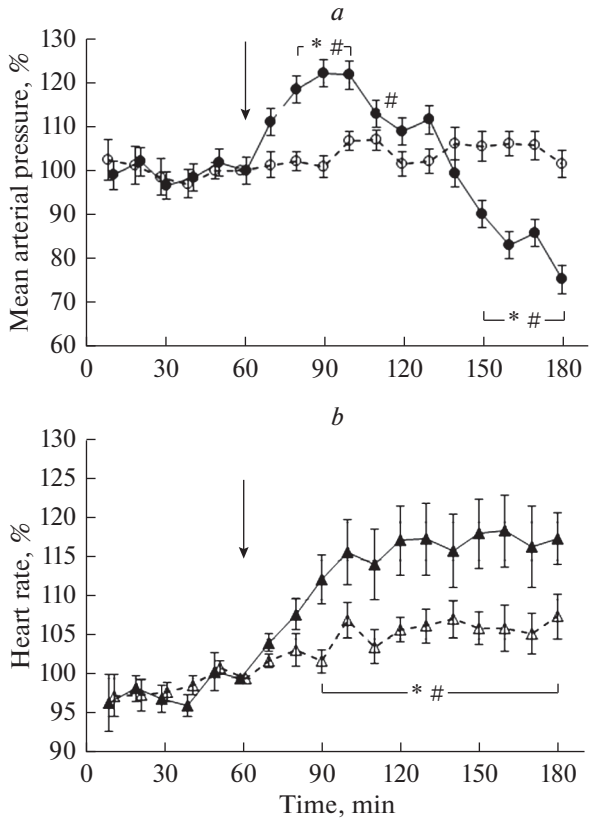


Рис. 2. Динамика АДср (*a*) и ЧСС (*b*) в экспериментах с введением ЛПС (темные маркеры) и физиологического раствора (светлые маркеры).
АДср и ЧСС выражен в процентах к их величине на 60-й минуте эксперимента. * – значение параметра в экспериментальной группе достоверно отличается от значения в контрольной группе; # – значение параметра в экспериментальной группе достоверно отличается от фоновых значений. Стрелки указывают момент введения растворов.

трольной, так и в экспериментальной группе, однако в экспериментальной группе он происходил быстрее, чем в контрольной (рис. 2*b*). В контрольной группе ЧСС росла до 100-й минуты регистрации, а затем стабилизировалась. Через 30 мин после введения ЛПС этот параметр был больше соответствующей величины в контрольной группе ($p = 0.013$) и в дальнейшем оставался на достигнутом уровне, не обнаруживая тенденции к снижению. Относительные величины ЧСС, зарегистрированные в экспериментальной серии в каждый момент времени после введения ЛПС, оказались достоверно выше фоновых и соответствующих контрольных величин (рис. 2*b*). Таким образом, ЛПС вызывал снижение АДср и повышение ЧСС анестезированных крыс. Оба эти эффекта сохранялись до конца эксперимента.

При тестировании барорефлекторной чувствительности введение фенилэфрина вызывало повышение АД и рефлекторное снижение ЧСС (рис. 3*a*). При введении фенилэфрина на 50-й минуте АДср увеличивалось на 40 ± 2 мм рт. ст. в контрольной группе и на 45 ± 3 мм рт. ст. в группе с введением ЛПС. В ответ на повышение АД происходило снижение ЧСС соответственно на 79 ± 15 уд./мин и 85 ± 15 уд./мин.

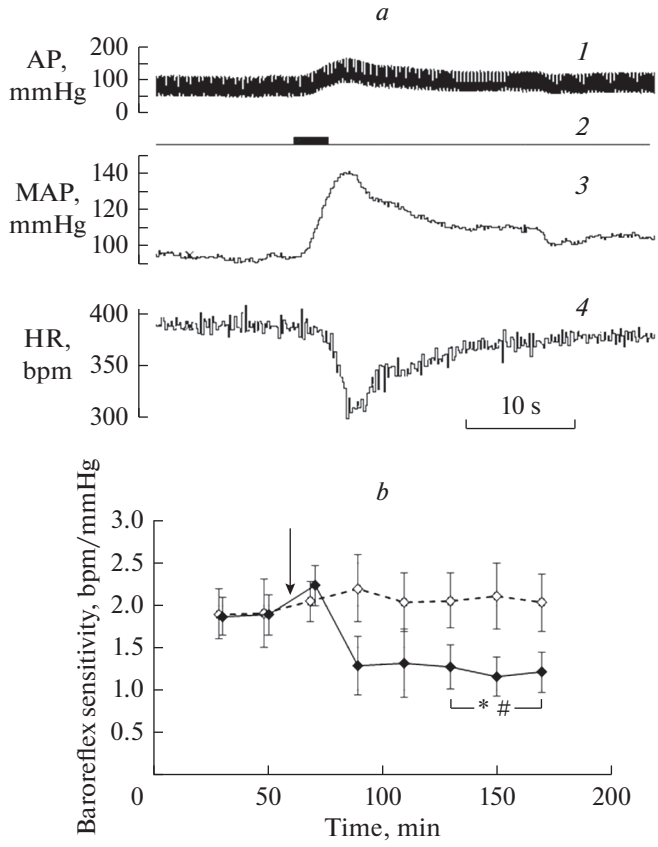


Рис. 3. Эффект введения фенилэфрина (*a*) и изменение барорефлекторной чувствительности под влиянием ЛПС (*b*).

1 – запись АД, *2* – отметка введения фенилэфрина, *3* – изменение АДср, *4* – изменение ЧСС. * – значение параметра в экспериментальной группе достоверно (при $p < 0.05$) отличается от значения в контрольной группе; # – значение параметра в экспериментальной группе достоверно (при $p < 0.01$) отличается от фоновых значений. Стрелкой отмечен момент введения растворов.

Тестирование барорефлекторной чувствительности на 50-й минуте эксперимента показало, что значения показателя, характеризующего величину барорефлекторной чувствительности, рассчитанные по описанной выше методике, составляли в контрольной группе 1.90 ± 0.40 (уд./мин)/мм рт. ст., а в экспериментальной 1.89 ± ± 0.23 (уд./мин)/мм рт. ст., то есть практически совпадали (рис. 3*b*). В контрольных экспериментах не наблюдалось достоверных изменений барорефлекторной чувствительности. Вместе с тем, барорефлекторная чувствительность достоверно снижалась через 30 мин после введения ЛПС и оставалась ниже фоновых и контрольных значений до конца эксперимента. Эти результаты позволяют утверждать, что повышение системного уровня ЛПС у анестезированных крыс приводит к ослаблению барорефлекторной чувствительности.

Микроэлектростимуляция ИЛ вызывала реакцию системы кровообращения в виде снижения АД и некоторого уменьшения ЧСС (рис. 4*a*). Величина депрессорного ответа на 60-й минуте эксперимента составляла в контрольной группе в сред-

нем 23.8 ± 2.8 мм рт. ст., а в экспериментальной группе 21.0 ± 1.0 мм рт. ст. ($p = 0.98$). Введение физиологического раствора не оказывало влияния на величину депрессорного компонента (рис. 4*b*). Через 40 мин после введения ЛПС ответ достоверно уменьшался по сравнению с фоновыми и контрольными величинами, и этот эффект сохранялся до конца эксперимента.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исходные величины АДср и ЧСС анестезированных крыс в контрольной и экспериментальной группах не отличались между собой и были близки к значениям, которые обычно регистрируются в сходных экспериментальных условиях, при использовании того же анестетика [18–20]. Величина АДср в контрольной группе была стабильной на протяжении всего эксперимента; ЧСС росла в течение первых 100 мин регистрации, а затем также стабилизировалась. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что состояние системы кровообращения в наших экспериментальных условиях было стабильным; это дало возможность адекватно оценивать эффекты экспериментальных воздействий и сравнивать полученные результаты с результатами других авторов.

Системное введение ЛПС широко используется в качестве методического приема, позволяющего моделировать эффекты эндотоксинемии в условиях острых и хронических экспериментов [21–25]. В наших экспериментах введение ЛПС приводило к первоначальному повышению и последующему снижению АДср, а также к повышению ЧСС. В контрольной группе эти показатели оставались стабильными на протяжении всего времени регистрации.

Повышение АД непосредственно после введения ЛПС в наших экспериментах могло быть следствием проявления некоторых центральных эффектов нарастающего уровня провоспалительных цитокинов, которые обычно маскируются их периферическими эффектами. Так, установлено, что интерлейкин-6, поступая в центральную нервную систему, активировал группу аргинин-вазопрессиновых нейросекреторных клеток внутри супраоптического ядра гипоталамуса [23]. В свою очередь, аргинин-вазопрессин вызывал сокращение гладкомышечных клеток периферических сосудов, повышение периферического сопротивления. В результате в течение 30-ти–40-а мин АДср поднималось на 10–15 мм рт. ст., стабилизировалось на повышенном уровне, а затем снижалось, достигая через 150–180 мин значений близких к исходным. В наших экспериментах наблюдалась сходная временная динамика АДср после введения ЛПС, однако падение АДср после подъема было гораздо глубже, что, по-видимому, объясняется уже периферическими эффектами эндотоксемии.

Гипотензия и тахикардия являются обычной реакцией сердечно-сосудистой системы на эндотоксемию. Эти симптомы развиваются при эндогенном повышении системного уровня ЛПС, в том числе при сепсисе [6, 25]; они воспроизводятся в экспериментах на подвижных [26] и анестезированных [27] животных. Повышение системного уровня ЛПС вызывает усиленное выделение провоспалительных цитокинов, в том числе фактора некроза опухолей и интерлейкина-1бета, а также NO клетками иммунной системы и эндотелием сосудов [28]. Повышенный уровень NO вызывает релаксацию гладкомышечных клеток сосудов, снижение периферического сопротивления и падение АД [29]. В свою очередь, снижение АД должно вызывать рефлекторный рост ЧСС. В наших экспериментах ЧСС возрастала после введения ЛПС, а затем стабилизировалась, несмотря на прогрессивное падение АДср (рис. 2). Этот факт можно рассматривать в качестве косвенного доказательства снижения барорефлекторной чувствительности в условиях эндотоксемии, вызванной введением ЛПС.

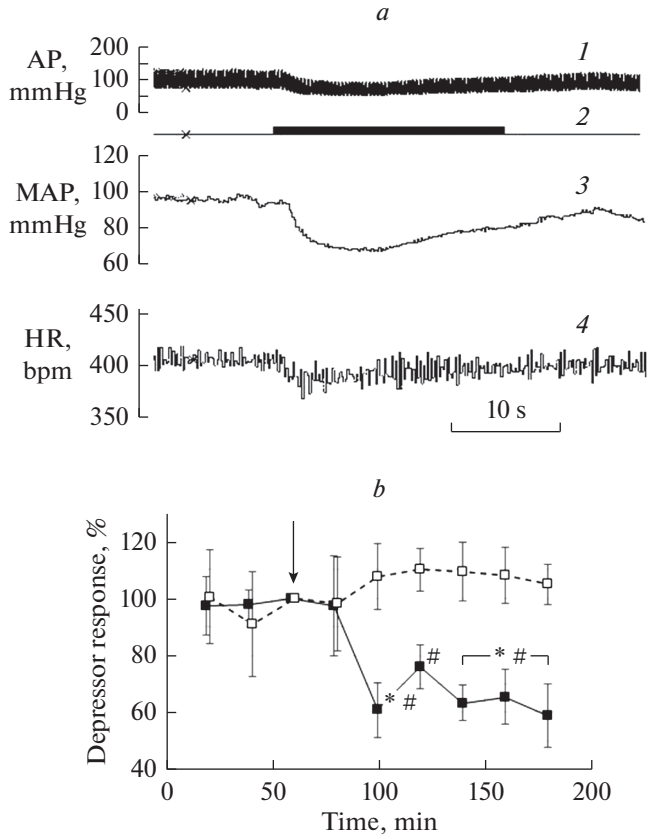


Рис. 4. Реакция системы кровообращения на стимуляцию ИЛ (*a*) и влияние ЛПС на эту реакцию (*b*). *1* – нативная запись АД; *2* – отметка раздражения; *3* – АДср; *4* – ЧСС. Величина депрессорных ответов выражена в процентах к их величине на 60-й минуте эксперимента.

Остальные обозначения как на рис. 3.

Результаты настоящего исследования прямо показывают, что под влиянием ЛПС происходит снижение барорефлекторной чувствительности. Такой эффект впервые получен в острых экспериментах на анестезированных животных, хотя ослабление рефлекторной брадикардии под влиянием ЛПС описано в одной из недавних работ, выполненных на бодрствующих крысах [30]. Известно, что в замыкании рефлекторных дуг, реализующих барорефлекс, участвуют нейроны ядра солитарного тракта (ЯСТ) и вентролатеральной области продолговатого мозга [31]. Некоторые из этих нейронов экспрессируют рецепторы к провоспалительным цитокинам, однако их основной мишенью являются клетки эндотелия сосудов и микроглии. В частности, под влиянием ИЛ-1бета, эти клетки начинают усиленно секретировать NO и простагландины (ПГ). В свою очередь ПГЕ2, действуя пресинаптически, облегчает глутаматергическую передачу в цепях нейронов внутри ЯСТ, но, одновременно действуя также пресинаптически, подавляет выделение глутамата из терминалей первичных афферентов, оканчивающихся в ЯСТ [32, 33]. Во всяком случае, можно считать доказанным, что повышение системного уровня ЛПС приводит к снижению барорефлекторной чувствительности и, следовательно, ухудшает состояние одного из важнейших механизмов нервного контроля функции кровообращения.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что повышение системного уровня ЛПС ослабляют депрессорный эффект стимуляции ИЛ. Эта область коры расположена на высшем уровне цереброкардиальной оси [23] и является одним из кортикальных узлов центральной автономной сети [13, 14]. С точки зрения функциональной специализации, ИЛ может рассматриваться в качестве висцеральной сенсорно-моторной коры, которая принимает участие в формировании моторных команд [32, 34]. Участие ИЛ в контроле кровообращения доказано предыдущими исследованиями и депрессорные реакции являются обычным эффектом локальной микростимуляции ИЛ анестезированных животных [35, 36]. При интерпретации результатов подобных исследований следует иметь в виду, что одним из основных свойств центральной автономной сети являются реципрокность и параллелизм связей [14]. Описаны, в частности, прямые и опосредованные проекции, нисходящие из ИЛ к многочисленным структурам, расположенным на разных уровнях нервной оси, включая бульбарный [35]. Установлено, кроме того, что эфферентные импульсы, возникающие в ИЛ, могут достигать бульбарного уровня по прямым моносинаптическим проекциям к ЯСТ [36], но показано, что депрессорные эффекты стимуляции ИЛ реализуются при участии латеральной гипоталамической области и центрального серого вещества [36]. Учитывая то, что эффекты стимуляция ИЛ реализуются при участии других структур, входящих в центральную автономную сеть, изменение этих эффектов в условиях эндотоксемии свидетельствует не столько о влиянии повышенного уровня провоспалительных цитокинов на саму ИЛ, сколько об изменении состояния цереброкардиальной оси в целом.

Таким образом, полученные результаты подтвердили гипотезу о том, что в условиях эндотоксемии происходит ослабление механизмов нервного контроля функции кровообращения, вероятно, вследствие повышения системного уровня провоспалительных цитокинов. Подобный эффект провоспалительных цитокинов был установлен ранее в аналогичных экспериментальных условиях для функции дыхания [37]. Что касается функции кровообращения, то вопрос о влиянии провоспалительных цитокинов на нервные механизмы регуляции этой функции требует дальнейшего экспериментального исследования.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Госпрограммы 47 ГП “Научно-технологическое развитие Российской Федерации” (2019–2030), тема 0134-2019-0001.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Т.С.Т., В.Г.А.), сбор данных (Т.С.Т., Т.Н.К., Г.И.Р), обработка данных (Т.С.Т., Т.Н.К., Г.И.Р.), написание и редактирование рукописи (Т.С.Т., В.Г.А.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bertani B, Ruiz N* (2018) Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides. EcoSal Plus 8(1). https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018
2. *Raetz CR, Whitfield C* (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. Ann Rev Biochem 71: 635–700. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414

3. *Skirecki T, Cavaillon JM* (2019) Inner sensors of endotoxin – implications for sepsis research and therapy. FEMS Microbiol Rev 43(3): 239–256.
https://doi.org/10.1093/femsre/fuz004
4. *Stubljar D, Skvarc M* (2015) Effective strategies for diagnosis of systemic inflammatory response syndrome (SIRS) due to bacterial infection in surgical patients. Infect Disorders Drug Targets 15(1): 53–56.
https://doi.org/10.2174/1871526515666150320161804
5. *Mohammad S, Thiemermann C* (2021) Role of Metabolic Endotoxemia in Systemic Inflammation and Potential Interventions. Front Immunol 11: 594150.
https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.594150
6. *Marik PE, Taeb AM* (2017) SIRS, qSOFA and new sepsis definition. J Thoracic Disease 9(4): 943–945.
https://doi.org/10.21037/jtd.2017.03.125
7. *Joffre J, Hellman J, Ince C, Ait-Oufella H* (2020) Endothelial Responses in Sepsis. Am J Respirat Crit Care Med 202(3): 361–370.
https://doi.org/10.1164/rccm.201910-1911TR
8. *Mera S, Tatulescu D, Cismaru C, Bondor C, Slavcovici A, Zanc V, Carstina D, Oltean M* (2011) Multiplex cytokine profiling in patients with sepsis. APMIS: Acta Pathol Microbiol Immunol Scandinav 119(2): 155–163.
https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2010.02705.x
9. *Kaur D, Sharma V, Deshmukh R* (2019) Activation of microglia and astrocytes: a roadway to neuroinflammation and Alzheimer's disease. Inflammopharmacology 27(4): 663–677.
https://doi.org/10.1007/s10787-019-00580-x
10. *Ferro A, Auguste Y, Cheadle L* (2021) Microglia, Cytokines, and Neural Activity: Unexpected Interactions in Brain Development and Function. Front Immunol 12: 703527.
https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.703527
11. *Felger JC* (2018) Imaging the Role of Inflammation in Mood and Anxiety-related Disorders. Current Neuropharmacol 16(5): 533–558.
https://doi.org/10.2174/1570159X15666171123201142
12. *Tahsili-Fahadan P, Geocadin RG* (2017) Heart-Brain Axis: Effects of Neurologic Injury on Cardiovascular Function. Circulat Res 120(3): 559–572.
https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308446
13. *Benarroch EE* (1993) The central autonomic network: functional organization, dysfunction, and perspective. Mayo Clin Proceed 68(10): 988–1001.
https://doi.org/10.1016/s0025-6196(12)62272-1
14. *Benarroch EE* (2019) Control of the cardiovascular and respiratory systems during sleep. Autonom Neurosci Basic Clin 218: 54–63.
https://doi.org/10.1016/j.autneu.2019.01.007
15. *Dampney RA* (2016) Central neural control of the cardiovascular system: current perspectives. Advanc Physiol Educat 40(3): 283–296.
https://doi.org/10.1152/advan.00027.2016
16. *Barrett CJ, Malpas SC* (2005) Problems, possibilities, and pitfalls in studying the arterial baroreflexes' influence over long-term control of blood pressure. Am J Physiol Regul Integrat Compar Physiol 288(4): R837–R845.
https://doi.org/10.1152/ajpregu.00456.2004
17. *Aleksandrov VG, Kokurina TN, Rybakova GI, Tumanova TS* (2021) Autonomic Functions of the Prefrontal Cortex. Human Physiol 47(5): 110–117.
https://doi.org/10.31857/S0131164621050027
18. *Maggi CA, Giuliani S, Santicioli P, Regoli D, Meli A* (1985) Comparison of the effects of substance P and substance K on blood pressure, salivation and urinary bladder motility in urethane-anaesthetized rats. Eur J Pharmacol 113(2): 291–294.
https://doi.org/10.1016/0014-2999(85)90750-2
19. *Revand R, Singh SK* (2021) Ipsilateral somatic nerves mediate histamine-induced vasosensory reflex responses involving perivascular afferents in rat models. Scient Rep 11(1): 14648.
https://doi.org/10.1038/s41598-021-94110-x
20. *Matsuo N, Matsuo S, Nakamura Y, Ezomo FO, Kawai Y* (2020) Regulatory effects of cervical sympathetic trunk and renal sympathetic nerve activities on cerebral blood flow during head-down postural rotations. Autonom Neurosci: Basic and Clin 229: 102738.
https://doi.org/10.1016/j.autneu.2020.102738
21. *Schläpfer M, Piegeler T, Dull RO, Schwartz DE, Mao M, Bonini MG, Z'Graggen BR, Beck-Schimmer B, Minshall RD* (2015) Propofol increases morbidity and mortality in a rat model of sepsis. Crit Care (London England) 19(1): 45.
https://doi.org/10.1186/s13054-015-0751-x
22. *Stahl O, Löffler B, Haier J, Mardin WA, Mees ST* (2013) Mimicry of human sepsis in a rat model–prospects and limitations. J Surgic Res 179(1): e167–e175.
https://doi.org/10.1016/j.jss.2012.01.042

23. *Palin K, Moreau ML, Sauvant J, Orcel H, Nadjar A, Duvoid-Guillou A, Dudit J, Rabié A, Moos F* (2009) Interleukin-6 activates arginine vasopressin neurons in the supraoptic nucleus during immune challenge in rats. Am J Physiol Endocrinol and Metabolism 296(6): E1289–E1299. https://doi.org/10.1152/ajpendo.90489.2008
24. *Aleksandrov VG, Gubarevich EA, Danilova GA, Tumanova TS* (2020) Simulation of the systemic inflammatory response syndrome in anesthetized rats. Integrat Physiol 1(1): 51–60. https://doi.org/10.33910/2687-1270-2020-1-1-51-60
25. *Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ* (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Confer Commit. Am Colleg Chest Physic/Soc Crit Care Med Chest 101(6): 1644–1655. https://doi.org/10.1378/chest.101.6.1644
26. *Passaglia P, de Lima Faim F, Batalhão ME, Stabile AM, Bendhack LM, Antunes-Rodrigues J, Lacchini R, Capellari Carnio E* (2021) Central Administration of Angiotensin-(1-7) Improves Vasopressin Impairment and Hypotensive Response in Experimental Endotoxemia. Cells 10(1): 105. https://doi.org/10.3390/cells10010105
27. *Sturgess DJ, Morrison S, Haluska B, Gobe GC, Jones MA, Volante S, Venkatesh B* (2021) Left Ventricular Impaired Relaxation and Interstitial Myocarditis Identified in Sepsis-Associated Cardiac Dysfunction: Use of a Rodent Model. Med Sci Monitor: Internat Med J Exp Clin Res 27 e929512.
28. *Andersson U, Tracey KJ* (2012) Neural reflexes in inflammation and immunity. J Exp Med 209(6): 1057–1068. https://doi.org/10.1084/jem.20120571
29. *Hallemeesch MM, Janssen BJ, de Jonge WJ, Soeters PB, Lamers WH, Deutz NE* (2003) NO production by cNOS and iNOS reflects blood pressure changes in LPS-challenged mice. Am J Physiol Endocrinol and Metabolism 285(4): E871–E875. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00004.2002
30. *Sallam MY, El-Gowilly SM, El-Mas MM* (2021) Androgenic modulation of arterial baroreceptor dysfunction and neuroinflammation in endotoxic male rats. Brain Res 1756: 147330. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2021.147330
31. *Wehrwein EA, Joyner MJ* (2013) Regulation of blood pressure by the arterial baroreflex and autonomic nervous system. Handb Clin Neurol 117: 89–102. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53491-0.00008-0
32. *Marty V, El Hachmane M, Amédée T* (2008) Dual modulation of synaptic transmission in the nucleus tractus solitarius by prostaglandin E2 synthesized downstream of IL-1beta. Eur J Neurosci 27(12): 3132–3150. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06296.x
33. *Amorim MR, de Deus JL, Cazuza RA, Mota C, da Silva L, Borges GS, Batalhão ME, Cárnio EC, Branco L* (2019) Neuroinflammation in the NTS is associated with changes in cardiovascular reflexes during systemic inflammation. J Neuroinflammat 16(1): 125. https://doi.org/10.1186/s12974-019-1512-6
34. *Cechetto DF* (2014) Cortical control of the autonomic nervous system. Exp Physiol 99(2): 326–331. https://doi.org/10.1113/expphysiol.2013.075192
35. *Fisk GD, Wyss JM* (2000) Descending projections of infralimbic cortex that mediate stimulation-evoked changes in arterial pressure. Brain Res 859(1): 83–95. https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)01935-1
36. *Owens NC, Verberne AJ* (2001) Regional haemodynamic responses to activation of the medial prefrontal cortex depressor region. Brain Res 919(2): 221–231. https://doi.org/10.1016/s0006-8993(01)03017-7
37. *Aleksandrov VG, Tumanova TS, Aleksandrova NP* (2018) Diclofenac eliminates respiratory effects of the tumor necrosis factor in rats. J Evol Biochem Physiol (54)4: 338–341.

Increase in the Systemic Level of Endotoxin Weakens Baroreflex and Cardiovascular Effects of Electrostimulation of the Infralimbic Cortex in Anesthetised Rat

T. S. Tumanova[a, b], T. H. Kokurina[a], G. I. Rybakova[a], and V. G. Aleksandrov[a, *]

[a] *Pavlov Institute of Physiology RAS, Saint-Petersburg, Russia*

[b] *The Herzen State Pedagogical University of Russia, Saint-Petersburg, Russia*

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

It is known that an increase in the level of endotoxin (bacterial lipopolysaccharide, LPS) leads to hypercytokinemia and the development of a systemic inflammatory reaction,

which is accompanied by circulatory disorders. According to modern concepts, the circulation is controlled by the brain-heart axis, at the highest level of which is the infralimbic cortex (IL). The most important reflex mechanism that regulates the level of arterial pressure (AP) is baroreflex. The aim of this study was to test the hypothesis that impaired nervous control is one of the factors contributing to circulatory disorders in endotoxemia. In acute experiments on Wistar rats, AP in the femoral artery was recorded, baroreflex sensitivity (BRS) was tested by intravenous administration of phenylephrine, and IL was subjected to microelectrostimulation. Administration of LPS to experimental animals ($n = 10$) caused an initial increase and subsequent decline in the mean AP, and an increase in heart rate (HR) compared to their values before administration and in the control group ($n = 11$). Otherwise it was found that after the administration of LPS, there was a weakening of the BRS and the suppression of depressor responses to IL stimulation. These results indicate a possible weakening of cortical and reflex control of circulation in the endotoxemia. They confirm the hypothesis put forward and suggest that changes in the level of proinflammatory cytokines have a modulating effect on the state of the brain-heart axis and reflex mechanisms of cardiovascular control.

Keywords: endotoxemia, bacterial lipopolysaccharide, circulation, brain-heart axis, infralimbic cortex, baroreflex, rat

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2021, том 107, № 12, с. 1530–1541

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

СОМАТОСТАТИН-СОДЕРЖАЩИЕ НЕЙРОНЫ ТУБЕРАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ ГИПОТАЛАМУСА КРЫС ПРИ СТАРЕНИИ

© 2021 г.
П. А. Вишнякова[1], К. Ю. Моисеев[1], В. В. Порсева[1], Л. Г. Панкрашева[1], А. Ф. Будник[2], А. Д. Ноздрачев[3], П. М. Маслюков[1, *]

[1]Ярославский государственный медицинский университет, Ярославль, Россия
[2]Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова, Нальчик, Россия
[3]Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия
**E-mail: mpm@ysmu.ru*

Поступила в редакцию 20.09.2021 г.
После доработки 30.09.2021 г.
Принята к публикации 01.10.2021 г.

Расположение и нейрохимический состав соматостатин (SOM)-содержащих нейронов в туберальной области гипоталамуса крысы исследовались при помощи иммуногистохимического метода у молодых (2–3 мес.), взрослых (1 год) и старых (2–2.5 года) крыс самцов и самок. SOM обнаруживался в наибольшем проценте в дугообразном (AN) и вентролатеральной части вентромедиального ядра (VMNvl). Меньшая часть SOM-содержащих нейронов наблюдалась в дорсомедиальном (DMN), медиальном туберальном (MTu), и оболочке VMN (shell). Лишь единичные нейроны обнаруживались в дорсомедиальной части вентромедиального ядра (VMNdm), перивентрикулярном и перифорникальном ядрах. Нами не было обнаружено возрастных изменений числа SOM-иммунореактивных (ИР) нейронов. При старении в AN увеличивался процент SOM-содержащих нейронов, колокализующих кальбиндин (CB), нейрональную синтазу оксида азота (nNOS), нейропептид Y (NPY). В VMNvl от трети до половины SOM-ИР нейронов у всех крыс колокализовали nNOS, а ИР к CB и NPY – от 7.9 до 18.6%. В DMN самцов наблюдалось достоверно большее число SOM-ИР нейронов, колокализующих NPY в сравнении с самками во всех возрастных группах. Таким образом, при старении наблюдаются нейрохимические изменения SOM-ергической системы туберальных ядер гипоталамуса, главным образом со стороны дугообразных ядер.

Ключевые слова: гипоталамус, соматостатин, туберальная область, старение

DOI: 10.31857/S0869813921120116

Соматостатин (SOM) является нейрогормоном и нейротрансмиттером и существует в двух биологически активных формах, содержащих 14 и 28 аминокислот [1]. SOM участвует в контроле различных физиологических процессов при воздействии на G-белок-сопряженные рецепторы пяти подтипов: sst1–sst5 [1, 2]. SOM подавляет выделение гормона роста, соматолиберина, гормонов желудочно-кишечного тракта, регулирует высвобождение в гипоталамусе кортиколиберина, норадреналина и самого SOM [1, 3].

В пределах гипоталамуса большинство SOM-содержащих нейронов расположено в переднем перивентрикулярном ядре. SOM также встречается, хотя и с меньшей плотностью, в супрахиазмальном, паравентрикулярном ядре, дугообразном

(AN) и вентромедиальном ядре гипоталамуса (VMN) [4–6]. SOM-иммунореактивные (ИР) нейроны гипоталамуса крысы и овцы коэкспрессируют рецепторы лептина [1]. Лептин и SOM играют противоположную роль в потреблении пищи, ожирении и расходе энергии [7]. SOM-ИР нейроны в преоптической области и AN тесно связаны с синаптическими контактами с нейронами, экспрессирующими кисспептин, который является регулятором репродуктивной системы [8, 9].

Одной из возможных причин старения является дисфункция гипоталамуса, в частности возрастное повышение порога чувствительности гипоталамуса к гомеостатическим сигналам [10–12]. При этом в туберальной группе ядер, в частности в VMN и дорсомедиальном (DMN) ядрах увеличивается экспрессия нейрональной синтазы оксида азота (nNOS) и снижается экспрессия кальций-связывающего белка кальбиндина (CB) [13, 14]. К числу распространенных в головном мозге, в том числе и в гипоталамусе, нейропептидов относится нейропептид Y (NPY) [15].

Целью исследования явилось определение локализации SOM-иммунореактивных нейронов в туберальной группе ядер гипоталамуса и колокализации SOM с CB, nNOS, NPY.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на 30 белых крысах самках (n =15) и самцах (n = 15) линии Вистар в возрасте 2–3 мес. (молодые, n = 10), 1 год (взрослые, n = 10) и 2–2.5 года (старые, n = 10) после рождения с соблюдением “Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных” (приказ № 775 от 12.08.1977 г. МЗ СССР), в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями этического комитета Ярославского государственного медицинского университета Минздрава РФ. Молодые самки находились в фазе диэструса, что определялось по влагалищному мазку с окраской метиленовым синим по Леффлеру.

После введения летальной дозы уретана (3 г/кг, внутрибрюшинно), животных перфузировали транскардиально раствором стандартного фосфатно-солевого буфера (PBS; 0.01 M, pH 7.4) (БиолоТ, Россия). С целью проведения иммуногистохимических исследований, животных (n = 20) затем перфузировали 4%-ным раствором параформальдегида (Sigma, США) на PBS. После перфузии головной мозг извлекали и иссекали участок гипоталамуса в области срединного возвышения согласно координатам атласа мозга крыс [16]. Серии коронарных срезов гипоталамуса толщиной 14 мкм изготовляли с помощью криотома Shandon E (Thermo Scientific, Великобритания).

С целью выявления нейронов, содержащих SOM, CB, nNOS, NPY применялось двойное мечение антителами. Срезы прединкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в PBS с добавлением 10% ослиной сыворотки (“Jackson Immunoresearch”, США), 1% тритона X-100, 0.1% бычьего сывороточного альбумина, 0.05% тимерозола. Затем срезы инкубировали с первичными антителами (козьи против SOM, 1 : 200, Santa Cruz, sc-7819; кроличьи против CB, 1 : 500, Abcam, ab11426; кроличьи против nNOS, 1 : 200, Abcam, ab76067; кроличьи против NPY, 1 : 500, Abcam, ab30914) в течение 24 ч при комнатной температуре. После кратковременной промывки в PBS срезы инкубировали со вторичными антителами в течение 2 ч. Вторичные антитела были конъюгированы с флуорохромами — флуоресцеин-изотиоцианатом (FITC), дающим зеленую флуоресценцию и индокарбоцианином (Cy3), дающим красную флуоресценцию (разведение 1 : 150, Jackson Immunoresearch, США). После этого срезы снова отмывали в PBS и заключали в среду для иммунофлуоресценции (VectaShield, Vector Laboratories, США). Окраску клеток всей популяции нейронов проводили красителем, флуоресцирующим в зеленой области спектра, NeuroTrace Green Fluorescent Nissl Stains (Molecular Probes, США) –

Таблица 1. Процент SOM-ИР нейронов в ядрах туберальной области гипоталамуса крыс разного возраста

Возраст	AN	VMNvl	DMN	MTu	VMN shell
		Самки			
Молодые	9.1 ± 1.5	12.2 ± 1.6	5.4 ± 0.6	4.2 ± 0.6	2.2 ± 0.1
Взрослые	11.3 ± 0.9	10.5 ± 1.1	6.1 ± 0.8	6.3 ± 0.7	1.9 ± 0.2
Старые	8.4 ± 1.3	11.1 ± 1.3	7.3 ± 0.4	5.0 ± 0.6	2.0 ± 0.2
		Самцы			
Молодые	10.1 ± 1.2	11.5 ± 0.8	6.6 ± 0.9	5.5 ± 0.6	1.6 ± 0.2
Взрослые	9.2 ± 0.8	10.6 ± 1.1	7.0 ± 0.5	4.1 ± 0.7	2.2 ± 0.3
Старые	8.6 ± 1.4	9.4 ± 1.2	5.7 ± 0.6	5.2 ± 0.9	2.4 ± 0.2

разведение 1 : 200. После этого срезы отмывали в PBS и заключали в среду для флуоресцентной микроскопии VectaShield (Vector Laboratories, США). Для исключения неспецифической реакции, часть срезов инкубировали без первичных и/или вторичных антител.

Анализ препаратов проводили на флуоресцентном микроскопе Olympus BX43 (Токио, Япония) с соответствующим набором светофильтров и охлаждаемой цифровой CCD камерой Tucsen FL-20 с программным обеспечением Mosaic V2.1 (Китай). Для выявления меченых нейронов использовали каждый третий из серийных срезов. Число ИР нейронов определяли на изображениях срезов, полученных под объективом 20×/0.50. Площадь изображений составляла 0.14 мм^2. Долю SOM-ИР нейронов определяли как их отношение к общему количеству нейронов, выявленных NeuroTrace Fluorescent Nissl Stains, или суммарному количеству SOM-ИР и SOM-негативных нейронов, которое принимали за 100%. Анализу подлежали нейроны, срез которых прошел через ядро с видимым ядрышком и с флуоресценцией, превышающей фоновое свечение. Процент ИР нейронов определяли с помощью программы Image J (NIH, США).

Математическая обработка данных и построение графиков выполнено с использованием программы Sigma Plot (Systat Software, США). Все величины представлены как средняя арифметическая ± ошибка среднего ($M \pm m$). Достоверность различий средних величин определяли с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с коррекцией Бонферрони. Достоверными считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В туберальной области SOM-иммунореактивные (ИР) нейроны выявлялись в AN, VMN, DMN, медиального туберального (MTu), перивентрикулярного (PeV) и перифорникального (PeF) ядер. В VMN SOM-ИР нейроны определялись в оболочке ядра (shell), вентролатеральной части ядра (VMNvl) и в дорсомедиальной части (VMNdm) (рис. 1).

У крыс всех возрастных групп наибольшее количество SOM-ИР нейронов выявлялось в области AN и VMNvl. Меньший процент наблюдался в DMN, MTu, VMN shell. Единичные нейроны обнаруживались в VMNdm, перивентрикулярного (PeV) и перифорникального (PeF) ядер (табл. 1).

В AN молодых крыс только в единичных SOM-ИР нейронах выявлялся CB, nNOS и NPY. Процент SOM/CB-ИР нейронов достоверно возрастал от молодого возраста к взрослому ($p < 0.001$), а также от взрослых к старым ($p < 0.05$), процент

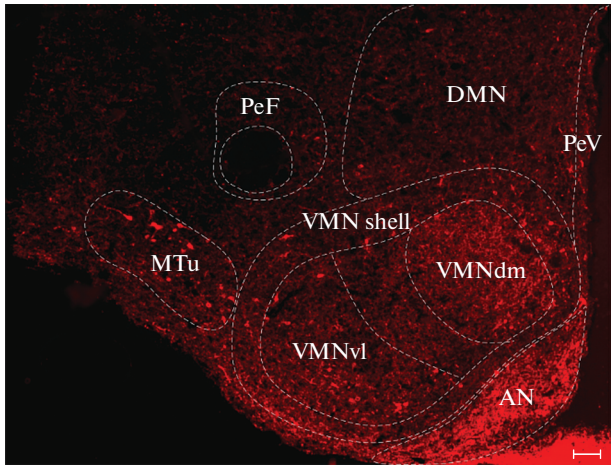


Рис. 1. Обзорная микрофотография SOM-ИР нейронов в ядрах туберальной области гипоталамуса крысы. AN – дугообразное ядро, VMNvl – вентролатеральная части вентромедиального ядра, VMNdm – дорсомедиальная часть вентромедиального ядра, VMN shell – оболочка вентромедиального ядра, DMN – дорсомедиальное ядро, MTu – медиальное туберальное ядро, PeV – перивентрикулярное ядро, PeF – перифорникальное ядро. Флуоресценция Cy3. Масштаб – 300 мкм.

SOM/NPY-ИР достоверно был меньше у молодых крыс в сравнении с взрослыми и старыми животными обоего пола ($p < 0.001$, рис. 2, табл. 2–4). SOM/nNOS-ИР нейроны не выявлялись у молодых животных, но присутствовали у взрослых и старых крыс без достоверных различий между ними ($p > 0.05$).

В VMN SOM-ИР нейроны VMN shell и VMNdm не содержали CB и nNOS, но часть из них была ИР к NPY. В VMNvl от трети до половины SOM-ИР нейронов экспрессировали nNOS, а ИР к CB и NPY была обнаружена у небольшого процента нейронов (от 7.9 до 18.6%) независимо от возраста и пола (рис. 3, табл. 2–4).

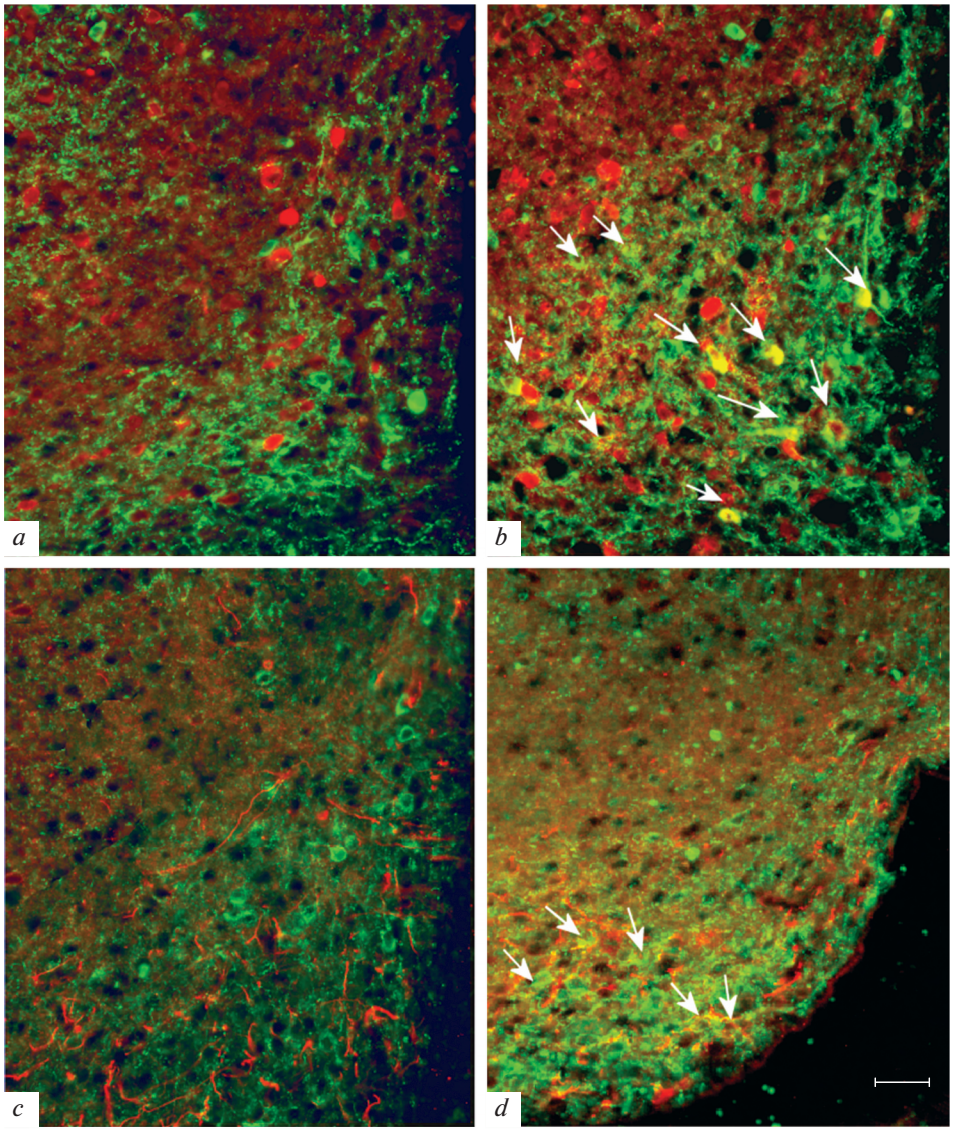
В DMN до трети SOM-ИР нейронов экспрессировало CB, nNOS и NPY. При этом в DMN самцов наблюдался достоверно больший процент SOM-ИР нейронов, колокализующих NPY в сравнении с самками во всех возрастных группах ($p < 0.001$) (табл. 2–4).

В MTu процент SOM/CB-ИР нейронов варьировал от 15 до 20%, SOM/NPY-ИР нейронов – от 9 до 11%, и лишь небольшой процент SOM-ИР нейронов этой области содержал nNOS (рис. 4, табл. 2–4).

Отдельные SOM-ИР нейроны выявлялись в PeV и PeF. В PeV треть SOM-ИР нейронов была также CB-ИР, 13–20% – nNOS-ИР, но NPY-негативной. В PeF от 20 до 42% нейронов были SOM/CB-ИР и не экспрессировали nNOS-ИР и NPY (табл. 2–4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты нашего исследования свидетельствуют, что SOM-ИР нейроны у крыс в туберальной области расположены в AN, DMN, VMN, MTu, PeV и PeF ядрах. Ранее наличие SOM было отмечено в AN, VMN, DMN, PeV ядрах взрослых крыс [1, 2, 5], туберальном ядре у взрослых мышей [17]. Мы впервые показали наличие SOM-ИР нейронов у крыс в MTu, PeF и оболочке VMN. В VMN SOM-ИР нейроны локализовались главным образом в области VMNvl. Количество SOM-ИР



(продолжение рис. на следующей странице)

Рис. 2. Микрофотографии SOM-ИР нейронов, содержащих CB (*a*, *b*), nNOS (*c*, *d*), а также NPY (*e*, *f*) в AN молодых (*a*, *c*, *e*) и старых (*b*, *d*, *f*) крыс. Колокализация двух маркеров указана стрелкой. Флуоресценция Cy3 (красный, CB, nNOS, NPY), FITC (зеленый, SOM). Масштаб – 50 мкм.

нейронов было небольшим по сравнению с общим числом клеток в этих ядрах. Наибольшее число SOM-ИР нейронов выявлялось в AN и VMNvl.

Нами впервые было установлено, что при старении локализация SOM-ИР нейронов в ядрах туберальной области гипоталамуса, а также их число не изменяется у самцов и у самок. Согласно данным литературы, уровень соматолиберина в срединном возвышении снижался у старых крыс, тогда как уровень соматостатина в

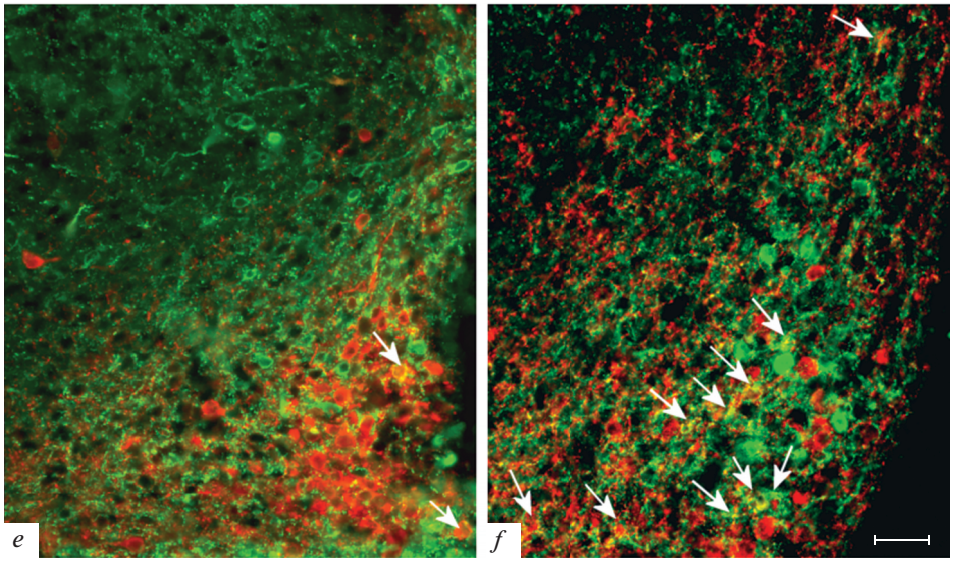


Рис. 2. Окончание

Таблица 2. Процент SOM/CB-ИР нейронов в ядрах туберальной области гипоталамуса крыс разного возраста

Возраст	AN	VMNvl	VMN shell	VMNdm	DMN	MTu	PeV	PeF
				Самки				
Молодые	6.6 ± 1.5	18.3 ± 1.7	–	–	19.5 ± 3.6	15.5 ± 3.4	23.6 ± 10.4	23.6 ± 10.5
Взрослые	41.7 ± 3.6*	22.8 ± 3.5	–	–	16 ± 2.9	22 ± 4.4	23.6 ± 10.4	20 ± 9.4
Старые	72.3 ± 5.9*◆	7.9 ± 0.9	–	–	22 ± 4.2	20 ± 3.7	28.6 ± 8.7	30.8 ± 8.5
				Самцы				
Молодые	29.4 ± 3.3	18.6 ± 1.4	–	–	17 ± 1.8	18 ± 3.7	33.6 ± 9.6	35.8 ± 4.4
Взрослые	49.5 ± 4.1*	17.1 ± 1.2	–	–	23 ± 3.6	16 ± 2.9	32.2 ± 9.1	20 ± 12.3
Старые	66.5 ± 5.7*◆	15.4 ± 1.6	–	–	18 ± 2.5	20 ± 3.3	35.8 ± 9.1	42. 2± 4.6

*$p < 0.001$ – различия достоверны по сравнению с молодыми крысами. ◆$p < 0.05$ – различия достоверны по сравнению с взрослыми крысами.

Таблица 3. Процент SOM/nNOS-ИР нейронов в ядрах туберальной области гипоталамуса крыс разного возраста

Возраст	AN	VMNvl	VMN shell	VMNdm	DMN	MTu	PeV	PeF
				Самки				
Молодые	0	34.6 ± 8.5	–	–	19.2 ± 4.5	4.4 ± 1.3	15.0 ± 10.0	–
Взрослые	13.7 ± 4.9	38.8 ± 10.2	–	–	17.8 ± 3.5	4.8 ± 0.7	15.0 ± 10.0	–
Старые	16.1 ± 2.5	36.0 ± 8.2	–	–	20.0 ± 5.1	5.2 ± 1.9	18.6 ± 8.2	–
				Самцы				
Молодые	0	43.4 ± 6.7	–	–	20.4 ± 5.0	4.4 ± 1.7	13.6 ± 8.8	–
Взрослые	13.5 ± 3.6	49.6 ± 7.0	–	–	28.0 ± 5.9	5.6 ± 0.7	20.0 ± 12.3	–
Старые	18.2 ± 4.5	42.4 ± 3.1	–	–	18.8 ± 4.9	5.0 ± 1.0	20.0 ± 9.4	–

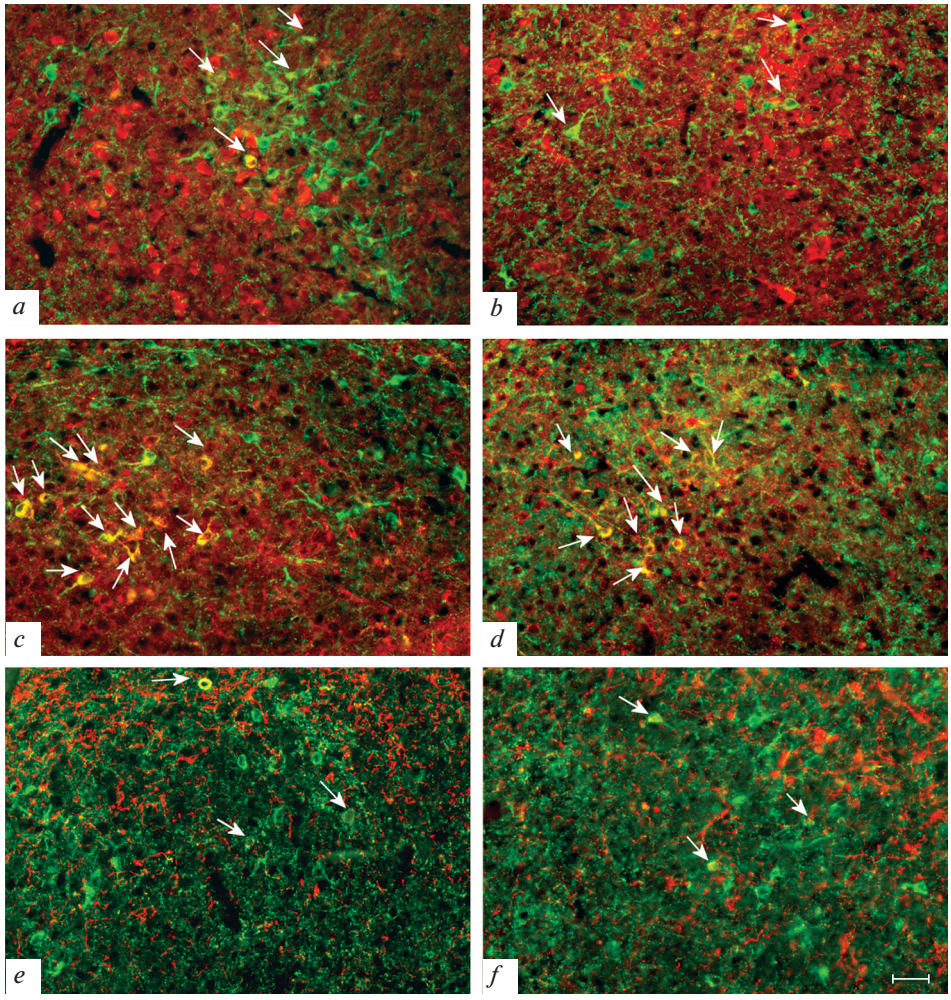


Рис. 3. Микрофотографии SOM-ИР нейронов, содержащих CB (*a*, *b*), nNOS (*c*, *d*), а также NPY (*e*, *f*) в VMNvl молодых (*a*, *c*, *e*) и старых (*b*, *d*, *f*) крыс. Колокализация двух маркеров указана стрелкой. Флуоресценция Cy3 (красный, CB, nNOS, NPY), FITC (зеленый, SOM). Масштаб – 50 мкм.

Таблица 4. Процент SOM/NPY-ИР нейронов в ядрах туберальной области гипоталамуса крыс разного возраста

Возраст	AN	VMNvl	VMN shell	VMNdm	DMN	MTu	PeV	PeF
				Самки				
Молодые	4.2 ± 0.7	16.4 ± 3.3	39.3 ± 6.5	30.0 ± 14.6	9.2 ± 1.3	9.1 ± 0.9	–	–
Взрослые	28.5 ± 3.9*	9.0 ± 2.3	33.3 ± 2.7	30.0 ± 14.6	12.4 ± 2.5	13.4 ± 2.2	–	–
Старые	24 ± 2.9*	14.1 ± 2.6	28.4 ± 3.1	33.6 ± 12.4	9.8 ± 1.9	11.1 ± 2.5	–	–
				Самцы				
Молодые	5.3 ± 1.1	17.7 ± 3.5	35.7 ± 4.3	38.6 ± 12.5	33.0 ± 3.5◆	9.7 ± 1.3	–	–
Взрослые	28 ± 0.9*	10.3 ± 2.6	44.3 ± 6.3	25.0 ± 11.2	37.1 ± 5.1◆	9.4 ± 1.3	–	–
Старые	31 ± 3.6*	11.5 ± 2.2	46.1 ± 3.8	37.2 ± 12.3	26.6 ± 4.7◆	10.8 ± 2.0	–	–

*$p < 0.001$ – различия достоверны по сравнению с молодыми крысами. ◆$p < 0.001$ – различия достоверны по сравнению с самками.

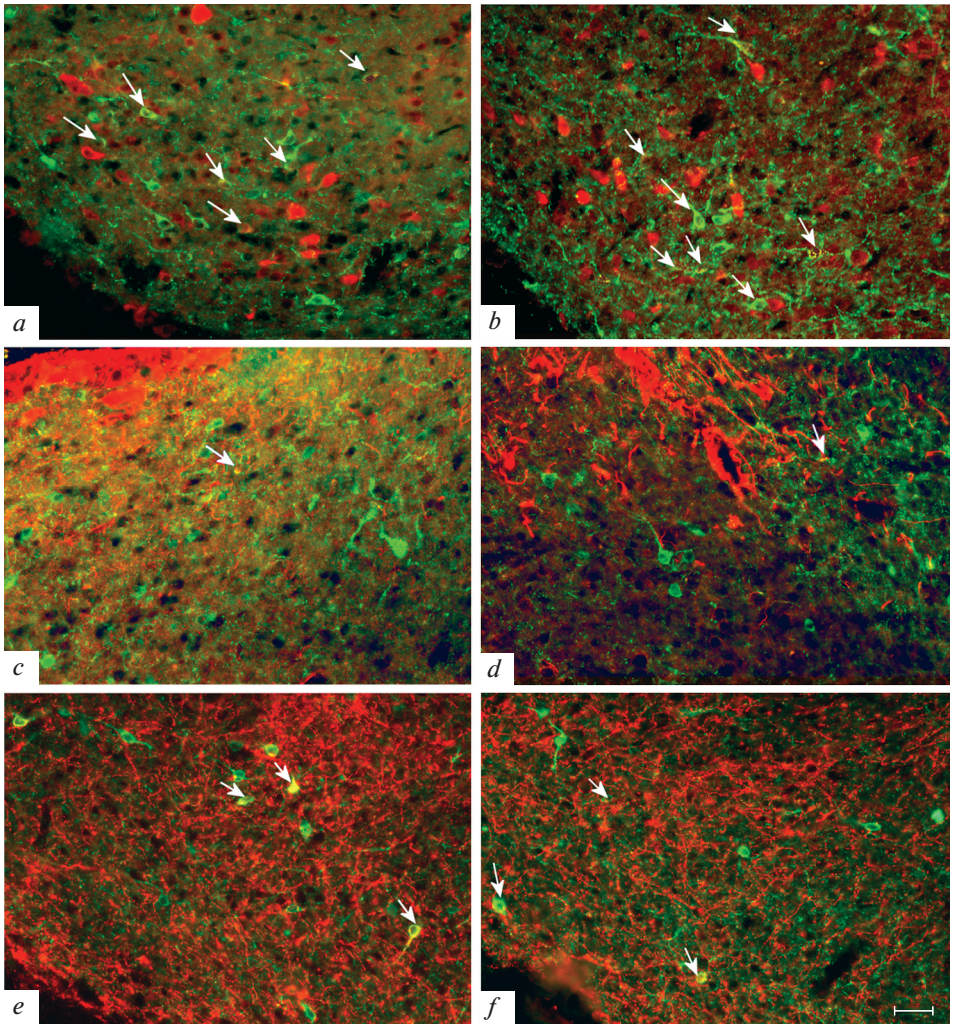


Рис. 4. Микрофотографии SOM-ИР нейронов, содержащих CB (*a*, *b*), nNOS (*c*, *d*), а также NPY (*e*, *f*) в MTu молодых (*a*, *c*, *e*) и старых (*b*, *d*, *f*) крыс. Колокализация двух маркеров указана стрелкой. Флуоресценция Cy3 (красный, CB, nNOS, NPY), FITC (зеленый, SOM). Масштаб – 50 мкм.

срединном возвышении и уровни соматолиберина и соматостатина в телах клеток не изменялись. Было установлено, что соматостатин-индуцированное ингибирование соматотропина было сенсибилизировано у старых крыс, что указывает на возможную причину возрастного уменьшения уровня соматотропина в плазме [12].

Тем не менее, при старении в AN увеличивался процент SOM-ИР нейронов, колокализующих CB, nNOS и NPY. AN характеризуется отсутствием гематоэнцефалического барьера и является важным ядром-сенсором биохимических параметров крови [18]. В этом ядре перестройки нервных синапсов часто происходят во время различных изменений метаболических состояний, что с возрастом может приводить к накоплению “клеточного мусора” в межклеточном пространстве ядра и раз-

витию нейровоспаления с возрастом [11]. При этом данные литературы также свидетельствуют в пользу того, что NO и NPY оказывают провоспалительный эффект в нервной системе [19, 20].

Согласно данным литературы, у мыши небольшая часть SOM-ИР нейронов колокализовала родственный белку Агути пептид (Aguti-related peptide, AgRP), но не проопиомеланокортин (POMC) [21]. AgRP/NPY являются орексигенными пептидами в отличие от POMC, метаболиты которого обладают анорексигенным эффектом [22]. SOM оказывает ингибирующее влияние на POMC-содержащие нейроны, которые экспрессируют рецепторы к SOM [1]. Можно предположить, что увеличение процента колокализации SOM с орексигенными пептидами (в частности с NPY) в AN нейронах способствует нарушению баланса между потреблением пищи и энергозатратами в сторону увеличения поглощения пищи и уменьшения расхода энергии, что приводит к развитию ожирения и метаболического синдрома в старости.

В наших предыдущих исследованиях мы обнаружили увеличение экспрессии nNOS при старении в DMN, VMN и AN [13]. Вероятно, с этим связано и отмеченное в настоящей работе увеличение процента нейронов, колокализующих SOM и nNOS в AN. Результаты наших предыдущих работ свидетельствуют о том, что доля CB-ИР нейронов в AN с возрастом не изменяется [14]. Можно предположить, что с возрастом в AN происходят разнонаправленные изменения экспрессии CB, при котором его экспрессия увеличивается в одних группах нейронов и уменьшается в других.

Данные литературы показывают, что SOM-ИР нейроны тесно связаны синаптическими контактами с нейронами, экспрессирующими кисспептин, в частности в преоптической области и AN. Тем не менее, лишь единичные нейроны содержат SOM и кисспептин [8].

VMNvl в основном отвечает за агрессию у самцов и самок, а также половое поведение у самок крыс и характеризуется присутствием нейронов, которые экспрессируют рецепторы эстрогена, в то время как дорсомедиальная часть VMNdm больше связана с регуляцией аппетита [23]. Мы обнаружили, что VMNvl от трети до половины SOM-ИР нейронов у всех крыс колокализовали nNOS, а ИР к CB и NPY – от 7.9 до 18.6%. Отсутствие половых различий связано с тем, что SOM-ИР нейроны VMNvl, вероятно, в большей степени связаны с регуляцией агрессивного, чем полового поведения.

Согласно данным литературы, SOM и nNOS колокализованы в 55% нейронов PeV и VMN [5]. По результатам нашей работы в PeV колокализация SOM и nNOS составляла лишь 15–20% и не изменялась при старении. Предположительно, SOM /nNOS-ИР нейроны PeV координируют выделение кисспептина, что играет важную роль в регуляции секреции половых гормонов. SOM-ИР /nNOS-негативные нейроны PeV могут участвовать в регулировании потребления пищи и расхода энергии [8].

Половые различия со стороны SOM-ИР нейронов нами отмечены в DMN. В DMN самцов наблюдался достоверно больший процент SOM-ИР нейронов, колокализующих NPY в сравнении с самками во всех возрастных группах. Данные литературы также подтверждают наличие половых различий со стороны NPY-ергической системы в DMN. Применение диеты с большим содержанием жира или систематическое введение лептина снижала экспрессию рецепторов Y1 к NPY у самцов, но не у самок мышей [24]. Клинические наблюдения демонстрируют увеличение активности симпатической нервной системы при ожирении в большей степени у мужчин, чем у женщин [25], что также может быть связано с NPY-содержащими нейронами DMN, проецирующимися к паравентрикулярному ядру и участвующими в регуляции пищевого поведения и косвенно – в модулировании активности симпатической нервной системы [26].

Таким образом, SOM-ИР нейроны туберальной области представляют собой гетерогенную популяцию нейронов. Небольшая часть SOM-ИР нейронов AN, вероятно, экспрессирующая AGRP, участвует в регуляции метаболизма. При этом функция основной популяции SOM-ИР клеток этого ядра в молодом возрасте, вероятно, связана с управлением выделения гормона роста и половых гормонов. С регуляцией полового поведения связаны и SOM-ИР нейроны VMNvl, содержащие nNOS. При старении происходят нарушение метаболизма и угасание половой функции, что может находить отражение в изменении нейрохимического состава AN.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана РНФ (грант № 19-15-00039).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента – П.М.М., А.Д.Н., сбор данных – П.А.В., К.Ю.М., обработка данных – А.Ф.Б., В.В.П., Л.Г.П., написание и редактирование статьи – П.М.М., В.В.П.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kumar U, Singh S* (2020) Role of Somatostatin in the Regulation of Central and Peripheral Factors of Satiety and Obesity. Int J Mol Sci 21(7): 2568. https://doi.org/10.3390/ijms21072568
2. *Patel YC* (1999) Somatostatin and its receptor family. Front Neuroendocrinol 20: 157–198. https://doi.org/10.1006/frne.1999.0183
3. *Shamsi BH, Chatoo M, Xu XK, Xu X, Chen XQ* (2021) Versatile Functions of Somatostatin and Somatostatin Receptors in the Gastrointestinal System. Front Endocrinol (Lausanne) 12: 652363. https://doi.org/10.3389/fendo.2021.652363
4. *Kumar U* (2007) Colocalization of somatostatin receptor subtypes (SSTR1-5) with somatostatin, NADPH-diaphorase (NADPH-d), and tyrosine hydroxylase in the rat hypothalamus. J Comp Neurol 504(2): 185–205. https://doi.org/10.1002/cne.21444
5. *Zou SL, Somvanshi RK, Paik S, Kumar U* (2015) Colocalization of Cannabinoid Receptor 1 with Somatostatin and Neuronal Nitric Oxide Synthase in Rat Brain Hypothalamus. J Mol Neurosci 55: 480–491.
6. *Stepanyan Z, Kocharyan A, Behrens M, Koebnick C, Pyrski M, Meyerhof W* (2007) Somatostatin, a negative-regulator of central leptin action in the rat hypothalamus. J Neurochem 100(2): 468–78. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04219.x
7. *Barrios V, Frago LM, Canelles S, Guerra-Cantera S, Arilla-Ferreiro E, Chowen JA, Argente J* (2021) Leptin Modulates the Response of Brown Adipose Tissue to Negative Energy Balance: Implication of the GH/IGF-I Axis. Int J Mol Sci 22(6): 2827. https://doi.org/10.3390/ijms22062827
8. *Dufourny L, Delmas O, Teixeira-Gomes AP, Decourt C, Sliwowska JH* (2018) Neuroanatomical connections between kisspeptin neurones and somatostatin neurones in female and male rat hypothalamus: a possible involvement of SSTR1 in kisspeptin release. J Neuroendocrinol 15: e12593. https://doi.org/10.1111/jne.12593
9. *Proudan N, Peroski M, Grignol G, Merchenthaler I, Dudas B* (2015) Juxtapositions between the somatostatinergic and growth hormone-releasing hormone (GHRH) neurons in the human hypothalamus. Neuroscience 297: 205–210. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.03.054
10. *Masliukov PM, Nozdrachev AD* (2021) Hypothalamic Regulatory Mechanisms of Aging. J Evol Biochem Phys 57: 473–491 https://doi.org/10.1134/S0022093021030030
11. *Liu T, Xu Y, Yi CX, Tong Q, Cai D* (2021) The hypothalamus for whole-body physiology: from metabolism to aging. Protein Cell. https://doi.org/10.1007/s13238-021-00834-x

12. *Kim K, Choe HK* (2019) Role of hypothalamus in aging and its underlying cellular mechanisms. Mech Ageing Dev 177: 74–79.
https://doi.org/10.1016/j.mad.2018.04.008
13. *Moiseev KY, Vishnyakova PA, Porseva VV, Masliukov AP, Spirichev AA, Emanuilov AI, Masliukov PM* (2020) Changes of nNOS expression in the tuberal hypothalamic nuclei during ageing. Nitric Oxide 100-101: 1-6.
https://doi.org/10.1016/j.niox.2020.04.002
14. *Vishnyakova PA, Moiseev KY, Spirichev AA, Emanuilov AI, Nozdrachev AD, Masliukov PM* (2021) Expression of calbindin and calretinin in the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei during aging. Anat Rec (Hoboken) 304: 1094–1104.
https://doi.org/10.1002/ar.24536
15. *Nozdrachev AD, Masliukov PM* (2011) Neuropeptide Y and autonomic nervous system. J Evol Biochem Phys 47: 121–130.
https://doi.org/10.1134/S0022093011020010
16. *Paxinos G, Watson C* (2005) The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 5th Edition. Elsevier Acad Press.
17. *Luo SX, Huang J, Li Q, Mohammad H, Lee CY, Krishna K, Kok AM, Tan YL, Lim JY, Li H, Yeow LY, Sun J, He M, Grandjean J, Sajikumar S, Han W, Fu Y* (2018) Regulation of feeding by somatostatin neurons in the tuberal nucleus. Science 361(6397): 76–81.
https://doi.org/10.1126/science.aar4983
18. *Jais A, Brüning JC* (2021). Arcuate nucleus-dependent regulation of metabolism – pathways to obesity and diabetes mellitus. Endocr Rev bnab025.
https://doi.org/10.1210/endrev/bnab025
19. *Chandrasekharan B, Nezami BG, Srinivasan S* (2013) Emerging neuropeptide targets in inflammation: NPY and VIP. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 304(11): G949–G957.
20. *Tewari D, Sah AN, Bawari S, Nabavi SF, Dehpour AR, Shirooie S, Braidy N, Fiebich BL, Vacca RA, Nabavi SM* (2021) Role of Nitric Oxide in Neurodegeneration: Function, Regulation, and Inhibition. Curr Neuropharmacol 19(2): 114–126.
https://doi.org/10.2174/1570159X18666200429001549
21. *Campbell JN, Macosko EZ, Fenselau H, Pers TH, Lyubetskaya A, Tenen D, Goldman M, Verstegen AM, Resch JM, McCarroll SA, Rosen ED, Lowell BB, Tsai LT* (2017) A molecular census of arcuate hypothalamus and median eminence cell types. Nat Neurosci 20(3): 484–496.
https://doi.org/10.1038/nn.4495
22. *Yoo ES, Yu J, Sohn JW* (2021) Neuroendocrine control of appetite and metabolism. Exp Mol Med 53(4): 505–516.
https://doi.org/10.1038/s12276-021-00597-9
23. *Khodai T, Luckman SM* (2021) Ventromedial Nucleus of the Hypothalamus Neurons Under the Magnifying Glass. Endocrinology 162(10):bqab141.
https://doi.org/10.1210/endocr/bqab141
24. *Mele P, Zammaretti F, Longo A, Panzica G, Oberto A, Eva C* (2016) Sex-dependent regulation of hypothalamic neuropeptide Y-Y1 receptor gene expression in leptin treated obese (ob/ob) or lean mice. Brain Res 1649: 102–109.
25. *Shi Z, Cassaglia PA, Pelletier NE, Brooks VL* (2019) Sex differences in the sympathoexcitatory response to insulin in obese rats: role of neuropeptide Y. J Physiol 597(6): 1757–1775.
https://doi.org/10.1113/JP277517
26. *Bi S, Kim YJ, Zheng F* (2012) Dorsomedial hypothalamic NPY and energy balance control. Neuropeptides 46(6): 309–314.
https://doi.org/10.1016/j.npep.2012.09.002

Somatostatin-Containing Neurons of the Tuberal Region of the Rat Hypothalamus during Aging

P. A. Vishnyakova[a], K. Yu. Moiseev[a], V. V. Porseva[a], L. G. Pankrasheva[a], A. F. Budnik [b], A. D. Nozdrachev[c], and P. M. Masliukov[a, *]

[a] *Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russia*
[b] *Berbekov Kabardino-Balkarian State University, Nalchik, Russia*
[c] *St. Ptersburg State University, St. Ptersburg, Russia*
**e-mail: mpm@ysmu.ru*

The location and neurochemical composition of somatostatin (SOM)-containing neurons of the tuberal region of the rat hypothalamus was studied using immunohistochemical method in young (2–3 months), adults (1 year) and old (2–2.5 years) male and female rats. SOM was found in the highest percentage in the arcuate (AN) and ventrolat-

eral part of the ventromedial nucleus (VMNvl). A smaller number was observed in the dorsomedial (DMN), medial tubular (MTu), and the VMN (shell). Single neurons were found in the dorsomedial part of the ventromedial nucleus (VMNdm), periventricular, and perifornical nuclei. We did not find age-related changes in the number of SOM-IR neurons. The percentage of SOM-immunoreactive (IR) neurons colocalizing calbindin (CB), neuronal nitric oxide synthase (nNOS), neuropeptide Y (NPY) was increased in AN during aging. In the VMNvl, from one third to half of the SOM-IR of neurons in all rats colocalized nNOS, and IR to CB and NPY was observed from 7.9 to 18.6%. In DMN of males, a significantly higher percentage of SOM-IR neurons colocalizing NPY was observed in all age groups when compared with females. Thus, neurochemical changes are observed with aging in the SOM-ergic system of the tuberal nuclei of the hypothalamus, mainly in the arcuate nuclei.

Keywords: hypothalamus, somatostatin, tuberal nuclei, aging

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2021, том 107, № 12, с. 1542–1552

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

РОЛЬ АКТИВНОГО ФРАГМЕНТА AgRP 25–51 В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НОРАДРЕНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ LOCUS COERULEUS И В БИОСИНТЕЗЕ НОРАДРЕНАЛИНА

© 2021 г.
А. Л. Михрина[1], Л. О. Савельева[1], И. Ю. Морина[1], И. В. Романова[1, *]

[1]*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия*

**E-mail: irinaromanova@mail.ru*

Поступила в редакцию 29.09.2021 г.
После доработки 06.10.2021 г.
Принята к публикации 11.10.2021 г.

Результаты двойного флуоресцентного иммуномечения и конфокальной микроскопии демонстрируют локализацию непосредственно вокруг тел норадренергических (НА) нейронов locus coeruleus (LC) иммунопозитивных к AgRP (agouti gene related protein) отростков, присутствие в телах НА-нейронов меланокортиновых рецепторов 3-го, но не 4-го типа. Эти данные свидетельствует о возможности прямого влияния фрагмента AgRP 83–132 на НА-нейроны. В экспериментах на мышах C57BL/6J через 3 ч после введения в LC фрагмента AgRP 25–51, действие которого не связано с влиянием на G-белок-связанные меланокортиновые рецепторы, выявлен его тормозный эффект на НА-нейроны. С помощью иммуногистохимического метода на срезах мозга в нейронах LC не выявлено изменения уровня тирозингидроксилазы, фосфорилированной по серину-40, однако найдено достоверное уменьшение уровня тирозингидроксилазы, фосфорилированной по серину-31, и уровня дофамин-β-гидроксилазы. Данные ПЦР в реальном времени демонстрируют, что после введения AgRP 25–51 наблюдается достоверное уменьшение уровня мРНК тирозингидроксилазы, уровня мРНК норадреналин-транспортера и уровня мРНК GAD65/67 – ферментов биосинтеза гаммааминомасляной кислоты. Результаты высокоэффективной жидкостной хроматографии демонстрируют, что после введения AgRP 25–51 в LC в стриатуме и орбито-фронтальном кортексе – основных мишенях НА-нейронов LC, наблюдается уменьшение и уровня НА. В статье обсуждаются механизмы взаимодействия меланокортиновой системы с НА-нейронами LC.

Ключевые слова: агути-подобный пептид, норадреналин, голубое пятно, стриатум, кортекс, тирозингидроксилаза, дофамин-β-гидроксилаза, меланокортиновые рецепторы

DOI: 10.31857/S0869813921120074

Норадреналин (НА) – важнейший нейромедиатор мозга – вовлечен в регуляцию различных его функций, таких как: пробуждение, внимание, рабочая память, обработка сенсорной информации и патогенез многих заболеваний (депрессия, биполярное расстройство, нейродегенеративные и др.) [1–3].

Этапы биосинтеза НА хорошо изучены. В НА-эргических нейронах сначала из L-тирозина осуществляется синтез дофамина с помощью двух ферментов: тирозингидроксилазы (TH) и ДОФА-декарбоксилазы. Затем в этих же клетках из дофамина образуется НА благодаря работе фермента дофамин-β-гидроксилазы (DBH).

Таким образом, биосинтез НА зависит от трех ферментов (в отличие от дофамина, синтез которого осуществляется с помощью двух ферментов). При этом ТН – скорость лимитирующий фермент биосинтеза всех катехоламинов, он экспрессируется в клетках, но его активность определяется фосфорилированием по остаткам серина (8, 19, 31 и 40), связанных с различными внутриклеточными посредниками [4]. Основной путь активации ТН – фосфорилирование по серину-40, которое зависит от G-белок-опосредованных механизмов внутриклеточной сигнализации, в частности, от протеинкиназы А. Остальные пути фосфорилирования приводят к гораздо меньшей активации, при этом в фосфорилировании серина-31 участвует ERK 1/2 модуль MAPK-киназного каскада и Cdk5 киназа–G-белок-независимые механизмы [4]. Таким образом, биосинтез НА зависит от экспрессии и активации ТН, определяющих уровень дофамина, который является субстратом для образования НА, а также от уровня DBH в клетке.

НА-эргические нейроны локализованы в структурах ствола мозга. Согласно классификации, предложенной в 1984 г. [5]. НА-нейроны расположены в областях А1–А7. Самая крупная группа (А6) – голубое пятно (locus coeruleus – LC), посылает проекции к нейросекреторным центрам гипоталамуса, в стриатум, обонятельные бугорки, орбитофронтальные отделы коры больших полушарий и др. Таким образом, механизмы, вовлеченные в регуляцию НА-нейронов LC, оказывают влияние и на перечисленные структуры мозга и, соответственно, их функции.

Агути-подобный пептид (AgRP – agouti related peptide/agouti gene related peptide) обнаружен более 20 лет назад [6]. В мозге обильная экспрессия молекулы-предшественника AgRP выявлена в нейронах аркуатного ядра гипоталамуса, а иммунопозитивные к AgRP отростки выявлены в различных областях мозга крысы, в частности, в структурах, где расположены тела дофаминергических нейронов и рядом с НА-эргическими [7]. Однако какие-либо исследования о влиянии AgRP на НА-нейроны нам не известны. Следует отметить тот факт, что в исследованиях, проведенных на мышах [8], не показано присутствие AgRP-иммунопозитивных отростков в НА-формациях мозга.

Было показано, что в ходе посттрансляционных изменений из молекулы-предшественника образуется три активных фрагмента AgRP: 25–51, 54–82 и 83–132 [9]. Только фрагмент AgRP 83–132 способен связываться с меланокортиновыми рецепторами 3-го и 4-го типов (MCR3/4) [10]. Функциональное значение этого фрагмента связывают с регуляцией пищевого поведения как эндогенного антагониста этих G-белок-связанных рецепторов. Блокирование в гипоталамусе MCR3 и MCR4 приводило к активации аппетита и изменению энергетического баланса организма [11]. Также в литературе обсуждается вопрос о том, что AgRP 83–132 может оказывать свои эффекты независимо от меланокортиновых пептидов, действуя как обратный агонист MCR3 [12, 13]. В экспериментах *in vivo* и in *vitro* было показано, что AgRP 83–132 оказывает тормозный эффект на уровень ТН и ее активность в нейронах среднего мозга, что приводило к уменьшению биосинтеза дофамина в стриатуме [14, 15]. Фрагменты AgRP 25–51 и 54–82 также обладают биологической активностью. В частности, после введения фрагмента AgRP 25–51 в вентральную тегментарную область (ventral tegmental area – VTA) в нейронах VTA было выявлено уменьшение фосфорилированной формы ТН по серину-31 (pTH31) и уменьшение уровня дофамина в вентральном стриатуме, куда приходят проекции нейронов VTA [15]. Эти эффекты AgRP на биосинтез дофамина могут быть связаны с влиянием фрагмента 25–51 на G-белок-независимые механизмы. Какие-либо исследования о влиянии этого фрагмента на НА-нейроны нам не известны.

Цель настоящей работы – исследовать возможность и механизмы влияния AgRP, в частности активного фрагмента AgRP 25–51, на системы биосинтеза НА, а также оценить уровень НА в стриатуме и орбитофронтальной коре – областях моз-

га, куда приходят основные проекции от НА-нейронов LC после введения фрагмента AgRP 25–51 в LC.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на половозрелых самках мышей C57Bl/6J (20–22 г) одной фазы овариального цикла. Все эксперименты проводили в соответствии с требованиями Этического комитета Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, European Communities Council Directive 1986 (2010/63/EEC) и правилам, изложенным в “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”. Эксперименты проводили в утренние часы (10–13 ч), перед началом каждого эксперимента животных наркотизировали внутрибрюшинно хлоралгидратом (400 мг/кг).

Для иммуногистохимических исследований с использованием флуоресцентных меток мышей (n = 3) подвергали транскардиальной перфузии мозга с помощью перфузионного насоса: сначала пропускали 50 мл 0.1 М натрий-фосфатного буфера (PBS, pH 7.4), потом 100 мл свежеприготовленного 4%-ного раствора параформальдегида, растворенного в PBS. Мозг дофиксировали в течение ночи в том же фиксаторе (4°C), промывали в PBS, погружали на 3-е суток (при 4°C) в 30%-ный раствор сахарозы, растворенной в PBS, замораживали с помощью изопентана (Sigma, США) при – 42°C и хранили при – 80°C до проведения исследований.

Для инъекций пептида мышей фиксировали в стереотаксисе для мелких животных (СЭЖ-5, Россия). Для введения были использованы стереотаксические координаты (AP = 5.5 мм; L = 1 мм, V = 3.5 мм от брегма) согласно атласу мозга мыши [16]. С помощью шприца Гамильтона билатерально были проведены инъекции 0.6 нмоль AgRP 25–51 (PhoenixPeptide Inc., США) в объеме 0.5 мкл (n = 7). Время каждой инъекции составило 5 мин. Контрольным мышам (n = 7) вводили соответствующие объемы стерильного 0.9%-ного раствора NaCl, который также был использован для растворения пептида. Через 3 ч после второго введения мышей декапитировали, мозг извлекали и подготавливали для обработки различными методами. Из мозга во фронтальной плоскости вырезали область, содержащую LC, которую по средней линии делили на две половины. Одну для иммуногистохимических исследований погружали в свежеприготовленный раствор 4%-ного параформальдегида на 3 суток при 4°C; вторую половину замораживали в сухом льду для выделения общей РНК. Ткань стриатума и орбитофронтальной коры быстро замораживали в сухом льду, гомогенизировали в 4-х кратном объеме холодной 0.1 М перхлорной кислоты, центрифугировали 10 мин (12000 g при 4°C); надосадок замораживали (–80°C) и в дальнейшем использовали для анализа НА методом обращеннофазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с электрохимической детекцией на хроматографе Beckman Coulter (США) [17], как описано ранее [15]; результаты ВЭЖХ представлены в процентах относительно контрольного (100%) уровня.

Следует отметить, что контроль попадания инъекции над областью LC оценивали визуально для ткани, которую анализировали с помощью ПЦР, и на срезах мозга при проведении иммуногистохимических исследований.

Для иммуногистохимических исследований фиксированную ткань промывали в PBS (pH 7.4) и после криопротекции при 4°C в 30%-ном растворе сахарозы, разведенной на PBS, замораживали с помощью изопентана при –42°C и хранили при –80°C. С помощью криостата (Leica CM-1510, Германия) из области мозга, где локализован LC, были изготовлены чередующиеся серии фронтальных срезов толщиной 16 мкм, каждый пятый срез монтировали на стекла SuperFrost/plus (Menzel, Германия). Стекла высушивали и после демаскировки антигена кипячением в цит-

ратном буфере (pH 6.0) использовали для иммуногистохимических реакций, протокол которых ранее подробно описан [15].

Для двойного флуоресцентного иммуномечения срезы инкубировали 48 ч (при 4°C) в смеси первичных моноклональных антител мыши к TH (Sigma, США) в разведении 1 : 2000 с поликлональными антителами кролика к AgRP 83–132 (PhoenixPeptide Inc., 1 : 500), или кролика к MCR3 (Sigma, США; 1 : 500), или кролика к MCR4 (PhoenixPeptide Inc.; 1 : 200). Также для реакций была использована смесь первичных моноклональных антител мыши к двум формам глутаматдекарбоксилазы (GAD) – ферментам биосинтеза ГАМК – GAD65 (Abcam, Великобритания; 1 : 1000) и GAD67 (Invitrogen, США; 1 : 1000) с теми же антителами кролика к MCR3 (1 : 500) или к MCR4 (1 : 200). Для визуализации реакции была использована смесь соответствующих вторичных антител, конъюгированных с различными флуорохромами: осла против Ig мыши-Alexa-568 и цыпленка против Ig кролика-Alexa-488 (Invitrogen, США) в разведении 1 : 1000. После промывки в буфере стекла со срезами заключали под покровное стекло с помощью среды Мовиол (Sigma-Aldrich, США) и хранили при 4°C до ее полимеризации.

Для одиночного иммуномечения использовали первичные антитела кролика к фосфорилированной TH по серину-40 (pTH40, Millipore, США; 1 : 2000), или кролика к фосфорилированной TH по серину-31 (pTH31, Genetex, США; 1 : 500) или кролика к DBH (Abcam, Великобритания; 1 : 500). После тщательной промывки срезы инкубировали 1 ч при комнатной температуре со вторичными Ig козы против кролика, конъюгированными с биотином (VectorLabs., Великобритания; 1 : 300). Стекла промывали и наносили на них раствор комплекса стрептавидин-пероксидаза (Sigma, США; 1 : 1000). Визуализацию проводили с помощью 0.05%-ного диаминобензидина (Sigma, США) с 0.015% перекиси водорода. Реакцию останавливали дистиллированной водой и после стандартной гистологической обработки срезы заключали под покровное стекло с помощью прозрачной среды Bio Maunt (Bio-optica, Италия). Специфичность всех иммуногистохимических реакций проверяли с помощью негативного контроля (реакции без первичных и без вторичных антител).

Анализ срезов с флуоресцентным иммуномечением проводили с помощью микроскопа DMI6000 и лазерной сканирующей конфокальной установки TCS SP5-II (Leica Microsystems, Германия). Последовательное сканирование проводили с помощью иммерсионного объектива x63, лазеров с длиной волны возбуждения 488 и 568 нм. Изображения анализировали с помощью пакета программ Leica LAS AF.

Изображения LC с одиночным иммуномечением получали с помощью микроскопа Carl Zeiss Axio A1 (Германия) со встроенной телевизионной камерой и программы Axio-Vision 4.8. Для каждой иммуногистохимической реакции было сделано 8–10 снимков. С помощью программы Image J на каждом из снимков в нейронах была определена оптическая плотность (ОП) pTH40, pTH31 или DBH в условных единицах (у. е.).

Для оценки экспрессии генов использовали количественную ПЦР в реальном времени. Тотальную РНК выделяли с помощью TRI-reagent (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. Для приготовления обратной транскрипции (ОТ) использовали 1 мкг РНК и набор фирмы Синтол (Россия). Амплификацию проводили в растворе (общий объем 25 мкл), который содержал 10 нг ОТ-продукта, 0.4 мкМ прямого и обратного праймеров и реакционную смесь qPCRmix-HS SYBR+LowROX (Евроген, Россия), согласно инструкции производителя. ПЦР в реальном времени проводили по стандартному протоколу (Applied BioSystems, США), как описано ранее [18]. Каждый цикл реакции (всего 40 циклов) состоял из четырех этапов: предварительная денатурация 5 мин при 95°C, денатурация 40 с при 95°C, отжиг с праймерами в течение 30 с при 57°C, стадия наращивания продукта 35 с при 75°C. Так как для детекции продукции был использован интеркали-

Таблица 1. Последовательность использованных в работе праймеров мыши

Ген	Положение	Последовательность	NCBI номер
Th	F	TCTCAGAGCAGGATACCAAGCA	NM_009377.2
	R	GCATCCTCGATGAGACTCTGC	
Dbh	F	CTTCCCCCGACACCACATCATCA	NM_013556.2
	R	CCGGTCAACAAAGGCAGTCTCC	
Slc6a2	F	CCATACCAAATACTCCAAATACAAG	NM_009209.3
	R	CGTGAAGAGTTTCCGGTGTCGCTT	
Gad65	F	TCAACTAAGTCCCACCCTAAG	NM_008078.2
	R	CCCTGTAGAGTCAATACCTGC	
Gad67	F	CTCAGGCTGTATGTCAGATGTTC	NM_008077.4
	R	AAGCGAGTCACAGAGATTGGTC	
Hprt1	F	AGCCGACCGGTTCTGTCAT	KR817915
	R	GGTCATAACCTGGTTCATCATCAC	
18s	F	GGGAGCCTGAGAAACGGC	NR_003278.3
	R	GGGTCGGGAGTGGGTAATTT	

рующий краситель SYBR Green, то на последнем этапе цикла делали кривую плавления конечного продукта реакции 40 мин при 95 и 57°C. В качестве негативного контроля для обратной транскрипции служили пробы с мРНК, но без фермента обратной транскриптазы, а для контроля самой ПЦР служили пробы с праймером, но без продукта обратной транскрипции. Амплификационный сигнал детектировали с помощью прибора 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., США) в 96-луночных планшетах (3 раза для каждой пробы).

Для реакций использовали прямой (forvard – F) и обратный (revers – R) праймеры, синтезированные фирмой Евроген (Россия), характеристики которых представлены в табл. 1.

В качестве референсных генов использовали ген *Hprt1*, кодирующий гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазу-1 и ген *18s* рибосомальной РНК. Количественный анализ относительного уровня мРНК проводили с помощью метода delta-delta Ct. Результаты обрабатывали с помощью программ 7500 Software v.2.0.6 и Expression Suite Software v.1.0.3.

Статистический анализ результатов ВЭЖХ проведен с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), иммуногистохимических исследований и ПЦР – с помощью парного двухвыборочного *t*-критерия для независимых выборок при уровне значимости $p < 0.05$ в пакете программ STATISTICA.10. Результаты представлены как среднее ± стандартная ошибка и в процентах по сравнению с соответствующим контрольным уровнем.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ двойного флуоресцентного иммуномечения в LC демонстрирует локализацию AgRP-иммунопозитивных отростков непосредственно вокруг тел TH-иммунопозитивных нейронов (рис. 1*a*), локализацию MCR3 как в телах TH-иммунопозитивных клеток, а также и TH-иммунонегативных клеток (рис. 1*b*). При этом в TH-иммунопозитивных клетках не выявлено MCR4, однако MCR4 выявлялись в TH-иммунонегативных клетках в этой области. Результаты анализа двойного им-

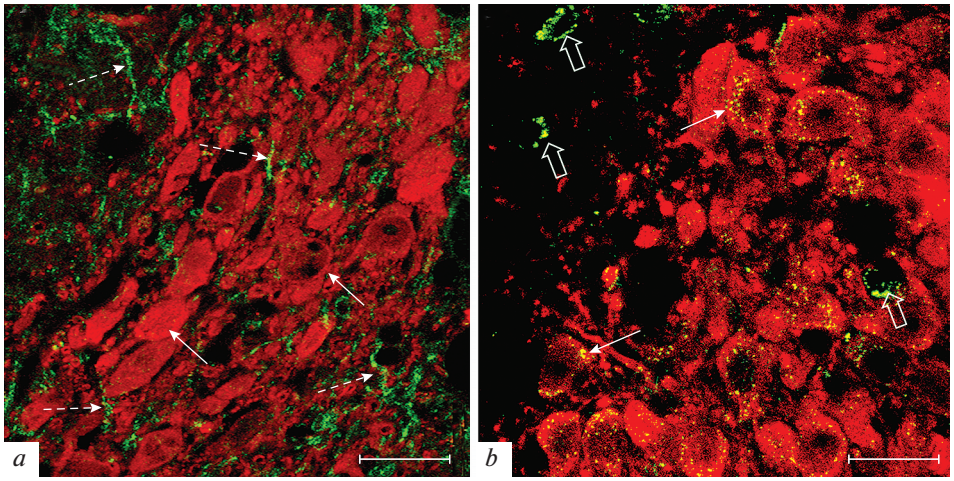


Рис. 1. Двойное флуоресцентное иммуномечение тирозингидроксилазы (*красный*, Alexa-568) с AgRp (*зеленый*, Alexa-488, *a*) или MCR3 (*зеленый*, Alexa-488, *b*).
Обозначения: сплошные стрелки указывают на тела НА-нейронов (*a*) или локализацию MCR3 в них (*b*), пунктирные стрелки – на AgRP-иммунопозитивные отростки (*a*), фигурные стрелки – MCR3 в тирозингидроксилаза-иммунонегативных структурах (*b*). Масштаб 20 мкм.

муномечения свидетельствует о локализации MCR3 (рис. 2*a*) и MCR4 (рис. 2*b*) в телах GAD65/67-иммунопозитивных клеток, локализованных вокруг НА-нейронов LC.

Анализ оптической плотности pTH40 в нейронах LC после введения AgRP 25–51 свидетельствует об отсутствии достоверных изменений по сравнению с уровнем в контрольной группе (0.52 ± 0.01 и 0.55 ± 0.02 у. е. соответственно), рис. 3.

Анализ оптической плотности pTH31 в нейронах LC после введения AgRP 25–51 свидетельствует об уменьшении ее уровня по сравнению с контрольным на 47%, $p < 0.05$ (соответственно 0.14 ± 0.01 и 0.26 ± 0.03 у. е.), рис. 3, 4.

Анализ оптической плотности DBH в нейронах LC показал, что после введения AgRP 25–51 ее уровень был ниже (на 62%, $p < 0.05$) по сравнению с контрольным (соответственно 0.11 ± 0.01 и 0.30 ± 0.01 у.е.) рис. 3, 5.

Результаты ПЦР в реальном времени демонстрируют (рис. 6), что после введения AgRP 25–51 в области LC происходит уменьшение уровня мРНК TH (на 32%, $p < 0.05$), при этом не наблюдается достоверных изменений уровня мРНК DBH, а уровень мРНК NET снижается (на 93%, $p < 0.05$) по сравнению с соответствующим контрольным уровнем. В этом эксперименте также выявлено увеличение мРНК GAD65 (в 3 раза, $p < 0.05$) и GAD67 (в 2 раза, $p < 0.05$).

Результаты ВЭЖХ демонстрируют, что после введения в LC AgRP 25–51 в стриатуме наблюдается снижение уровня НА (на 54%, $p < 0.05$), в области орбитофронтальной коры не выявлено достоверных изменений (наблюдается уменьшение уровня НА на 15%, $p > 0.05$) по сравнению с контрольным уровнем.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Представленные результаты демонстрируют присутствие AgRP-иммунопозитивных отростков вокруг TH-иммунопозитивных клеток LC мыши. В данном случае TH является маркером НА-нейронов, в которых локализованы MCR3 (рис. 1*b*),

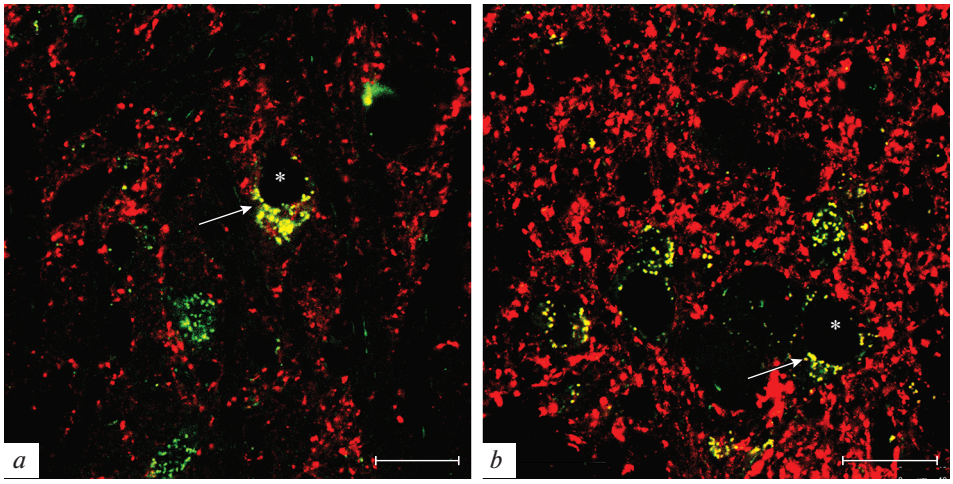


Рис. 2. Двойное флуоресцентное иммуномечение меланокортиновых рецепторов (*зеленый*, Alexa-488) MCR3 (*a*) или MCR4 (*b*) и GAD65/67 (*красный*, Alexa-568) в locus coeruleus мыши. *Обозначения:* звездочки – место локализации ядра, стрелки указывают на колокализацию (*желтое свечение*) MCR3 (*a*) или MCR4 (*b*) в GAD-иммунопозитивных нейронах. Масштаб 20 мкм.

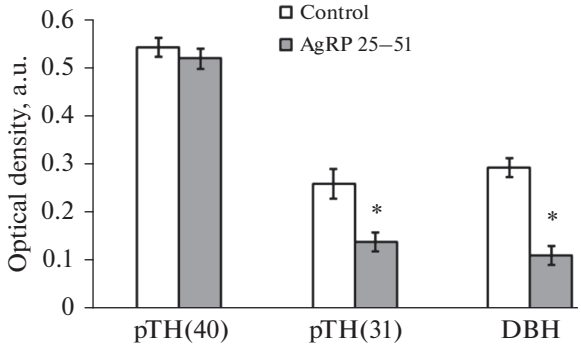


Рис. 3. Количественный анализ оптической плотности фосфорилированных по серину-40 и серину-31 форм тирозингидроксилазы (pTH40, pTH31) и дофамин-β-гидроксилазы (DBH) в нейронах locus coeruleus. * – достоверность отличий от контроля ($p < 0.05$), a. u. – условные единицы.

но не MCR4. При этом как MCR3, так и MCR4 выявлены в TH-иммунонегативных структурах, в частности GAD-иммунопозитивных, расположенных рядом с HA-нейронами (рис. 2*a*, *b*). Эти данные свидетельствуют о возможности как прямого влияния фрагмента AgRP 83–132 на функциональную активности HA-нейронов через связывание с MC3R, так и опосредованно, через ГАМК-нейроны, блокируя в них MCR3/MCR4. Этот эффект, очевидно, препятствует стимулирующему влиянию меланокортинов через эти метаботропные рецепторы, активирующие цАМФ, и приводит к снижению функциональной активности нейронов.

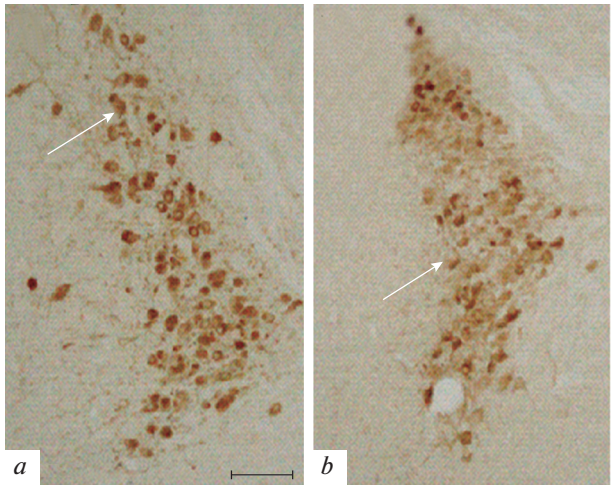


Рис. 4. Иммуногистохимическая реакция к фосфорилированной по серину-31 форме тирозингидроксилазы (pTH31) в locus coeruleus мыши в контроле (*a*) и после введения фрагмента AgRP 25–51 (*b*). *Обозначения:* стрелки указывают на тела иммунопозитивных нейронов. Масштаб 50 мкм.

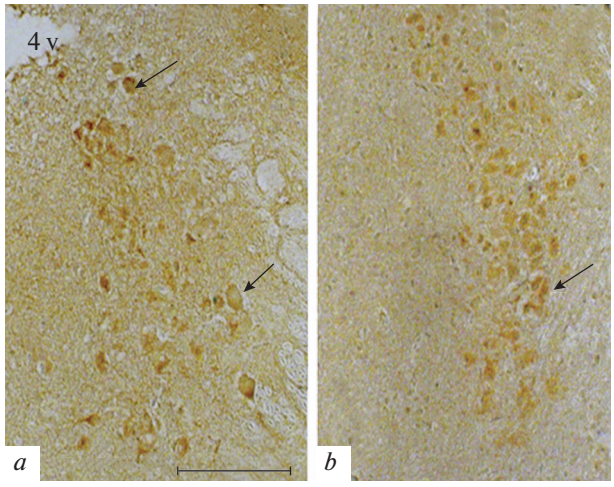


Рис. 5. Иммуногистохимическая реакция к дофамин-β-гидроксилазе в locus coeruleus мыши в контроле (*a*) и после введения фрагмента AgRP 25–51 (*b*). *Обозначения:* 4v – полость четвертого желудочка мозга, стрелки указывают на тела иммунопозитивных нейронов. Масштаб 100 мкм.

Из терминалей AgRPергических отростков вместе с фрагментом 83–132 в эквивалентных количествах выделяется и фрагмент 25–51 [9]. В настоящем эксперименте *in vivo* результаты анализа оптической плотности pTH31 и DBH демонстрируют тормозное влияние фрагмента AgRP 25–51 на активность НА-нейронов LC, которое может осуществляется через G-белок-независимые пути внутриклеточной сигнализации (MAPK-сигнальный путь). Не было выявлено достоверных изменений уровня pTH40 после введения фрагмента AgRP 25–51, что подтверждает данные об отсутствии у этого фрагмента сродства к MCR [19].

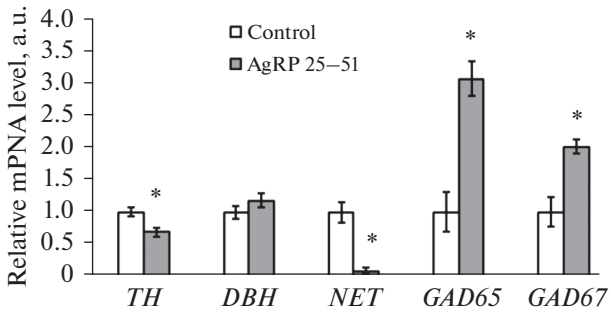


Рис. 6. Анализ относительного уровня мРНК тирозингидроксилазы (TH), дофамин-β-гидроксилазы (DBH), мембранного транспортера норадреналина (NET), глутаматдекарбоксилазы 65 и 67 (GAD65 и GAD67) в области locus coeruleus после введения фрагмента AgRP 25–51. * – достоверность отличий от контроля ($p < 0.05$), a.u. – условные единицы.

Результаты ПЦР демонстрируют, что после введения фрагмента AgRP 25–51 в области, где локализованы НА-нейроны LC наблюдается уменьшение уровня мРНК TH и мембранного транспортера НА (NET) – регулятора обратного захвата НА, что свидетельствует о тормозном влиянии фрагмента 25–51 на системы биосинтеза НА. При этом достоверных изменений уровня мРНК DBH не выявлено, что противоречит результатам анализа уровня этого фермента в клетках (рис. 6). Следует учитывать, что с помощью иммуногистохимии уровень белка оценивали непосредственно в телах НА-нейронов, а с помощью ПЦР мы анализировали ткань, содержащую не только тела нейронов LC, но и расположенные рядом отростки НА-нейронов, также содержащие мРНК DBH. При этом в ткани вокруг LC могут располагаться не только НА-ергические отростки нейронов LC, но и проекции от других НА-групп, в частности от ядра одиночного тракта [20], в котором, по-видимому, уровень экспрессии DBH компенсаторно может возрастать при снижении функциональной активности НА-нейронов LC.

Представленные данные, демонстрирующие уменьшение уровня непосредственно НА в стриатуме, подтверждают результаты об уменьшении функциональной активности систем биосинтеза НА в LC и тормозный эффект на них фрагмента AgRP 25–51. При этом в ткани орбитофронтальной коры не выявлено статистически достоверных изменений уровня НА. Можно лишь предположить, что тормозный эффект может быть достигнут через более длительный промежуток времени.

После введения фрагмента AgRP 25–51 на фоне снижения активности систем биосинтеза НА в LC (мРНК TH и NET, белков pTH31 и DBH) нами получены данные, демонстрирующие увеличение уровня мРНК GAD65 и 67 (ферментов биосинтеза ГАМК) в области LC. В связи с этим можно предположить возможность как прямого влияния AgRP 25–51 не только на НА-нейроны, но и на нейроны другой эргичности, а также и то, что подобный эффект может быть связан с нарушением взаимосвязей НА–ГАМК, что, однако, требует дальнейшего исследования.

Ранее нами были получены данные о тормозном влиянии AgRP 25–51 на функциональную активность дофаминергических нейронов [15]. Представленные в настоящем исследовании результаты впервые свидетельствуют о возможности тормозного эффекта этого фрагмента и на НА-нейроны, что расширяет представления о механизмах регуляции функциональной активности НА-нейронов мозга и функциональной роли AgRP.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проведено с использованием оборудования центра коллективного пользования Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН на средства государственного бюджета по госзаданию.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея исследования и дизайн эксперимента (А.Л.М., И.В.Р.), проведение экспериментов и сбор материала для исследования (А.Л.М., Л.О.С.), проведение исследований (А.Л.М. и Л.О.С.), обработка результатов (А.Л.М., Л.О.С., И.Ю.М.), написание и редактирование текста (А.Л.М., И.В.Р.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ramos BP, Arnsten AF* (2007) Adrenergic Pharmacology and Cognition: Focus on the Prefrontal Cortex. Pharmacol Ther 113(3): 523–536.
https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.11.006
2. *Reader TA* (1978) The effects of dopamine, noradrenaline and serotonin in the visual cortex of the cat. Cell Molec Life Sci 34(12): 1586–1588.
https://doi.org/10.1007/BF02034690
3. *Seung-Hee L, Yang D* (2012) Neuromodulation of Brain States. Neuron 76(1): 209–222.
https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.012
4. *Daubner SC, Le T, Wang S* (2011) Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. Arch Biochem Biophys 508(1): 1–12.
https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.12.017
5. *Moore RY, Card JP* (1984) Noradrenaline-containing neuron systems. In: Handbook of chemical neuroanatomy. Classical transmitters in the CNS. Eds Björklund A, Hökfelt T (Eds) Elsevier. Amsterdam 2 (I): 123–156.
6. *Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I, Barsh GS* (1997) Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. Science 278: 135–138.
https://doi.org/10.1126/science.278.5335.135
7. *Bagnol D, Lu XY, Kaelin CB, Day HE, Ollmann M, Gantz I, Akil H, Barsh GS, Watson SJ* (1999) Anatomy of an Endogenous Antagonist: Relationship between Agouti-Related Protein and Proopiomelanocortin in Brain. J Neurosci 19: 1–7.
https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-18-j0004.1999
8. *Wang D, He X, Zhao Z, Feng Q, Lin R, Sun Y, Ding T, Xu F, Luo M, Zhan C* (2015) Whole-brain mapping of the direct inputs and axonal projections of POMC and AgRP neurons. Front Neuroanat 9: Article 40. doi: . eCollection 2015
https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00040
9. *Creemers JW, Pritchard LE, Gyte A, Le Rouzic P, Meulemans S, Wardlaw SL, Zhu X, Steiner DF, Davies N, Armstrong D, Luckman SM, Schmitz CA, Rick AD, Brennand JC, White A, Lawrence CB* (2006) Agouti-related protein is posttranslationally cleaved by proprotein convertase 1 to generate agouti-related protein (AGRP) 83–132: interaction between AGRP83–132 and melanocortin receptors cannot be influenced by syndecan-3. Endocrinology 147(4): 1621–1631.
https://doi.org/10.1210/en.2005-1373
10. *Cone RD* (2005) Anatomy and regulation of the central melanocortin system. Nat Neurosci 8 (5): 571–578.
https://doi.org/10.1038/nn1455
11. *Lee M, Wardlaw SL* (2007) The central melanocortin system and the regulation of energy balance. Front Biosci 12: 3994–4010.
https://doi.org/10.2741/2366
12. *Tolle V, Low MJ* (2008) In vivo evidence for inverse agonism of Agouti-related peptide in the central nervous system of proopiomelanocortin-deficient mice. Diabetes 57 (1): 86–94.
https://doi.org/10.2337/db07-0733
13. *Goto K, Inui A, Takimoto Y, Yuzuriha H, Asakawa A, Kawamura Y, Tsuji H, Takahara Y, Takeyama C, Katsuura G, Kasuga M* (2003) Acute intracerebroventricular administration of carboxyl-terminal fragments of agouti-related peptide produces a long-term decrease in energy expenditure in rats. Int J Mol Med 12: 379–383.
https://doi.org/10.3892/ijmm.12.3.379

14. *Mikhrina AL, Romanova IV* (2015) A role of AGRP in regulating dopaminergic neurons in the brain. Neurosci Behav Physiol 45 (5): 536–541.
https://doi.org/10.1007/s11055-015-0107-7

15. *Mikhrina AL, Saveleva LO, Alekseeva OS, Romanova IV* (2020) Effects of Active Fragments AgRP 83–132 and 25–51 on Dopamine Biosynthesis in the Brain. Neurosci Behav Physiol 50 (3): 367–373.
https://doi.org/10.1007/s11055-020-00908-z

16. *Paxinos G, Franklin KBJ* (2001) The mouse brain in stereotaxic coordinates. Int Standard Book Number: 0-12-547636-1. Eds Press. CD-ROM. http://www.academicpress.com

17. *Krasnova IN, Bychkov ER, Lioudyno VI, Zubareva OE, Dambinova SA* (2000) Intracerebroventricular administration of substance P increases dopamine content in the brain of 6-hydrodopamine lesioned rats. Neuroscience 95(1): 113–117.
https://doi.org/10.1016/s0306-4522(99)00400-5

18. *Romanova IV, Derkach KV, Mikhrina AL, Sukhov IB, Mikhailova EV, Shpakov AO* (2018) The Leptin, Dopamine and Serotonin Receptors in Hypothalamic POMC-Neurons of Normal and Obese Rodents. Neurochem Res 43(4): 821–837.
https://doi.org/10.1007/s11064-018-2485-z

19. *Pritchard LE, White A* (2005) Agouti-related protein: more than a melanocortin-4 receptor antagonist? Peptides 26 (10): 1759–1770.
https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.11.036

20. *Aston-Jones G* (2004) Locus Coeruleus, A5 and A7 Noradrenergic Cell Groups. In: The rat nervous system. Elsevier. Third Edition. USA. 11: 259–294.

The Role of the Active Fragment AgRP 25–51 in the Regulation of the Functional Activity of Norepinephrinergic Neurons Locus Coeruleus and in the Biosynthesis if Norepinephrine

A. L. Mikhrina[a], L. O. Saveleva[a], I. Yu. Morina[a], and I. V. Romanova[a, *]

[a] *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry Russian Academy of Scienses, St. Petersburg, Russia*

**e-mail: irinaromanova@mail.ru*

The results of double fluorescence immunolabeling and confocal microscopy demonstrate localization directly around the bodies of norepinephrinergic (HE) neurons locus coeruleus (LC) immunopositive to AgRP (agouti gene related protein) processes, the presence in the bodies of HE neurons of melanocortin receptors 3rd, but not 4th type. These data demonstrate the possibility of a direct effect of the AgRP 83–132 fragment on HE neurons. In experiments on C57BL/6J mice 3 h after the injection of the AgRP 25–51 fragment into the LC, the action of which is not associated with the effect on G-protein – bound melanocortin receptors, its inhibitory effect on HE-neurons was revealed. Using the immunohistochemical method, no changes in the level of tyrosine hydroxylase phosphorylated by serine-40 were detected on brain slices in LC neurons, however, a significant decrease in the level of tyrosine hydroxylase phosphorylated by serine-31 and the level of dopamine-β-hydroxylase was revealed. The data of real-time PCR demonstrate that after the administration of AgRP 25–51, there is a significant decrease in the level of tyrosine hydroxylase mRNA, the level of norepinephrine transporter mRNA, and the level of mRNA GAD65 and 67 – the enzymes of GABA biosynthesis. The results of high performance liquid chromatography demonstrate that after the injection of AgRP 25–51 into the LC in the striatum and the orbitofrontal cortex – the main targets of the HA neurons of the LC, a decrease in the HA level is also observed. The article discusses the mechanisms of interaction of the melanocortin system with LC NE-neurons.

Keywords: agouti gene related protein, norepinephrine, locus coeruleus, striatum, cortex, tyrosine hydroxylase, dopamine- β-hydroxylase, melanocortin receptors

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2021, том 107, № 12, с. 1553–1567

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ИЗМЕНЕНИЕ ЭЛЕКТРОКОРТИКОГРАФИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРЫС В СИТУАЦИИ РЕАЛЬНОЙ УГРОЗЫ ЖИЗНИ В МОДЕЛИ ВИТАЛЬНОГО СТРЕССА

© 2021 г. Н. К. Апраксина[1, *], Т. В. Авалиани[1], С. Г. Цикунов[1]

[1]*Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия*
**E-mail: natalapraksina@mail.ru*

Поступила в редакцию 19.09.2021 г.
После доработки 05.10.2021 г.
Принята к публикации 05.10.2021 г.

На модели витального стресса изучалось влияние психотравмирующего воздействия на ритмическую структуру электрокортикограммы (ЭКоГ) мозга крыс при переживании гибели партнера от действий хищника. Показано, что момент переживания угрозы жизни сопровождается достоверным повышением медленноволновой активности в диапазоне дельта-ритма, усилением межполушарной асимметрии по ЭКоГ показателям в диапазоне альфа- и дельта-частот в лобной области и снижением асимметрии в диапазоне тета-ритма в лобной части и дельта-ритма в затылочной коре полушарий мозга. Наиболее выраженные изменения биоэлектрической активности мозга по показателю индекса ритма в диапазоне альфа-, бета-, тета- и дельт-частот, а также изменению асимметрии выявлены через два часа после стресса, а высокий уровень индекса ритма в диапазоне дельта-активности сохранялся до 3-х суток после угрозы жизни, что свидетельствует о выраженном аверсивном характере психотравмирующего воздействия и важной роли дельта-активности в отражении пережитых обстоятельств витального стресса. Изменение ритмической структуры ЭКоГ показателей крыс непосредственно в момент ситуации, угрожающей жизни, может выступать объективным показателем переживаемого страха при витальном стрессе и свидетельствовать о запуске процессов формирования посттравматического стрессового расстройства.

Ключевые слова: витальный стресс, угроза жизни, ЭКоГ, дельта-активность, индекс ритма

DOI: 10.31857/S0869813921120025

Переживания психотравмирующих событий, выходящих за рамки повседневного опыта, в частности, военных действий, природных и техногенных катастроф, а также насилия, как сексуального, так и семейного характера, становятся в последние десятилетия частым атрибутом современной жизни во всем мире. Возрастает необходимость поиска возможных биомаркеров, прогностических критериев в оценке развития психотравмы, вызванной экстремальными факторами. Нейрофизиологические механизмы посттравматических стрессовых расстройств (ПТСР) остаются недостаточно изученными. Моделирование подобных психических травм в экспериментальных условиях на животных сопровождается рядом трудностей: поиском стрессирующего агента, природа которого связана только с эмоциональным воздействием, а также выбором стрессора, представляющего реальную

угрозу жизни. Модель витального стресса, применяемая в настоящем исследовании – психическая травма, вызванная переживанием ситуации угрозы собственной жизни, приводит к длительным психоэмоциональным нарушениям тревожного и депрессивного характера и позволяет исследовать последствия воздействия в отсроченный период [1, 2].

В настоящее время среди большого спектра предполагаемых диагностических биомаркеров невротических расстройств тревожного характера не выявлено специфичного диагностического критерия данного типа нарушений ЦНС [3]. Проявления эмоциональных состояний как человека, так и животных находят отражение в изменении биоэлектрической активности мозга, преимущественно в соотношении основных ритмов: дельта, тета, альфа и бета [4]. Показана связь возникающих изменений показателей ЭКоГ у крыс с неврологическими нарушениями в результате черепно-мозговой травмы и сходство с таковыми в клинической практике [5]. При психических расстройствах наблюдается изменение спектра мощности, индекса ритмов биоэлектрической активности мозга [6]. Мы предположили, что одним из возможных маркеров, свидетельствующих о состоянии переживаемого ужаса и страха, в модели витального стресса могут быть показатели биоэлектрической активности коры больших полушарий (ЭКоГ показатели), отражающие состояние кортикальной нейродинамики и стабильных изменений нейроанатомических и биохимических взаимосвязей, лежащих в основе патогенеза психоэмоциональных расстройств.

Таким образом, цель данного исследования заключалась в оценке биоэлектрической активности мозга самок крыс по показателю индекса ЭКоГ ритмов в диапазоне альфа-, бета-, тета- и дельта-частот в момент нанесения психотравмирующего воздействия и в ранний посттравматический стрессовый период.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все процедуры с животными выполнялись с соблюдением международных принципов и правил Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных целей (Страсбург, 1986). Исследования соответствовали основным требованиям биомедицинской этики и были согласованы с локальным этическим комитетом ФГБНУ Институт экспериментальной медицины (№ 2/16 от 12.05.2016).

Эксперименты проводили на половозрелых самках крысах породы Вистар (ФГПУ Питомник лабораторных животных “Рапполово”, Ленинградская область) одинакового возраста (7 месяцев), имевших перед началом исследования массу 180–200 г (n = 30) без учета фазы эстрального цикла. Использование в данной работе самок крыс обусловлено необходимостью решения последующих задач по оценке влияния витального стресса на организм матери и трансгенерационной передаче эффектов психотравмы матерей потомству. Животные содержались в условиях вивария в клетках по 5 особей в каждой при постоянном доступе к воде и стандартному комбинированному корму для грызунов, одинаковом температурном режиме (22 ± 2°C), влажности, освещенности (инвертированный свет 8.00–20.00.) и уровне шума.

Модель психической травмы

Психическую травму у самок крыс моделировали обстоятельствами переживания ситуации гибели партнера от действий хищника и угрозой собственной жизни [7]. С этой целью животных помещали в террариум к тигровому питону, где одно из них становилось жертвой пищевых потребностей хищника. Пережившие гибель

партнера животные далее находились в террариуме за прозрачной перегородкой в течение 30–40 мин. Во время нанесения психической травмы у крыс фиксировали выраженные реакции страха, проявившееся у животных в виде таких поведенческих актов, как “фризинг”, сбивания в кучи, вертикальные стойки, продолжительный и измененный груминг. Отдельные животные могли осуществлять ажитированное бесконтрольное перемещение по террариуму.

Стереотаксические операции по установке корковых электродов

Установку корковых электродов проводили под золетиловым наркозом посредством интраперитонеального введения препарата Zoletil 100 (30 мг/кг) (Virbac, Франция) с предварительной внутримышечной премедикацией 2%-ным раствором рометара (8 мг/кг) (Rometar, Чехия). Предварительно побритую поверхность головы обрабатывали 5%-ным раствором йода. Для предотвращения воспалительного процесса вводили 1 мл бициллина-3 (30000 ЕД) в мышцу задней конечности. Производили продольный разрез кожи на голове длиной 2.5 см по саггитальной линии. Счищали надкостницу с предварительной анестезией 0.5%-ным раствором новокаина. С помощью сверла с ограничителем на 0.3 мм делали отверстия, далее имплантировали серебряные шаровидные электроды (d = 1 мм) в лобных и затылочных областях справа и слева, симметрично по следующим координатам: AP = 3 мм (вперед/назад от брегмы), SD = 2 мм (латерально от сагиттального шва), H = 0.3 мм (глубина погружения в кости черепа). Индифферентный и референтный электроды располагали на затылочной кости справа и слева от сагиттального шва (SD = 1.5 мм, AP = –10). Все электроды коммутировались на микроразъеме, зафиксированном на черепе, с предварительно установленными титановыми крепежными скобами самотвердеющей пластмассой. Зашивали кожный разрез шелковыми нитками, обрабатывали рану стрептоцидом. Послеоперационный период составлял 7 дней. При проведении операции использовали стереотаксический прибор фирмы Medicor (Венгрия). Стереотаксические координаты определялись по атласу [8]. Непосредственно на время эксперимента устанавливался телеметрический регистратор биопотенциалов.

Оценка биоэлектрической активности мозга самок крыс

Регистрацию биоэлектрической активности мозга в лобных и затылочных областях слева и справа соответственно проводили через 7 дней после вживления электродов, каждый сеанс длился 20 мин при свободном перемещении крыс в клетке при использовании компьютерно-аппаратного комплекса Синхро-С, который позволял проводить индексометрический анализ [9]. Строили распределения периодов колебаний ЭЭГ правого и левого полушарий за весь сеанс. По площадям распределений в соответствующих диапазонах вычисляли индекс альфа-, бета-, тета- и дельта-ритмов, представляющий долю ритма, отношение количества колебаний относительно общего количества колебаний остальных ритмов за 20-минутный интервал с периодом анализа 2 мин, а также коэффициент асимметрии индекса ритмов между левой и правой сторонами мозга, рассчитанный по формуле:

$$((a - b)/a) \times 100\%,$$

где a – значение первого числа; b – величина второго числа [9]. Фоновые значения ЭКоГ (Фон) крыс регистрировали в террариуме с питоном за закрытой прозрачной перфорированной перегородкой. Для оценки влияния витального стресса на показатели биоэлектрической активности мозга ЭКоГ регистрацию проводили непосред-

ственно во время нанесения психогенной травмы в террариуме с питоном, в момент захвата жертвы при открытой перегородке, через 2 ч после стресса и на 3-и сутки после воздействия.

Дизайн эксперимента:

1) Отбор животных (самки крыс массой 180–200 г в возрасте 7 мес.).

2) Стереотаксические операции по вживлению корковых электродов.

3) Послеоперационный период – 7 сут.

4) Фиксация телеметрического регистратора оперированным крысам, пробная регистрация ЭКоГ показателей, отбраковка животных.

5) Начало эксперимента:

6) Фиксация телеметрического регистратора крысам, регистрация фоновых ЭКоГ показателей в течение 20 мин в специальной клетке при свободном перемещении животного вне террариума с питоном.

7) Регистрация фоновых ЭКоГ показателей в течение 20 мин в специальной клетке внутри террариума с питоном, за закрытой прозрачной, перфорированной перегородкой, при нахождении сородичей.

8) Открытие перегородки в террариуме. Моделирование ситуации угрозы жизни, захват, удушение, заглатывание сородича питоном. Регистрация ЭКоГ показателей в течение 20 мин витального стресса в специальной клетке внутри террариума с питоном с открытой перегородкой. После заглатывания жертвы регистрация ЭКоГ показателей за закрытой перегородкой.

9) Регистрация ЭКоГ показателей в течение 20 мин в специальной клетке, вне террариума, спустя 2 ч после витального стресса.

10) Регистрация ЭКоГ показателей в течение 20 мин в специальной клетке вне террариума, на 3-и сутки после витального стресса.

11) Выведение животных из эксперимента.

Статистические методы оценки результатов

Для выявления статистически значимых различий применяли пакет программ StatisticaV.10, оценку проводили однофакторным дисперсионным анализом для повторных измерений (Repeated Measures ANOVA) с последующими апостериорными сравнениями при помощи *t*-критерия Стьюдента для зависимых выборок с поправкой на множественные сравнения.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ биоэлектрической активности мозга самок крыс, переживших витальный стресс по показателям индекса ритмов в диапазоне альфа-, бета-, тета- и дельта-частот выявил достоверные изменения по сравнению с фоновыми значениями в зависимости от времени регистрации ЭКоГ относительно психотравмирующего воздействия.

Достоверное снижение индекса альфа-ритма наблюдалось через два часа после витального стресса в правой лобной области (рис. 1*b*) и в обеих затылочных областях по сравнению с фоновыми значениями (рис. 1*c*, *d*). Нами не выявлено достоверных изменений биоэлектрической активности мозга по показателю индекса альфа-ритма у самок крыс, переживших ситуацию, связанную с угрозой жизни, непосредственно в момент нанесения психотравмирующего воздействия, а также в острый период после травмы на 3-и сутки (рис. 1*a*).

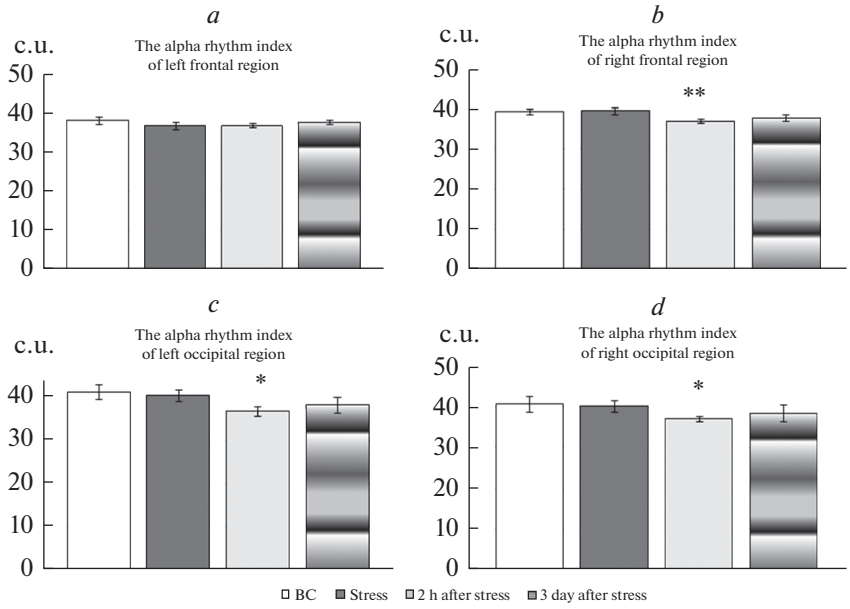


Рис. 1. Показатели индекса ритма в диапазоне альфа-частот у самок крыс, переживших витальный стресс.

По оси абсцисс – название групп животных: BC (background condition) – фоновые показатели, Stress – показатели в момент угрозы жизни, 2h after stress – через 2 ч после стрессорного воздействия, 3 after stress – на 3-и сутки после стресса. По оси ординат – отношение количества колебаний альфа-ритма к общему количеству колебаний, выраженные в условных единицах (c.u.). Индекс альфа-ритма в левой фронтальной области (*a*), в правой фронтальной области – (*b*), в левой затылочной области – (*c*), в правой затылочной части – (*d*).

* – достоверность различий индекса альфа-ритма по сравнению с фоновыми показателями ($p < 0.05$), ** – достоверность различий индекса альфа-ритма экспериментальных групп по сравнению с фоновыми показателями ($p < 0.01$), оцененные по однофакторному дисперсионному анализу для повторных измерений с последующими апостериорными сравнениями при помощи *t*-критерия Стьюдента для зависимых выборок с поправкой на множественные сравнения. Данные представлены в виде среднего ± ошибка среднего.

Показатели индекса бета-ритма также изменялись в зависимости от срока ЭКоГ регистрации у стрессированных животных (рис. 2). Через два часа после стресса в правой лобной (рис. 2*b*) и затылочной областях (рис. 2*d*) регистрируется достоверное падение индекса бета-ритма по сравнению с фоновыми значениями. Достоверных изменений индекса бета-ритма во время стресса и в раннем отдаленном периоде после стрессорного воздействия по сравнению с фоновыми значениями не выявлено.

Показано достоверное изменение медленноволновой активности коры больших полушарий мозга самок крыс после переживания ситуации угрозы жизни (рис. 3, 4). Достоверное повышение индекс ритма в диапазоне тета-активности регистрируется вправой лобной и обеих затылочных областях коры мозга через 2 ч после стресса (рис. 3*b*–*d*). Эти изменения биоэлектрической активности коры мозга нивелируются у стрессированных животных в раннем отдаленном периоде.

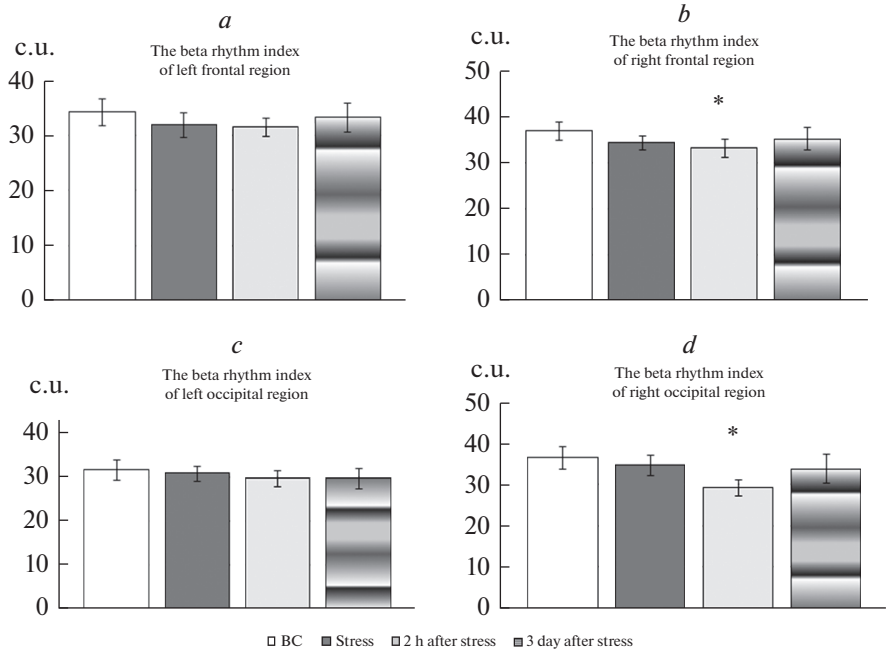


Рис. 2. Показатели индекса ритма в диапазоне бета-частот у самок крыс, переживших витальный стресс. Индекс бета-ритма в левой фронтальной области (*a*), в правой фронтальной области – (*b*), в левой затылочной области – (*c*), в правой затылочной части – (*d*). По оси ординат – соотношение количества колебаний бета-ритма к общему количеству колебаний в условных единицах (c.u.). $*p < 0.05$ – достоверность отличий индекса бета-ритма в правой лобной области спустя 2 ч после стресса по сравнению с фоновыми значениями. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

Достоверное повышение индекса дельта-ритма зарегистрировано непосредственно во время нанесения психотравмирующего воздействия, в момент переживания витального стресса в левой и правой затылочной области (рис. 4). Через 2 ч после стресса выявлено достоверное повышение индекса дельта-активности в правой лобной и обеих затылочных областях коры головного мозга крыс, а на 3-и сутки и в обеих затылочных областях (рис. 4).

Нами выявлено изменение уровня асимметрии между левым и правым полушарием по ЭКоГ-показателям в лобной и затылочной области коры больших полушарий после психогенной травмы (табл. 1).

Для животных до переживания психотравмирующего события было свойственно наличие выраженной асимметрии показателей индекса дельта-ритма в лобной и затылочной областях коры, а также индекса бета- и тета-ритмов преимущественно в затылочной коре (табл. 1).

В момент нанесения психогенной травмы (“стресс”) наблюдалось достоверное увеличение асимметрии индекса альфа- и дельта-ритмов в лобной области коры, снижение асимметрииииндекса тета-активности в лобной коре, а дельта-ритма в затылочной части по сравнению с фоновыми значениями (табл. 1).

Через 2 ч после стресса регистрировалось достоверное снижение асимметрии индекса бета-активности в затылочной области, тета-активности в обеих областях

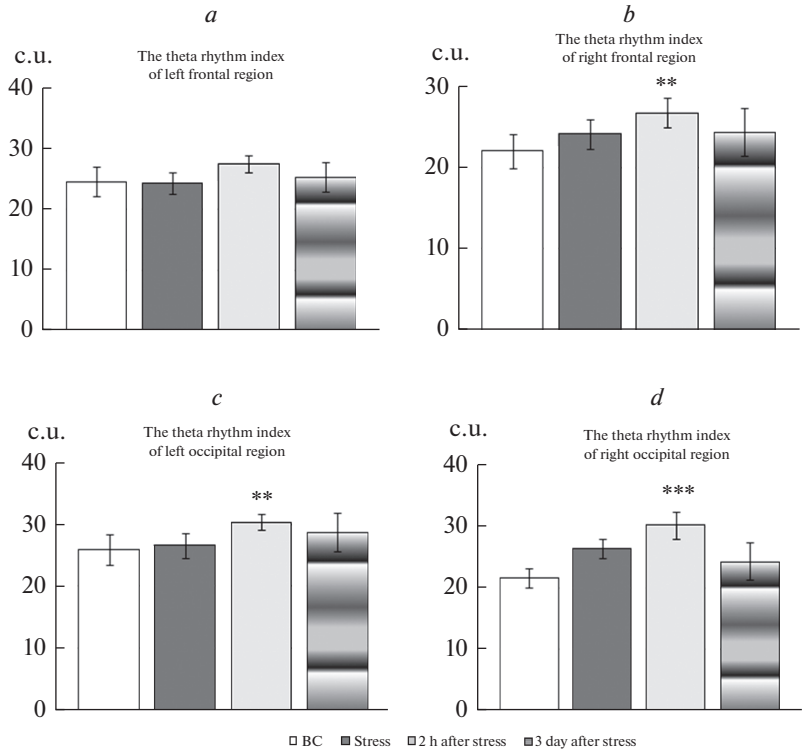


Рис. 3. Показатели индекса ритма в диапазоне тета-частот у самок крыс, переживших витальный стресс. Индекс тета-ритма в левой фронтальной области (*a*), в правой фронтальной области – (*b*), в левой затылочной области – (*c*), в правой затылочной части – (*d*). По оси ординат – соотношение количества колебаний тета-ритма к общему количеству колебаний в условных единицах (c.u.). ** – достоверность отличий индекса тета-ритма правой лобной области по сравнению с фоновыми показателям и спустя 2 ч после стресса ($p < 0.01$). *** – достоверность отличий индекса тета-ритма правой затылочной области на третьи сутки после стресса по сравнению с фоновыми значениями ($p < 0.001$). Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

Таблица 1. Коэффициенты асимметрии индекса ЭКоГ ритмов в диапазоне альфа-, бета-, тета- и дельта-частот самок крыс, переживших стресс

	Коэффициент ассиметрии индекса альфа-ритма, %		Коэффициент ассиметрии индекса бета-ритма, %		Коэффициент ассиметрии индекса тета-ритма, %		Коэффициент ассиметрии индекса дельта-ритма, %	
	лобная область	затылочная область	лобная область	затылочная область	лобная область	затылочная область	лобная область	затылочная область
Фон	2.6	1.2	7.9	15.9	10.2	16.2	53.6	25.0
Стресс	**7.4↑***	0.2	7.5	12.7	**0.8↓****	12.1	**68.4↑***	**16.7↓***
2 ч после стресса	0.3	1.4	5.4	**1.3↓****	**2.5↓****	**10.6↓***	**28.9↓***	21.2
3-и сутки после стресса	0.5	1.1	5.7	14.1	**3.9↓****	14.9	**32.3↓***	**16.1↓***

Примечание: Фон – контрольные показатели индекса ритмов до нанесения психотравмы; стресс – коэффициент ассиметрии индекса ритмов в момент угрозы жизни; 2 ч после стресса – спустя 2 ч после нанесения психотравмы; 3-и сутки после стресса – показатели на 3-и сутки после воздействия; ↓ – снижение асимметрии, ↑ – усиление асимметрии, * – достоверные отличия показателей по сравнению с фоновыми значениями ($p < 0.05$), ** – достоверные отличия по сравнению с фоновыми значениями ($p < 0.01$). Данные представлены в %.

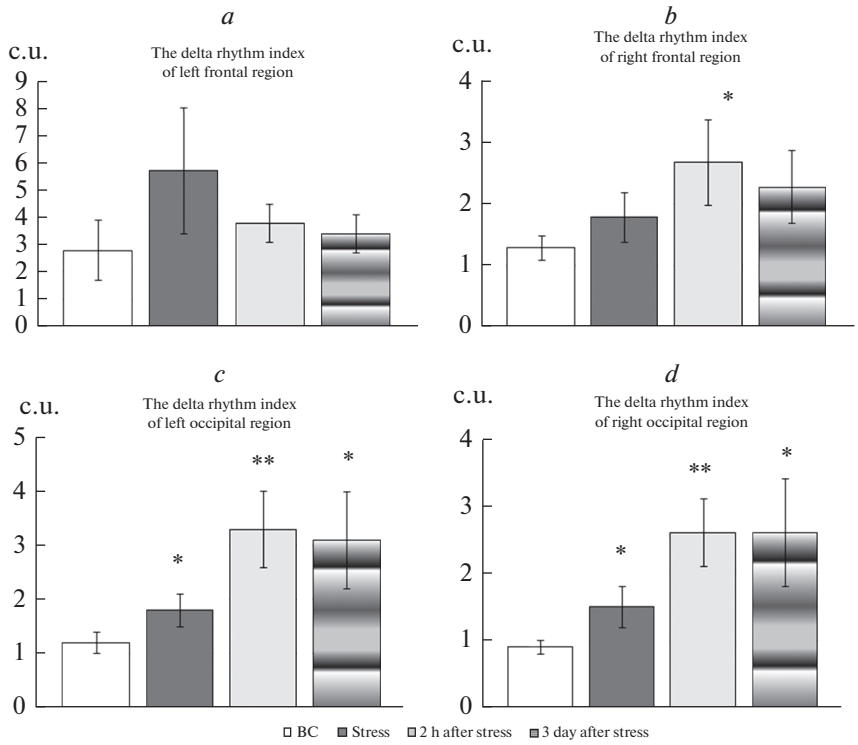


Рис. 4. Показатели индекса ритма в диапазоне дельта-частот у самок крыс, переживших витальный стресс.

По оси ординат – соотношение количества колебаний дельта-ритма к общему количеству колебаний, выраженное в условных единицах (c.u.). Индекс дельта-ритма в левой фронтальной области (*a*), в правой фронтальной области – (*b*), в левой затылочной области – (*c*), в правой затылочной части – (*d*). Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

коры полушарий головного мозга, а также дельта-ритма в лобной части коры. Усиление асимметрии индекса дельта-активности наблюдалось только в затылке по сравнению с контролем (табл. 1).

Достоверные изменения асимметрии ЭКоГ показателей спустя 3-е суток после психогенной травмы фиксировались в лобной и затылочной областях коры мозга и проявлялись в виде снижения асимметрии индекса тета- и дельта-активности по сравнению с фоном (табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Переживание эмоционального стресса приводит к изменению функционального состояния организма, вызывая нарушение активности сердечно-сосудистой, дыхательной системы, психомоторных реакций и отражается как на поведенческом, так и молекулярно-биохимическом уровнях. Ранее нами было показано, что психогенная травма у крыс вызывает эмоциональные реакции в виде страха, ужаса, проявляющиеся в виде “примерзания”, застывания, их неспособности к передви-

жению с последующими изменениями в поведении, характерными для ПТСР у человека [2], одним из типичных проявлений которого являются многократное повторное переживание травматических событий в форме навязчивых воспоминаний в дневное время, снов или кошмаров по ночам [10]. Вопрос возможных маркеров изнуряющих воспоминаний при ПТСР, в зарубежной литературе именуемых “флэшбэков”, в настоящее время широко обсуждается. Существенная роль отводится показателям ЭЭГ в оценке тяжести ПТСР [11].

Результаты наших исследований показали изменение биоэлектрической активности мозга крыс при переживании витального стресса в момент нанесения психотравмирующего воздействия, а также в ранний отдаленный период, которое может отражать нарушение функционального состояния ЦНС. На сегодняшний день в имеющейся литературе выявлена корреляция нейропсихологических нарушений при ПТСР с изменением параметров ЭЭГ [12–14]. Необходимо отметить, что вопрос изменения биоэлектрической активности мозга при переживании витального стресса остается малоизученным. Исследований, анализирующих изменение индекса ритмов, выявление асимметрии ЭКоГ-показателей при переживании ситуации, связанной с угрозой жизни, до настоящего времени не проводилось.

Данное исследование выполнено на самках крыс без учета фазы эстрального цикла. Тем не менее, нейроэндокринные взаимодействия играют ключевую роль в патогенезе психоневрологических нарушений, вызванных витальным стрессом, а гормональный статус особей выступает с одной стороны как индикатор выраженности функциональных расстройств, а с другой стороны служит маркером группы риска ПТСР. Исходя из поставленных задач, наше исследование не было направлено на определение роли гормонального фактора в патогенезе посттравматического стрессового расстройства. Важным в данном эксперименте представлялся поиск способа объективизации чувства ужаса, страха при переживании ситуации угрозы собственной жизни у крыс (момента захвата, удушения и заглатывания сородича хищником), фиксации переживаемого страха животным вне зависимости от нахождения в той или иной фазе эстрального цикла и оценке развертывания программы ПТСР в ранний отдаленный период.

Нами показано, что переживание ситуации угрозы жизни самками крыс проявляется увеличением индекса дельта-ритма в затылочной области коры непосредственно в момент нанесения психотравмирующего воздействия. Данный ЭКоГ параметр, на наш взгляд, может характеризовать степень страха и являться объективным показателем переживаемого чувства ужаса при психогенном стрессе. Сохраняющийся до 3-х суток высокий уровень индекса ритма у стрессированных крыс в диапазоне дельта-активности может свидетельствовать о выраженном аверсивном характере психотравмирующего воздействия. По данным литературы усиление дельта-активности свидетельствует о состоянии отчаяния/безнадежности, ангедонии, что является одним из проявлений ПТСР и коррелирует с изменениями в центральной префронтальной извилине уровня серотонина (5-HT) и нейропептида Y (NPY) в базолатеральном ядре и амигдале у крыс [5]. Кроме того, выявлена корреляция дельта-ритма и вегетативной активности организма (вариабельностью сердечного ритма), уровнем секреции кортизола [15], который повышается при стрессе. Переживание ситуации гибели сородича от действий хищника является мотивационной ситуацией, связанной с опасностью, и сопровождается усилением дельта-активности, что согласуется с данными литературы [16, 17].

Результаты исследования показывают, что наиболее выраженные изменения биоэлектрической активности у самок крыс наблюдаются спустя 2 ч после пси-

хогенной травмы. Уровень дельта-активности остается выше, чем фоновые значения и сопровождается усилением еще и тета-ритма в правой лобной и обоих затылочных отделах коры головного мозга. В исследованиях на грызунах в модели социального стресса поражения также отмечено повышение медленноволновой активности в острый период стресса. Активация медленноволновой активности во фронтальной области коры может быть связана с комплексной стимуляцией гиппокампальных и экстрагиппокампальных регионов, в том числе гипоталамуса [18–20]. Интересно отметить, что данный ритм у крыс регистрируется во время исследовательского поведения, которое включает различные типы движения, обнюхивание и ориентацию в пространстве [21]. Показано, что у грызунов тета-ритм гиппокампа сильно коррелирует с поведением [22]. Состояние неподвижности (поза при ожидании угрозы) и автоматические типы движения, таких как мигание глаз, груминг, связаны с нерегулярной гиппокампальной активностью. Небольшие движения, такие как изменения позы или изолированное движение головой или конечностью, связаны с ритмической активностью тета-ритма уменьшенной амплитуды и сниженной средней частотой [23]. Результаты наших предыдущих исследований указывали на измененное поведение крыс при переживании ситуации угрозы жизни, возможно, усиление именно тета-ритма свидетельствует о формировании условно-рефлекторной реакции страха, обусловленной синхронизацией тета-активности в нейронах миндалины и гиппокампа, служащей для улучшения нейрональной связи во время извлечения памятного следа [24]. Однако в актуализации аффективной памяти страха участие тета-ритма маловероятно.

Наряду с изменением медленноволновой активности нами было зарегистрировано угнетение альфа- и бета-ритмов. Результаты нашего исследования выявили достоверное падение индекса альфа-ритма в правой лобной области и в обеих затылочных областях только через 2 ч после психотравмирующего события. В задних отделах полушария, как правило, ритм доминирует в норме в состоянии бодрствования. Угнетение альфа-ритма связывают с концентрацией внимания [25], а также участием в процессах избирательного торможения [26]. Вполне вероятно, что выявленное нами снижение активности альфа-ритма спустя двухчасовой интервал от момента переживания из-за гибели сородича от действий хищника, связано с консолидацией памяти, формированием памятного следа на психотравмирующее событие. Эти изменения могут затрагивать таламокортикальную систему, гиппокамп, ретикулярную формацию, обусловленные слуховыми и зрительными стимуляциями в момент нанесения психической травмы [27]. В некоторых исследованиях было установлено, что альфа-ритм подавляется при эмоциональных переживаниях [28], а смена его на дельта-ритм отражает развитие стрессовой реакции. В пользу утверждения о сильном эмоциональном переживании, страхе, ужасе свидетельствуют работы, показывающие подавление альфа-ритма при “страхе” и “горе” [29, 30].

Данные литературы показывают, что наиболее сильное увеличение мощности бета-ритма происходит при стрессе [31], в частности, при предъявлении больным объекта фобии происходит усиление бета-активности [32]. Однако результаты нашей работы обнаруживают противоположный эффект. Мы наблюдаем снижения бета-ритма в правой лобной и затылочной областях через 2 ч после стресса.

Преимущественные изменения ЭКоГ-показателей у самок крыс при витальном стрессе регистрировались в лобных и затылочных областях правого полушария, что отражает преобладание негативных эмоций при переживании ситуации угрозы жизни, поскольку именно правое полушарие вносит негативную окраску в эмоциональ-

ное восприятие окружающего мира [33]. В соответствии с взглядами Heller [34] можно предположить, что выявленная нами локализация фокуса изменений индекса ритмов в результате витального стресса в лобной области свидетельствует об активации системы реализации эмоциональных реакций на стресс, а изменения затылочной области является мобилизацией вегетативной нервной и гормональной (симпато-медуллярной) систем и вследствие этого реализацией последующей стратегии поведения (активной стратегии поведения) [35].

Важным аспектом работы, направленной на понимание механизмов возникновения ПТСР и других психических расстройств, является вопрос межполушарных взаимодействий. Ранее нами было показано, что выраженность поведенческих и электрофизиологических нарушений у крыс, переживших витальный стресс, в частности изменение пространственной организации ЭКоГ, зависит от межполушарной асимметрии [36]. Согласно литературным данным, при нейропсихологических нарушениях при ПТСР отмечается изменение асимметрии показателей альфа-ритма во фронтальной области коры [37]. Наши результаты согласуются с данными литературы, демонстрируя изменение асимметрии лобной коры по показателю индекса альфа-ритма, и отражают развитие патологических процессов в ЦНС при ПТСР.

В данной работе показано снижение межполушарной асимметрии по показателю индекса тета- и дельта-активности после витального стресса, которое мы связываем со снижением стрессоустойчивости организма к психотравмирующему воздействию, что подтверждается данными по выявлению степени асимметрии в результате влияния сильных или длительных раздражителей [38]. Напротив, данные, демонстрирующие усиление асимметрии индекса дельта-ритма в лобной области коры больших полушарий самок крыс в момент переживания ситуации захвата, удушения сородича хищником, связано, вероятно, с обеспечением реализации эмоционально-стрессовой реакции.

Таким образом, переживание ситуации угрозы жизни отражается в изменении ритмической структуры ЭКоГ, межполушарной асимметрии показателей индекса ритма в диапазоне альфа-, бета-, тета- и дельта-частот непосредственно при нанесении травмы и в раннем отдаленном периоде. Выраженный аверсивный характер витального стресса проявляется в повышенном уровне дельта-активности в затылочной области коры в момент переживания психотравмирующего события. По-видимому, наибольшее значение в последующем воспроизведении переживаемых обстоятельств гибели сородича играет дельта-активность, достоверные изменения которой регистрируются и в ранний посттравматический стрессовый период. Полученные данные позволяют установить вклад психоэмоционального переживания ситуации угрозы жизни в патогенез развития ПТСР и разработку методов коррекции данных состояний.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнялась в рамках государственного задания на фундаментальные научные исследования: шифр: 0557-19-008.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов, связанных с публикацией данной статьи, отсутствует.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (С.Г.Ц., Н.К.А.), проведение экспериментов и обработка материала (Н.К.А., Т.В.А.), написание статьи и подбор литературы (Т.В.А., Н.К.А.), редактирование и рецензирование рукописи (С.Г.Ц.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Никульчева НГ, Клюева НН, Парфёнова НС, Виноградова ТВ, Калашникова НМ, Белова ЕВ, Цикунов СГ* (2016) Исследование влияния психогенного стресса на липидный обмен крыс-самцов в отдаленном периоде. Нейрокомпьютеры: разработка, применение 5: 56–58. [*Nikulcheva NG, Kliueva NN, Parfenova NS, Vinogradova TV, Kalashnikova NM, Belova EV, TSikunov SG* (2016) Investigation of the effect of psychogenic stress on the lipid metabolism of male rats in the long-term period. Neurocomputers: development, application 5: 56–58. (In Russ)].
2. *Цикунов СГ, Пшеничная АГ, Клюева НН, Виноградова ТВ, Денисенко АД* (2016) Витальный стресс вызывает длительные расстройства поведения и обмена липидов у самок крыс. Обзоры по клин фармакол и лекарств терапии 14(4): 32–41. [*Tsikunov SG, Pshenichnaya AG, Klyueva NN, Vinogradova TV, Denisenko AD (*2016) Vital stress causes long-lasting behavioral disorders and lipid metabolism deviations in female rats. Rev Clin Pharmacol Drug Therapy 14(4): 32–41. (In Russ)].
https://doi.org/10.17816/RCF14432-41
3. *Bandelow B, Baldwin D, Abelli M, Bolea-Alamanac B, Bourin M, Chamberlain SR, Cinosi E, Davies S, Domschke K, Fineberg N, Grünblatt E, Jarema M, Kim Y-K, Maron E, Masdrakis V, Mikova O, Nutt D, Pallanti S, Pini S, Ströhle A, Thibaut F, Vaghi M, Won E, Wedekind D, Wichniak A, Woolley J, Zwanzger P, Riederer P* (2017) Biological markers for anxiety disorders, OCD and PTSD: A consensus statement. Part II: Neurochemistry, neurophysiology and neurocognition. World J Biol Psychiatry 18(3): 162–214.
https://doi.org/10.1080/15622975.2016.1190867
4. *Пашков АА, Дахтин ИС, Харисова НС* (2017*)* Электроэнцефалографические биомаркеры экспериментально индуцированного стресса. Вестник ЮУрГУ. Сер Психология 10(4): 68–82. [*Pashkov AA, Dahtin IS, Harisova NS* (2017) Electroencephalographic biomarkers of experimentally induced stress. Bull SUSU. Ser Psychology 10(4): 68–82. (In Russ)].
https://doi.org/10.14529/psy170407
5. *Сысоев ЮИ, Пьянкова ВА, Крошкина КА, Карев ВЕ, Оковитый СВ* (2020) Кросскорреляционный и когерентный анализ электрокортикограмм крыс, перенесших черепно-мозговую травму. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 106(3): 315–328. [*Sysoev JuI, P'jankova VA, Kroshkina KA, Karev VE, Okovityj SV* (2020) *(*Cross-correlation and coherent analysis of electrocorticograms of rats with traumatic brain injury. Russ J Physiol 106(3): 315–328. (In Russ)].
https://doi.org/10.31857/S0869813920030085
6. *Nedelcovych MT, Gould RW, Zhan X, Bubser M, Gong X, Grannan M, Thompson AT, Ivarsson M, Lindsley CW, Conn PJ, Jones CK* (2015) A rodent model of traumatic stress induces lasting sleep and quantitative electroencephalographic disturbances. ACS Chem Neurosci 6(3): 485–493.
https://doi.org/10.1021/cn500342u
7. *Цикунов СГ* (2015) Нейробиология витального стресса. Новые модели психической травмы и посттравматического стрессового расстройства. Обзоры по клин фармакол и лекарств терапии 13: 187–188. [*Tsikunov SG* (2015) Neurobiology of vital stress. New models of mental trauma and post-traumatic stress disorder. Rev Clin Pharmacol Drug Therapy 13: 187–188. (In Russ)].
8. *Paxinos G, Watsone C* (2006) The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 6th Edition. Elsevier AcadPress. Amsterdam, Boston. eBookISBN: 9780080475158
9. *Константинов КВ, Леонова МК, Мирошников ДБ, Клименко ВМ* (2014) Особенности восприятия акустического образа собственной биоэлектрической активности головного мозга. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 100(6): 710–721. [*Konstantinov KV, Leonova MK, Miroshnikov DB, Klimenko VM* (2014) Specifics of perception of acoustic image of intrinsic bioelectric brain activity. Russ J Physiol 100(6): 710–721. (In Russ)].
10. *Kirkpatrick HA, Heller GM* (2014) Post-Traumatic Stress Disorder: Theory and Treatment Update. Int J Psychiatry in Med 47(4): 337–346.
https://doi.org/10.2190/PM.47.4.h
11. *Lobo I, Portugal LC, Figueira I, Volchan E, David I, Garcia Pereira M, de Oliveira L* (2015) EEG correlates of the severity of posttraumatic stress symptoms: A systematic review of the dimensional PTSD literature. J Affect Disord 183: 210–220.
https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.05.015

12. *Шадрина ИВ, Дедова КН, Пугачёв АН* (2011) Нейрофизиологические особенности работы головного мозга (по результатам анализа показателей ЭЭГ) и их влияние на психологические характеристики у пациентов с посттравматическим стрессовым расстройством. Вестник ЮУрГУ. Серия: Образование, здравоохранение, физическая культура 7(224): 84–86. [*Shadrina IV, Dedova KN, Pugachjov AN* (2011) Neurophysiological features of the brain (based on the results of the analysis of EEG indicators) and their effect on psychological characteristics in patients with post-traumatic stress disorder. Bull SUSU. Series: Education, Health Care, Physical Education 7(224): 84–86. (In Russ)].
13. *Набиев РГ, Кондратьева ОГ, Шибкова ДЗ* (2015) Изменения функционального состояния центральной нервной системы при формировании посттравматического стрессового расстройства. Совр пробл науки и образов 3: 595–602. [*Nabiev RG, Kondrat'eva OG, Shibkova DZ,* (2015) Changes in the functional state of the central nervous system during the formation of post-traumatic stress disorder. Modern Problems Sci and Educat 3: 595–602. (In Russ)].
14. *Апраксина НК, Авалиани ТВ, Цикунов СГ* (2018) Динамика ЭКОГ – показателей самок крыс во время и после витального стресса. Обзоры по клин фармакол и лекарств терапии 16(1): 14–15. [*Apraksina NK, Avaliani TV, Cikunov SG* (2018) Dynamics of ECOG indicators of female rats during and after vital stress. Rev Clin Pharmacol Drug Therapy 16 (1): 14–15. (In Russ)].
15. *Gronfier C, Simon C, Piquard F, Ehrhart J, Brandenberger G* (1999) Neuroendocrine processes underlying ultradian sleep regulation in man. Clin Endocrinol Metab 84(8): 2686–2690. https://doi.org/10.1210/jcem.84.8.5893
16. *Knyazev GG* (2012) EEG delta oscillations as a correlate of basic homeostatic and motivational processes. Neurosci Biobehav Rev 36(1): 677–695. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.10.002
17. *Schutter D, van. Honk J* (2004) Decoupling of midfrontal delta–beta oscillations after testosterone administration. Int J Psychophysiol 53(1): 71–73. https://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2003.12.012
18. *Mitchell SJ, Ranck JB Jr* (1980) (Generation of theta rhythm in medial entorhinal cortex of freely moving rats. Brain Res 189: 49–66. https://doi.org/10.1016/0006-8993(80)90006-2
19. *Collins DR, Lang EJ, Pare D* (1999) Spontaneous activity of the perirhinal cortex in behaving cats. Neuroscience 89: 1025–1039. https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00396-0
20. *Kahana MJ, Seelig D, Madsen JR* (2001) Theta returns. Current Opinion Neurobiol 11(6): 739–744. https://doi.org/10.1016/S0959-4388(01)00278-1
21. *Buzsaki G* (2005) Theta rhythm of navigation: link between path integration and landmark navigation, episodic and semantic memory. Hippocampus 15(7): 827–840. https://doi.org/10.1002/hipo.20113
22. *Young CK, McNaughton N* (2009) Coupling of theta oscillations between anterior and posterior midline cortex and with the hippocampus in freely behaving rats. Cerebral Cortex 19(1): 24. https://doi.org/10.1093/cercor/bhn055
23. *Vanderwolf CH* (1969) Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 26(4): 407–418. https://doi.org/10.1016/0013-4694(69)90092-3
24. *Seidenbecher T, Laxmi TR, Stork O, Pape HC* (2003) Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval. Science 301: 846–850. https://doi.org/10.1126/science.1085818
25. *Babiloni C, Miniussib C, Babilonia F, Carduccia F, Cincottia F, Del Percioa C, Sirelloa G, Fracassib C, Nobred AC, Rossinib PM* (2004) Sub-second "temporal attention" modulates alpha rhythms. A high-resolution EEG study. Cognit Brain Res 19(3): 259–268. https://doi.org/10.1016/j.cogbrainres.2003.12.010
26. *Klimesch W, Sauseng P, Hanslmayr S* (2007) EEG alpha oscillations: the inhibition–timing hypothesis. Brain Res Rev 53(1): 63–68. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2006.06.003
27. *Гнездицкий ВВ, Куликова СН, Кошурникова ЕЕ* (2009) Особенности ЭЭГ и Р300 в оценке когнитивных нарушений. Функциональная диагностика. Неврология 3: 43–49. [*Gnezdickij VV., Kulikova SN, Koshurnikova EE* (2009) Features of EEG and P300 in the assessment of cognitive impairment. Functional diagnostics. Neurology 3: 43–49. (In Russ)].
28. *Спиридонова МД* (2013) Особенности спектров мощности ЭЭГ при переживании чувства страха. Молодой ученый 8: 130–132. [*Spiridonova MD* (2013) Features of EEG power spectra when experiencing a feeling of fear. Young Scientist 8: 130–132. (In Russ)].

29. *Лапин ИА, Алфимова МВ* (2014) ЭЭГ-маркеры депрессивных состояний. Социальная и клиническая психиатрия 24(4): 81–89. [*Lapin IA, Alfimova MV* (2014) EEG markers of depressive states. Social and Clin Psychiatry 24(4): 81–89. (In Russ)].
30. *Данько СГ, Бехтерева НП, Шемякина НВ, Антонова ЛВ* (2003) Электроэнцефалографические корреляты мысленного переживания эмоциональных личных и сценических ситуаций. Сообщение II. Характеристики пространственной синхронизации. Физиология человека 29(6): 685–693. [*Dan'ko SG, Behtereva NP, Shemjakina NV, Antonova LV* (2003) Electroencephalographic correlates of mental experience of emotional personal and stage situations. Message II. Characteristics of spatial synchronization. Human Physiology 29(6): 685–693. (In Russ)].
31. *Ильюченок ИР* (1996) Различия частотных характеристик ЭЭГ при восприятии положительно – эмоциональных, отрицательно-эмоциональных и нейтральных слов. Журн высш нервн деятельности 46 (3): 457–468. [*Il'juchenok IR* (1996) Differences in the frequency characteristics of the EEG in the perception of positive – emotional, negative-emotional and neutral words. J Higher Nerv Activity 46(3): 457–468. (In Russ)].
32. *Хомская ЕД, Батова НЯ* (1992) Мозг и эмоции (нейропсихологическое исследование). М. Изд-во МГУ. [*Homskaja ED, Batova NJa* (1992) Brain and Emotions (neuropsychological research). Moscow. MSU Publ House. (In Russ)].
33. *Aftanas LI, Reva NV, Varlamov AA, Pavlov SV, Makhnev VP* (2004) Analysis of evoked EEG synchronization and desynchronization in conditions of emotional activation in humans: temporal and topographic characteristics. Neurosci Behav Physiol 34(8): 859–867.
34. *Heller W* (1993) Neuropsychological mechanisms of individual differences in emotion, personality, and arousal. Neuropsychology 7(4): 476–489. https://doi.org/10.1037/0894-4105.7.4.476
35. *Середенин СБ, Кожедуб РГ, Свидерская НЕ, Королькова ТА, Кожечкин СН, Коштоянц ОХ* (2001) Особенности стресс-реакции у крыс с генетически детерминированной эмоциональностью (по показателям ЭЭГ). Журнал высш нервн деятельности 5: 617–624. [*Seredenin SB, KozhedubR.G., Sviderskaja NE, Korol'kova TA, Kozhechkin SN, Koshtojanc OH* (2001) Features of stress reaction in rats with genetically determined emotionality (according to EEG indicators). J Higher Nerv Activity 5: 617–624. (In Russ)].
36. *Авалиани ТВ, Константинов КВ, Быкова АВ, Апраксина НК, Цикунов СГ* (2014) Коррекция функционального состояния самок крыс методом ЭЭГ-зависимого акустического воздействия в модели витального стресса. Нейрокомпьютеры: разработка, применение 7: 5–10. [*Avaliani TV, Konstantinov KV, Bykova AV, Apraksina NK, Cikunov SG* (2014) Correction of the functional state of female rats by the method of EEG-dependent acoustic exposure in the model of vital stress. Neurocomputers: Development, Application 7: 5–10. (In Russ)].
37. *Maier SF, Watkins LR, Fleshner M* (1994) Psychoneuroimmunology: the interface between behaviour, brain and immunity. Am Psychologist 49(12): 1004–1017. https://doi.org/10.1037/%2F0003-066x.49.12.1004
38. *Русалова МН, Костюнина МБ* (2000) Отражение в межполушарном распределении частотно-амплитудных показателей ЭЭГ силы эмоционального переживания, величины потребности и вероятности ее удовлетворения. Физиология человека 26(1): 32–39. [*Rusalova MN, Kostjunina MB (2000)* Reflection in the interhemispheric distribution of frequency-amplitude EEG indicators of the strength of emotional experience, the magnitude of the need and the probability of its satisfaction. Human Physiology 26(1): 32–39. (In Russ)].

Change of Electrocorticographic Indicators of Rats in a Situation of a Real Threat to Life in the Model of Vital Stress

N. K. Apraksina[a], *, T. V. Avaliany[a], and S. G. Tsicunov[a]

[a] *Institute of Experimental Medicine, St.-Petersburg, Russia*

**e-mail: natalapraksina@mail.ru*

Using a model of vital stress, we studied the influence of a psycho-traumatic effect on the rhythmic structure of the electrocorticogram (ECoG) of the rat brain when experiencing the death of a partner from the predator actions. We have shown that the moment of experiencing a threat to life is accompanied by a significant increase in slow-wave activity in the delta-rhythm range, an increase in interhemispheric asymmetry according to ECoG indicators in the alpha and delta frequency range in the frontal region, and a

decrease in asymmetry in the theta range in the frontal part and delta rhythm in the occipital cortex of the hemispheres brain. The most pronounced changes in the bioelectrical activity of the brain in terms of the index of the rhythm in the alpha, beta, theta range and delta frequencies, as well as the change in asymmetry were revealed two hours after stress. A high level of the rhythm index in the range of delta activity persisted up to 3 days after the threat to life which testifies to the pronounced aversive nature of the traumatic effect and the important role of delta activity in reflecting the experienced circumstances of vital stress. Changes in the rhythmic structure of rats' ECG indicators immediately at the moment of a life-threatening situation can act as an objective indicator of the fear experienced during vital stress and indicate the initiation of the processes of the formation of post-traumatic stress disorder.

Keywords: vital stress, threattolife, ECoG, delta activity, rhythm index

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2021, том 107, № 12, с. 1568–1582

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ВРЕМЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЛОКАЛИЗАЦИИ ИСТОЧНИКА ЗВУКА, ДВИЖУЩЕГОСЯ ПО АЗИМУТУ, У ПАЦИЕНТОВ С ЛЕГКОЙ И УМЕРЕННОЙ СЕНСОНЕВРАЛЬНОЙ ТУГОУХОСТЬЮ

© 2021 г.
Е. А. Клишова[1], А. П. Гвоздева[1, *], Л. Е. Голованова[2], И. Г. Андреева[1]

[1]*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия*

[2]*Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия*

**E-mail: kukumalu@mail.ru*

Поступила в редакцию 17.09.2021 г.
После доработки 04.10.2021 г.
Принята к публикации 05.10.2021 г.

Работа посвящена изучению временных характеристик слуховой локализации движения у пациентов с сенсоневральной тугоухостью (СНТ). Выполнена оценка порогов по времени, необходимому для определения направления движения по азимуту (ПВА). В исследовании приняли участие 15 пациентов с легкой и 16 пациентов с умеренной СНТ. Иллюзию движения источника звука в свободном поле создавали противонаправленным изменением амплитуды последовательностей шумовых посылок (0.2–8 кГц) на двух динамических громкоговорителях, расположенных слева и справа от пациента под углами 30°. Для оценки ПВА применяли адаптивную психоакустическую процедуру “один вверх–один вниз” с двухальтернативным вынужденным выбором. Индивидуальные значения ПВА в обеих группах варьировали в пределах 0.1–1.2 с. Медианные значения ПВА составили 0.3 с при легкой СНТ и 0.4 с при умеренной СНТ, ПВА в группах достоверно не различались, однако в 3–4 раза превышали соответствующее значение в норме – 0.1 с. Линейный корреляционный анализ показал, что у пациентов с легкой СНТ увеличение ПАВ ассоциировалось с величиной потери слуха. В группе пациентов с умеренной СНТ была выявлена прямая связь повышения ПАВ с продолжительностью заболевания и асимметрией порогов слуха между левым и правым ухом, которая не превышала 9 дБ. Сопоставление ПАВ у пациентов с жалобами на ушной шум и без него показало, что этот симптом значимо влияет на ПАВ в группе с умеренной, но не с легкой СНТ. Полученные данные свидетельствуют о том, что ухудшение временных характеристик слуховой локализации движения при СНТ связано не столько с повышением порогов слуха, но может быть обусловлено уменьшением динамического диапазона слуха на высоких частотах и вовлечением центральных отделов слухового анализатора в патологический процесс вследствие их недостаточной афферентной стимуляции.

Ключевые слова: сенсоневральная тугоухость, пространственный слух, локализация движущегося источника звука, азимутальное движение, временные характеристики слуха

DOI: 10.31857/S0869813921120049

Нарушение способности ориентироваться в пространстве по слуху существенным образом влияет на поведение человека, меняя характеристики вертикальной

позы [1], походки [2], и, по-видимому, способность быстро реагировать на движение объектов окружающего мира. Наиболее распространенное социально-значимое нарушение слуха, при котором наблюдается ухудшение способности к ориентации по слуху – это пресбиакузис. Пресбиакузисом называют прогрессирующую необратимую двустороннюю и преимущественно симметричную сенсоневральную потерю слуха (сенсоневральную тугоухость, СНТ), которая возникает при старении организма и вызвана дегенерацией улитки или сопутствующих структур внутреннего уха, слуховых нервов, с возможным вовлечением структур центрального отдела слухового анализатора [3]. После 65-ти лет эти изменения наблюдаются у 30% людей, а после 75-ти лет – у каждого второго [4].

В настоящее время интенсивно исследуются вопросы, связанные с нарушением локализации звука при патологии слуха, и возможности компенсации этой функции при слухопротезировании [5, 6]. Согласно данным мировой литературы, по результатам обследования стандартными аудиологическими методами и установленному диагнозу определить степень утраты пространственного слуха не представляется возможным [7, 8]. На сегодняшний день разработано большое число экспериментальных методик и выполнены десятки исследований, в которых для пациентов с различными нарушениями слуха проведена оценка пространственной разрешающей способности слуха [8–10], точности локализации [11], бинаурального освобождения от маскировки и разборчивости речи при пространственном разделении источников целевого речевого сигнала и шума [12]. Однако такой важный для безопасности жизнедеятельности показатель пространственного слуха, как минимальное время звучания, необходимое для оценки направления движения источника, оказывается практически не изученным. Вместе с тем, данный показатель в значительной степени определяет возможность своевременно отреагировать на опасные движущиеся объекты.

При локализации по азимуту высокочастотный бинауральный механизм слуха оказывается минимально задействован в сравнении с низкочастотным бинауральным механизмом, т.к. пациент недослышивает высокочастотную часть спектра. В случае возрастной СНТ наряду с повышением (ухудшением) порогов слуха происходит изменение кодирования надпороговых сигналов, причем, преимущественно на высоких частотах [3]. Это означает, что и монауральный механизм локализации, основанный на оценке спектрального профиля сигнала (соотношении амплитуд разных составляющих спектра), при пресбиакузисе работает не так, как в норме. При пресбиакузисе с течением заболевания нередко возникают центральные нарушения слуха, которые приводят к ухудшению временнóго слухового анализа, что критично для локализации движущихся источников. Эти механизмы обеспечивают анализ изменений локализационных признаков, которые определяются динамическими параметрами звука при движении источника.

Таким образом, не менее трех различных причин могут вызывать изменения в восприятии движения источников звука и приводить к увеличению продолжительности его звучания, необходимой для определения направления движения. Поэтому величина данного показателя не может быть предсказана ни на основе стандартных аудиологических обследований, ни при использовании существующих экспериментальных методов локализации неподвижных источников звука. Изменение данного временного показателя при разной степени СНТ существенно с точки зрения понимания вклада каждого из перечисленных выше механизмов слухового анализа. Целью настоящей работы было определить время, необходимое для оценки направления движения в горизонтальной плоскости в группах пациентов с легкой и умеренной СНТ. Полученные результаты позволяют выполнить сравнительный анализ временных показателей по азимуту с соответствующими

показателями, полученными ранее для движения по радиальной координате (приближение–удаление).

В настоящей работе применялась модель движения источника звука в условиях свободного поля. Эта модель является более предпочтительной, чем применение передаточных функций для создания виртуальной акустической среды, поскольку имеет более высокую точность воспроизведения акустического пространства [13] и позволяет испытуемому совершать небольшие сканирующие движения головой, которые присутствуют в реальных условиях прослушивания и значительно улучшают показатели локализации [14]. Применение данной модели для оценки временных характеристик восприятия движения звуковых образов по азимутальной координате у испытуемых с нормальным слухом ранее показало результаты [13], близкие к соответствующим порогам для реальных источников звука [15]. Это позволило нам использовать данную модель для оценки показателей пространственного слуха у пациентов. При оценке времени, необходимого пациенту для определения направления движения источника по азимуту, была использована адаптивная психоакустическая процедура, подробно описанная в работе [13], т.к. она существенно сокращает время обследование, позволяет избежать утомления пациентов и провести оценку порогов в рамках врачебного приема.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В обследовании принял участие 31 взрослый пациент с диагностированной симметричной сенсоневральной тугоухостью. Пациенты были разделены на две группы по степени снижения слуха. В первую группу вошли 15 человек (3 мужчин, 12 женщин) с легкой СНТ по классификации ВОЗ – средний порог слуха на частотах 0.5, 1, 2 и 4 кГц для них находился в диапазоне от 25 до 40 дБ. Во второй группе было 16 пациентов (6 мужчин, 10 женщин) с умеренной СНТ, что соответствует среднему порогу слуха от 41 до 55 дБ. Информация о возрасте, продолжительности снижения слуха и средних слуховых порогах на четырех октавных частотах для левого и правого уха каждого пациента приведены в табл. 1 и 2. Разница в величине средних порогов слуха для левого и правого уха не превышала в группе с легкой СНТ 5 дБ, а в группе с умеренной СНТ – 9 дБ. Некоторые испытуемые страдали от ушного шума, такие случаи отмечены в таблицах. Все процедуры, выполненные в данном исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам Национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из пациентов было получено информированное добровольное согласие на участие в обследовании.

Обследование проводили в условиях врачебного кабинета объемом 51 м^3 на базе Сурдологического отделения Городского гериатрического медико-социального центра. Для снижения реверберации в помещении применяли звукопоглощающие панели, ковровое покрытие, а также плотные шторы. Характеристическое время реверберации (RT60), в течение которого уровень прерванного широкополосного звукового сигнала в помещении снижался на 60 дБ, составляло 460 мс. Акустические измерения выполняли с использованием комплекта калиброванного оборудования фирмы Bruel & Kjær (Дания), который включал микрофон 4145, предусилитель 2639 и усилитель 2606.

Звуковые сигналы, применявшиеся для моделирования движения источника звука в горизонтальной плоскости, представляли собой серии шумовых посылок трапециевидной формы в диапазоне частот 0.2–8.0 кГц. Длительность каждой посылки составляла 22 мс с учетом линейных фронтов нарастания и убывания амплитуды по 4 мс. Пауза между посылками равнялась 3 с. Длительность сигналов за-

Таблица 1. Индивидуальные данные пациентов из группы легкой СНТ

№ пациента	Возраст, лет	Продолжительность СНТ, лет	Порог слуха, дБ		|Δ|, дБ ***
			Слева	Справа	
1#	55	2	35	30	5
2	57	5	25	29	4
3#	59	2	38	39	1
4#	59	2	40	39	1
5#	59	10	30	33	3
6	62	2	40	35	5
7	65	1	34	38	4
8	66	5	29	28	1
9#	67	5	39	40	1
10#	73	2	40	40	0
11	73	5	40	40	0
12	79	2	26	30	4
13	79	2	29	26	3
14	80	1	34	38	4
15	83	1	30	30	0
Среднее	68 ± 9*	2**	34 ± 5	34 ± 5	3

Пациенты с ушным шумом в анамнезе;
* указано стандартное отклонение;
** для продолжительности СНТ приведено медианное значение;
*** абсолютное значение разности порогов для левого и правого уха (асимметрия слуха).

висела от количества посылок и могла составлять 0.075, 0.1, 0.2, ..., 1.5 с. Амплитуда посылок на протяжении звучания сигнала могла изменяться двумя способами: линейно увеличиваться на 10 дБ или уменьшаться на такую же величину. Генерация звуковых стимулов осуществлялась в режиме реального времени на ноутбуке HP ProBook 450 (Китай) с внешней звуковой картой Creative E-MU0202 (44100 Гц, 16 Бит; Сингапур). Аналоговый сигнал со звуковой карты поступал на усилитель мощности ONKYO A-9377 (Япония), а затем на два динамических коаксиальных громкоговорителя Morel SoundSpot SP-1 (Израиль).

Иллюзию движения источника звука по азимутальной координате создавали, применяя модель движения в свободном поле, основанную на эффекте предшествования [16]. Для этого пару громкоговорителей располагали симметрично слева и справа от пациента на уровне его головы на расстоянии 1 м таким образом, что их акустические оси были расположены под углом 90° к межушной оси пациента. Расстояние между громкоговорителями также составляло 1 м. Углы между сагиттальной осью пациента и прямыми, соединяющим центр его межушной оси с каждым из громкоговорителей, были равны 30°. Таким образом, пациент и два громкоговорителя находились в вершинах равностороннего треугольника с длиной стороны 1 м. Моделирование движения источника от центра вправо выполняли, повышая уровень звукового давления (УЗД) шумовых посылок в месте прослушивания от 50 до 60 дБ на правом громкоговорителе и одновременно снижая его от 50 до 40 дБ на левом. Иллюзия движения источника от центра влево создавалась сходным образом: при этом УЗД увеличивался от 50 до 60 дБ на левом громкоговорителе и уменьшался от 50 до 40 дБ на правом. Для моделирования движения к центру справа или слева УЗД посылок изменялся в противоположных направлениях. Та-

Таблица 2. Индивидуальные данные пациентов из группы умеренной СНТ

№ пациента	Возраст, лет	Продолжительность СНТ, лет	Порог слуха, дБ		|Δ|, дБ ***
			Слева	Справа	
1#	58	6	53	44	9
2	67	2	49	48	1
3	69	3	44	49	5
4	70	2	54	53	1
5	70	5	49	48	1
6#	72	1	49	48	1
7#	74	15	46	46	0
8	78	6	45	46	1
9	79	2	49	50	1
10	80	10	54	51	3
11#	82	5	39	48	9
12	82	10	50	53	3
13	83	10	51	54	3
14	83	5	45	44	1
15	83	2	49	49	0
16	85	2	53	53	0
Среднее	76 ± 8*	5**	49 ± 4	49 ± 3	2

Пациенты с ушным шумом в анамнезе;
* указано стандартное отклонение;
** для продолжительности СНТ приведено медианное значение;
*** абсолютное значение разности порогов для левого и правого уха (асимметрия слуха).

ким образом, различия УЗД, создаваемых громкоговорителями в начале и в конце звучания каждого стимула, составляли 0 и 20 дБ соответственно для движения из центра, и 20 и 0 дБ соответственно для движения к центру. Максимальный уровень звукового давления стимулов в месте прослушивания при их одновременном предъявлении с двух громкоговорителей составлял 60 ± 2 дБ. Для расчета начальной и конечной точки траектории движения применяли формулу из классической работы Bauer, связывающую взаимное расположение громкоговорителей и соотношение УЗД, создаваемых левым и правым динамиком в месте прослушивания, с воспринимаемым положением звукового образа [17]. Согласно расчету, начальные и конечные точки траектории движения звуковых образов, применяемых в нашей работе, находились на дуге окружности радиусом 1 м с центром в середине межушной оси слушателя, в положениях ± 24.1° и 0°. Звуковые образы, двигавшиеся от центра влево или вправо, начинали движение из положения 0° и заканчивали его в положениях –24.1° и +24.1° соответственно. При движении справа или слева к центру движение начиналось из положений +24.1° и –24.1° и заканчивалось в точке 0°. Следовательно, звуковые образы, применявшиеся в нашей работе, всегда двигались по дуге длиной 24.1°. Подробный расчет начальных и конечных точек траектории движения звуковых образов приведен в нашей предыдущей работе [18]. Поскольку длительность стимулов варьировала от 0.075 до 1.5 с при фиксированной длине траектории, скорость движения звуковых образов также различалась и составляла от 16 до 321°/с.

Во время исследования пациенты сидели в кресле с подлокотниками и подголовником и видели громкоговорители. Для ответов испытуемого использовали пульт с двумя крупными кнопками и регулятором типа “колесико”. Перед началом эксперимента определяли индивидуальный баланс уровней звука между громкоговорителями, который позволял сформировать у пациента неподвижный звуковой образ, расположенный в точке, соответствующей 0° азимута. Для этого пациенту с пары громкоговорителей предъявляли непрерывный шумовой сигнал, соответствующий по спектру стимулам, для которых впоследствии определяли порог по времени (0.2–8 кГц). Пациент самостоятельно выставлял баланс, используя регулятор на экспериментальном пульте так, чтобы громкость слева и справа была одинаковой. Шаг регулировки баланса составлял 0.5 дБ. Полученное значение баланса фиксировали и далее применяли в качестве исходного значения, относительно которого изменялась амплитуда стимулов. Такой подход давал возможность снизить влияние на результаты обследования асимметрии слуха менее 5 дБ, которую невозможно обнаружить, используя стандартную тональную пороговую аудиометрию. Перед началом эксперимента каждому пациенту предъявляли несколько стимулов, чтобы убедиться, что он их хорошо слышит.

Оценку порогов по времени для определения направления движения по азимуту (ПВА) выполняли при помощи адаптивной психоакустической методики “один вверх–один вниз”. Применимость этой методики для скрининговой оценки временной и пространственной разрешающей способности слуха в условиях клиники была доказана нами в статье [13]. Отметим, что в настоящей работе измерение порога выполняли до достижения пяти точек разворота – ситуаций, когда пациент давал неправильный ответ после правильного или правильный после неправильного. ПВА определяли как среднее значение длительности стимула в четырех последних точках разворота. При малом числе точек разворота порог, как правило, переоценивается, т.е. оказывается выше, чем при использовании большего числа точек разворота – способе предпочтительном для точной оценки порогов [19]. Применение методики “один вверх–один вниз” позволило скомпенсировать влияние малого количества точек разворота на величину определяемого порога.

ПВА оценивали отдельно в левой и в правой полуплоскостях, т.е. для каждого пациента были измерены два значения ПВА. Порядок измерения порогов был случайным: для одних пациентов первым оценивали порог в левой полуплоскости, для других – в правой. Процедура измерения ПВА была одинакова в обеих полуплоскостях и состояла в следующем. В начале пациенту предъявляли стимул длительностью 1.0 с, случайным образом выбирая направление его движения: от центра или к центру в соответствующей полуплоскости. Прослушав сигнал, пациент должен был ответить на вопрос: “вправо или влево движется источник звука?”, нажав на соответствующую кнопку на пульте. Если направление движения было определено правильно, то следующим предъявляли более короткий стимул, при неправильном ответе длительность стимула увеличивали. Затем процедуру повторяли для другой полуплоскости.

Статистическую обработку полученных данных выполняли с применением методов непараметрической статистики. Парный метод Вилкоксона использовали для сравнения значений ПВА в левой и правой полуплоскостях внутри групп пациентов. Критерий Манна–Уитни для независимых выборок применяли для оценки различий порогов между группами пациентов, в том числе для их сравнения с данными, полученными нами ранее для группы испытуемых с нормальным слухом и пациентов с умеренно-тяжелой СНТ. В случае сравнения более чем двух групп вносили поправку Бонферрони.

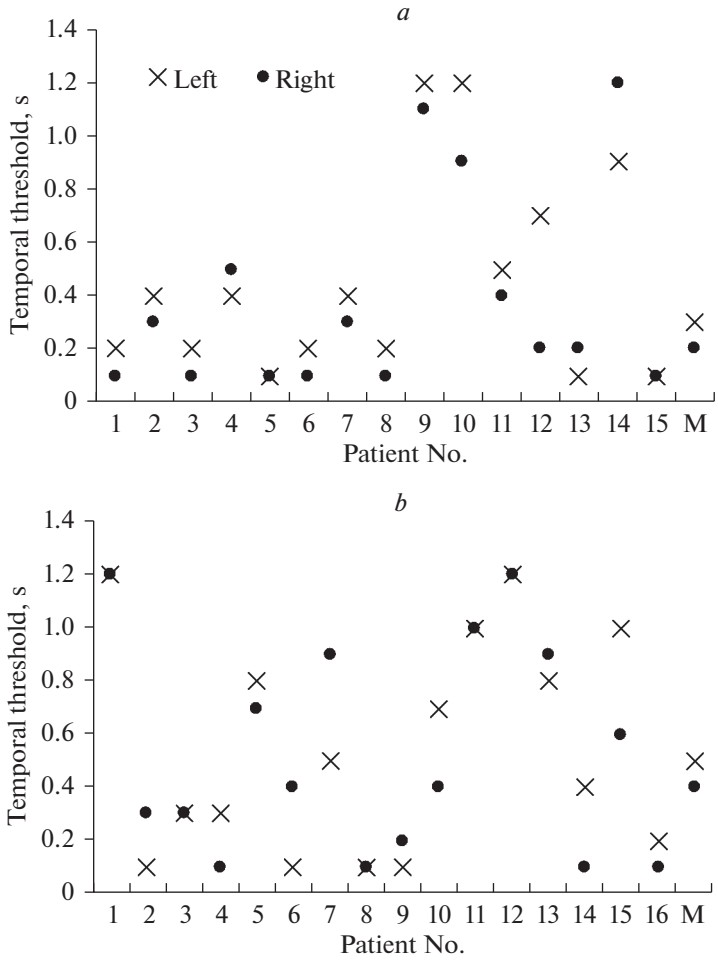


Рис. 1. Индивидуальные пороги по времени для оценки направления движения звукового образа по азимутальной координате пациентами с СНТ в левой и правой полуплоскостях. (*a*) – данные пациентов с легкой СНТ. (*b*) – данные пациентов с умеренной СНТ. На легенде приведены обозначения для порогов в левой и правой полуплоскости. Каждый маркер отражает результат однократного измерения порога адаптивным методом “один вверх–один вниз”. Буквой М обозначены медианные пороги по группе отдельно в левой и правой полуплоскостях.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

ПВА были определены в левой и правой полуплоскостях у пациентов с легкой и умеренной СНТ. Индивидуальные и медианные по группам значения этих порогов представлены на рис. 1. Обе группы характеризовались большим межиндивидуальным разбросом пороговых значений: минимальный ПВА составил 0.1 с, а максимальный – 1.2 с. Вместе с тем, у одного и того же пациента ПВА в левой и правой полуплоскостях не различались более чем на 0.3 с в большинстве случаев. Исключение составили три пациента из 31 обследованного. В группе с легкой степенью СНТ для пациента № 12 в левой и правой полуплоскостях ПВА составил 0.7 и 0.2 с соответственно, разница порогов была равна 0.5 с. В группе с умеренной СНТ двое

пациентов №№ 7 и 15 показали разницу в ПВА для левой и правой полуплоскостей 0.4 с.

Медианные значения порогов в левой и правой полуплоскостях составили 0.3 и 0.2 с для пациентов с легкой СНТ, и 0.5 и 0.4 с для пациентов с умеренной СНТ соответственно (рис. 1). Сравнение величин ПВА в левой и правой полуплоскостях при помощи непараметрического парного критерия Вилкоксона не выявило между ними достоверных различий для обеих групп пациентов ($p = 0.11$, N-ties = 13 для группы с легкой СНТ; $p = 0.75$, N-ties = 11 для группы с умеренной СНТ). В связи с этим медианные значения порогов в обеих группах были рассчитаны по индивидуальным данным, полученным в обеих полуплоскостях. В группах с легкой и умеренной СНТ они составили 0.3 и 0.4 с соответственно. Различия между ними оказались статистически не достоверны ($p = 0.24$, $n_1 = 32$, $n_2 = 32$, непараметрический тест Манна–Уитни для независимых выборок).

Для определения влияния возраста, потери слуха и продолжительности СНТ пациентов на величину ПВА для обеих групп был выполнен линейный корреляционный анализ (рис. 2). Анализ показал, что у пациентов с легкой СНТ существует прямая средней силы связь между величинами средней потери слуха и ПВА ($R = 0.47$ и 0.51 для левой и правой полуплоскостей соответственно) (рис. 2*c*). Таким образом, увеличение порогов слуха сопровождалось в данной группе пациентов с повышением ПВА. В меньшей степени в группе с легкой СНТ была выражена связь ПВА с возрастом испытуемых: $R = 0.28$ и 0.29 для левой и правой полуплоскостей соответственно – эти значения свидетельствовали о слабой взаимосвязи данных показателей (рис. 2*a*).

Коэффициенты корреляции между продолжительностью СНТ и ПВА при легкой СНТ были близки к нулю, что указывало на отсутствие значимой связи между ними (рис. 2*e*). Таким образом, в группе с легкой СНТ повышение порогов по времени ассоциировалось в основном с двумя параметрами – величиной потери слуха и, в меньшей степени, с возрастом испытуемых. Продолжительность СНТ мало влияла на ПВА у этой группы пациентов. Для пациентов с умеренной СНТ наблюдали противоположную картину: у них была обнаружена прямая связь средней силы между продолжительностью СНТ ($R = 0.42$ и 0.56 для левой и правой полуплоскостей соответственно), однако у данной группы практически отсутствовали связи возраста и среднего порога слуха с порогом по времени, о чем свидетельствовали коэффициенты корреляции близкие к нулю (рис. 2*b* и 2*d*). Таким образом, в отличие от группы с легкой степенью СНТ, у пациентов с умеренной СНТ связь порогов по времени наблюдалась не с возрастом и средней потерей слуха, а с продолжительностью СНТ. Сводные данные о значениях коэффициентов корреляции между индивидуальными характеристиками пациентов и величиной порога по времени приведены в табл. 3.

Группы были подобраны таким образом, чтобы потеря слуха на обоих ушах у каждого из пациентов соответствовала одинаковой степени СНТ по классификации ВОЗ. Однако при оценке латерализации источника звука разница в величине порога слышимости 5 дБ и более может быть существенной [8] и приводить к субъективному сокращению воспринимаемой траектории движения. Нами была оценена связь между ПВА и разницей в средних порогах для левого и правого уха в обеих группах пациентов (табл. 1, 2). Связь между асимметрией порогов слуха и ПВА в группе пациентов с легкой степенью СНТ была слабо выражена ($R = -0.21$ и -0.20) (рис. 2). В этой группе различия в порогах слуха на левом и правом ухе не превышали 5 дБ. Для пациентов с умеренной СНТ была выявлена прямая связь средней силы ($R = 0.57$ и 0.57) между асимметрией порогов слуха и порогами по времени (рис. 2*f* и 2*h*). Вместе с тем, при исключении из этой группы двух пациентов, у которых разница в порогах слуха для левого и правого уха превышала 5 дБ

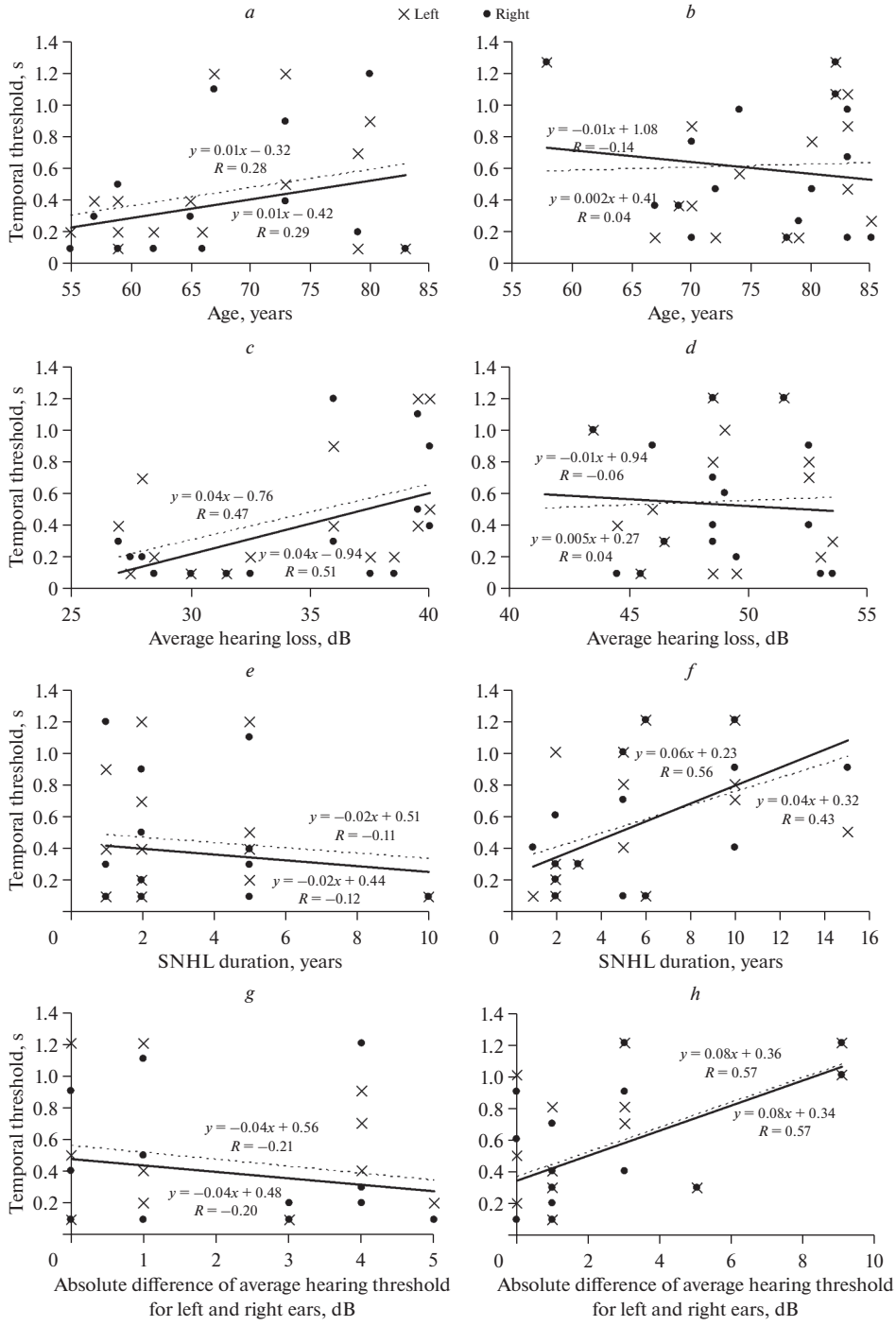

a
× Left
● Right
Temporal threshold, s
y = 0.01x – 0.32
R = 0.28
y = 0.01x – 0.42
R = 0.29
Age, years
b
y = –0.01x + 1.08
R = –0.14
y = 0.002x + 0.41
R = 0.04
Age, years
c
y = 0.04x – 0.76
R = 0.47
y = 0.04x – 0.94
R = 0.51
Average hearing loss, dB
d
y = –0.01x + 0.94
R = –0.06
y = 0.005x + 0.27
R = 0.04
Average hearing loss, dB
e
y = –0.02x + 0.51
R = –0.11
y = –0.02x + 0.44
R = –0.12
SNHL duration, years
f
y = 0.06x + 0.23
R = 0.56
y = 0.04x + 0.32
R = 0.43
SNHL duration, years
g
y = –0.04x + 0.56
R = –0.21
y = –0.04x + 0.48
R = –0.20
Absolute difference of average hearing threshold for left and right ears, dB
h
y = 0.08x + 0.36
R = 0.57
y = 0.08x + 0.34
R = 0.57
Absolute difference of average hearing threshold for left and right ears, dB

Рис. 2. Индивидуальные пороги по времени для оценки направления движения звукового образа по азимутальной координате у пациентов с легкой (слева) и умеренной СНТ (справа). Зависимость от: (*a*), (*b*) – возраста пациентов; (*c*), (*d*) – средней потери слуха; (*e*), (*f*) – продолжительности СНТ; (*g*), (*h*) – абсолютного значения разности порогов для левого и правого уха (асимметрии слуха). На легенде приведены обозначения для порогов в левой и правой полуплоскостей. Каждый маркер демонстрирует результат однократного измерения порога адаптивным методом “один вверх–один вниз” у одного испытуемого. Пунктирная прямая отражает линейную аппроксимацию данных для левой полуплоскости, а непрерывная прямая – линейную аппроксимацию для правой полуплоскости. Приведены соответствующие уравнения и значения коэффициентов корреляции.

(по 9 дБ для обоих испытуемых), связь между асимметрией порогов слуха и порогов по времени, как и в группе с легкой СНТ, ослабевала ($R = 0.23$ и $R = 0.21$). Это указывает на слабое влияние небольшой (до 5 дБ) асимметрии порогов слуха на ПВА у пациентов обеих групп.

Ушной шум (tinnitus) был выявлен у 10 человек в двух обследуемых группах, что составило почти треть общего числа пациентов. Локализация источника на фоне шума, как правило, приводит к худшим результатам, чем при его отсутствии, поэтому было выполнено сопоставление результатов оценки ПВА для пациентов с шумом и без него в каждой из обследованных групп (рис. 3). Медианные значения порогов по времени в группе с легкой СНТ достоверно не различались у пациентов без ушного шума и с ушным шумом: они составили 0.25 и 0.30 с соответственно ($p = 0.63$, $n_1 = 18$, $n_2 = 12$, непараметрический критерий Манна–Уитни для независимых выборок). В группе с умеренной СНТ ПВА увеличивался более чем в три раза при наличии ушного шума ($p < 0.05$, $n_1 = 24$, $n_2 = 8$, непараметрический критерий Манна–Уитни для независимых выборок). У пациентов без ушного шума медианный порог по времени составил 0.3 с, тогда как у пациентов с ушным шумом он равнялся 1.0 с. Таким образом, наличие ушного шума оказывало значимое негативное влияние на величину порога по времени у пациентов с умеренной, но не с легкой СНТ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При легкой и средней степени СНТ диапазон, в котором варьировали индивидуальные значения ПВА, оказался одинаковым и составлял от 0.1 до 1.2 с. Причем, по 7 пациентов в каждой из групп при оценке направления движения хотя бы в одной из полуплоскостей имели величину порога 0.1 с, что соответствует среднему

Таблица 3. Значения коэффициентов линейной корреляции (R) между индивидуальными характеристиками пациентов и величиной порогов по времени для оценки направления движения звукового образа по азимутальной координате при легкой и умеренной СНТ

Характеристика пациентов	Легкая СНТ		Умеренная СНТ	
	слева	справа	слева	справа
Возраст	0.28	0.29	0.04	–0.14
Средняя потеря слуха	**0.47**	**0.51**	0.04	–0.06
Продолжительность СНТ	–0.11	–0.12	**0.43**	**0.56**
Абсолютное значение разницы порогов слуха на левом и правом ухе (асимметрия слуха)	–0.21	–0.20	**0.57**	**0.57**

Жирным шрифтом выделены значения коэффициентов корреляции, свидетельствующие о наличии средней силы связи между данной характеристикой пациентов и порогом по времени.

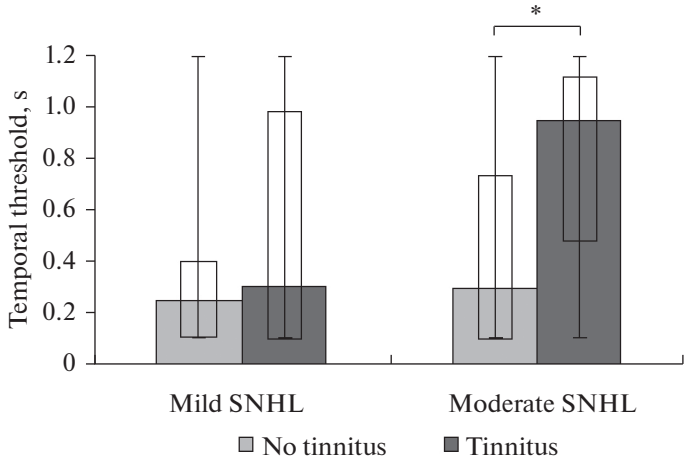


Рис. 3. Пороги по времени, необходимому для оценки направления движения звукового образа по азимуту, у пациентов, имеющих в анамнезе ушной шум, и без ушного шума. Результаты приведены отдельно для групп пациентов с легкой и умеренной СНТ. Указаны медианы, межквартильные интервалы (Q1–Q3), а также минимальные и максимальные значения. Показаны достоверные различия порогов по времени между пациентами без ушного шума и с ушным шумом внутри групп с умеренной СНТ: * – $p < 0.05$, непараметрический парный тест Вилкоксона. Для группы с легкой СНТ: $n_1 = 18$, $n_2 = 12$; для группы с умеренной СНТ: $n_1 = 24$, $n_2 = 8$.

значению, полученному при норме слуха [18]. Это означает, что сама по себе потеря слуха на высоких частотах при легкой и средней степени СНТ не обязательно приводит к ухудшению ПВА. В пользу этого свидетельствует и тот факт, что при снижении в широкополосном сигнале доли высоких частот в соответствии с типичной потерей слуха при умеренной СНТ у нормально слышащих испытуемых ПВА не изменялся [20].

Как было отмечено выше, увеличение ПВА при симметричной СНТ может быть вызвано другими причинами – нарушением надпорогового кодирования интенсивности и/или ухудшением слухового временного анализа. Надпороговое кодирование интенсивности изменяется как следствие сужения динамического диапазона слуха при повышении порогов слышимости и будет более выраженным с увеличением потери слуха. При потере слуха до 35 дБ у пациентов не наблюдали случаев, при которых ПВА превышали бы 0.7 с, преимущественно пороги составляли 0.1–0.2 с. При большей потере слуха ПВА могли возрастать до 1.2 с. В группе с легкой степенью СНТ была выявлена связь потери слуха с величиной ПВА (рис. 2*c*). Вместе с тем даже при потере слуха около 50 дБ ПВА мог практически оставаться в норме или незначительно ее превышать. Таким образом, можно полагать, что нарушение надпорогового кодирования не влияет критическим образом на оценку динамических изменений межушных различий по интенсивности.

Сравнение измеренных ПВА с аналогичным образом измеренными порогами для радиального движения (ПВР), полученными при определении пациентами с симметричной потерей слуха приближается или удаляется звуковой образ, показало, что диапазоны изменений порогов по разным координатам акустического пространства и их медианы близки по величине для каждой из степеней СНТ (рис. 4). При разных степенях СНТ пороги различались, причем для обеих координат наблюдалось возрастание медианной величины порога с увеличением степени поте-

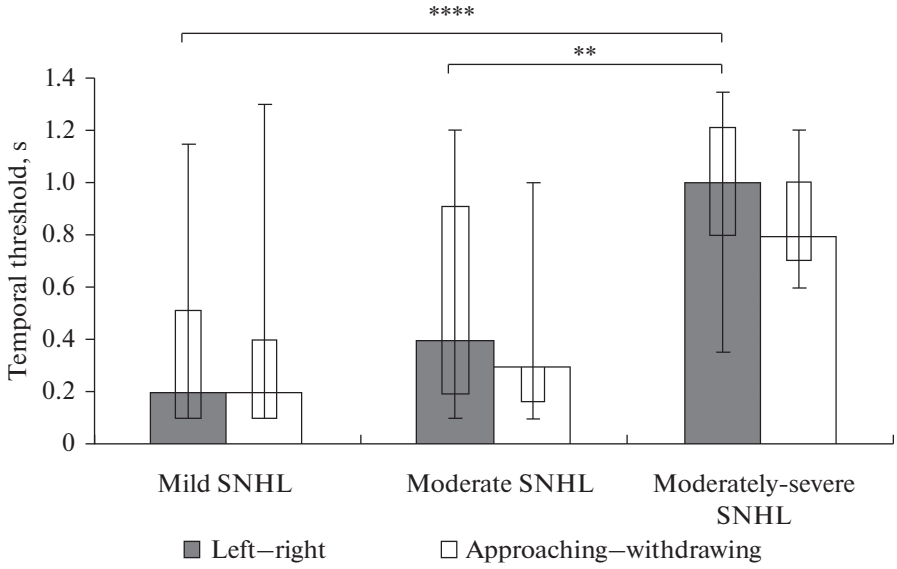


Рис. 4. Пороги по времени для оценки направления движения звукового образа по азимутальной и радиальной координатам у пациентов с легкой, умеренной и умеренно-тяжелой СНТ. Указаны медианы, межквартильные интервалы (Q1–Q3), а также минимальные и максимальные значения. Показаны достоверные различия порогов по времени при оценке направления движения по азимутальной координате между группами с разной потерей слуха: ** – $p < 0.01$, **** – $p < 0.0001$, непараметричесий критерий Манна–Уитни для независимых выборок, внесена поправка Бонферрони. Пороги для оценки направления движения по радиальной координате и по азимутальной координате у пациентов с умеренно-тяжелой СНТ приведены по данным наших предыдущих работ: ПВА при умеренно-тяжелой СНТ [18]; пороги по времени для оценки направления движения звукового образа по радиальной координате при легкой [13], умеренной и умеренно-тяжелой СНТ [24]. Для азимутального движения: $n = 31$, $n = 32$ и $n = 24$; для радиального движения: $n = 16$, $n = 21$, $n = 3$ в группах с легкой, умеренной и умеренно-тяжелой СНТ соответственно.

ри слуха. Известно, что для локализации по азимуту бинауральные различия являются определяющими, тогда как основным признаком при оценке удаленности источника звука оказывается изменение уровня интенсивности сигнала с расстоянием [21]. Несмотря на существенные различия в механизмах локализации, пороги для каждой из групп пациентов оказались близкими и демонстрировали высокую вариабельность при всех степенях потери слуха. Это обстоятельство указывает на то, что для быстрой оценки направления движущегося источника звука существует важный фактор, который не связан непосредственно с величиной потери слуха. В качестве такого фактора может выступать нарушение временного слухового анализа, которое возникает как проявление центральных нарушений слуха.

Центральные нарушения слуха могут наблюдаться при СНТ и чаще возникают при большой потере слуха и/или при значительной продолжительности заболевания [22, 23]. Поэтому мы рассмотрели связь ПВА с обоими факторами. Существенный рост ПВА наблюдали у пациентов с потерей слуха более 35 дБ. У пациентов с умеренной СНТ была обнаружена прямая связь средней силы между продолжительностью СНТ и величиной ПВА, что косвенно указывает на центральные нару-

шения слуха как на возможную причину, по которой снижается скорость оценки движения источника звука.

Выяснить роль нарушения временного слухового анализа, возникающего при центральных нарушениях слуха, в оценке движения по азимуту у пациентов с СНТ можно было бы, применив батареи тестов, которые используют для выявления таких нарушений [22]. Однако это является предметом для дальнейших исследований.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания (тема № АААА-А18-118013090245-6).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Планирование экспериментов (И.А.Г., А.П.Г., Л.Е.Г.), акустические измерения и методическое сопровождение работы (А.П.Г.), организация и выполнение обследований в условиях клиники (Е.А.К., Л.Е.Г.), обработка и статистический анализ данных, подготовка иллюстративного материала (А.П.Г.), написание и редактирование манускрипта (И.А.Г., А.П.Г., Л.Е.Г., Е.А.К.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *de Almeida Ciquinato DS, Doi MY, da Silva RA, de Oliveira MR, de Oliveira Gil AW, de Moraes Marchiori LL* (2020) Posturographic analysis in the elderly with and without sensorineural hearing loss. Int Arch Otorhinolaryngol 24: e496-e502. https://doi.org/10.1055/s-0040-1701271
2. *de Souza Melo R* (2017) Gait performance of children and adolescents with sensorineural hearing loss. Gait & Posture 57: 109–114. https://doi.org/10.1016/j.gaitpost.2017.05.031
3. *Gates GA* (2012) Central Presbycusis. Otolaryngol Head Neck Surg 147: 1–2. https://doi.org/10.1177/0194599812446282
4. Cheslock M, De Jesus O (2021) Presbycusis. Stat Pearls [Internet]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559220
5. *Meuret S, Ludwig AA, Predel D, Staske B, Fuchs M* (2017) Localization and spatial discrimination in children and adolescents with moderate sensorineural hearing loss tested without their hearing aids. Audiol Neurotol 22: 326–342. https://doi.org/10.1159/000485826
6. *Denk F, Ewert SD, Kollmeier B* (2019) On the limitations of sound localization with hearing devices. J Acoust Soc Am 146: 1732–1744. https://doi.org/10.1121/1.5126521
7. *Akeroyd MA* (2014) An overview of the major phenomena of the localization of sound sources by normal-hearing, hearing-impaired, and aided listeners. Trends Hear 18: 1–7. https://doi.org/10.1177/2331216514560442
8. *Middlebrooks JC* (2015) Sound localization. Handbook Clin Neurol 129: 99–116.
9. *Freigang C, Schmiedchen K, Nitsche I, Rübsamen R* (2014) Free field study on auditory localization and discrimination performance in older adults. Exp Brain Res. 232: 1157–1172.
10. *Lundbeck M, Grimm G, Hohmann V, Laugesen S, Neher T* (2017) Sensitivity to angular and radial source movements as a function of acoustic complexity in normal and impaired hearing. Trends Hear 21: 2331216517717152. https://doi.org/10.1177/2331216517717152
11. *Noble W, Byrne D, Lepage B* (1994) Effects on sound localization of configuration and type of hearing impairment. J Acoust Soc Am 95: 992–1005.
12. *Neher T, Lunner T, Hopkins K, Moore BC* (2012) Binaural temporal fine structure sensitivity, cognitive function, and spatial speech recognition of hearing-impaired listeners. J Acoust Soc Am 131: 2561–2564. https://doi.org/10.1121/1.3689850

13. *Гвоздева АП, Ситдиков ВМ, Андреева ИГ* (2020) Скрининговый метод оценки пространственной и временной разрешающей способности слуха при локализации движения по азимутальной координате. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 106: 1170–1188. [*Gvozdeva AP, Sitdikov VM, Andreeva IG* (2020) A screening method for assessment of spatial and temporal resolution of the auditory system in case of azimuthal movement localization. Russ J Physiol 106: 1170–1188. (In Russ)].
https://doi.org/10.31857/S0869813920090113
14. *Thurlow WR, Runge PS* (1967) Effect of induced head movements on localization of direction of sounds. J Acoust Soc Am 42: 480–488.
15. *Harris JD, Sergeant RL* (1971) Monaural/binaural minimum audible angle for a moving sound source. J Speech Hear Res 14: 618–629.
16. *Grantham DW* (1986) Detection and discrimination of simulated motion of auditory targets in the horizontal plane. J Acoust Soc Am 79: 1939–1949.
https://doi.org/10.1121/1.393201
17. *Bauer BB* (1961) Phasor analysis of some stereophonic phenomena. J Acoust Soc Am 33: 1536–1539.
18. *Gvozdeva AP, Klishova EA, Sitdikov VM, Golovanova LE, Andreeva IG* (2021) Minimal time to determine direction of azimuthally moving sounds in moderately severe sensorineural hearing loss. POMA 43: 050003. Acoustical Soc America.
https://doi.org/10.1121/2.0001451
19. *Witton C, Talcott JB, Henning GB* (2017) Psychophysical measurements in children: challenges, pitfalls, and considerations. Peer J 5: e3231.
https://doi.org/10.31857/S0869813920090113
20. *Андреева ИГ, Гвоздева АП, Огородникова ЕА* (2018) Пороговая длительность звуковых сигналов для оценки приближения и удаления их источника при моделировании снижения высокочастотного слуха. Сенс сист 32: 277–284. [*Andreeva IG, Gvozdeva AP, Ogorodnikova EA* (2018) Threshold duration of audio signals for assessment of the proximity and leaving of their source in modeling of the decreasein high-frequency hearing. Sens Sist 32: 277–284. (In Russ)].
https://doi.org/10.1134/S0235009218040029
21. *Kolarik AJ, Moore BC, Zahorik P, Cirstea S, Pardhan S* (2016) Auditory distance perception in humans: A review of cues, development, neuronal bases, and effects of sensory loss. Atten Percept Psychophys 78: 373.
https://doi.org/10.3758/s13414-015-1015-1
22. *Musiek FE, Chermak GD* (2014) Handbook of Central Auditory Processing Disorder 1: Auditory Neuroscience and Diagnosis. San Diego. Plural. 2nd ed.
23. *Бобошко МЮ, Гарбарук ЕС, Жилинская ЕВ, Абу-Джамеа АХ* (2014) Временная разрешающая способность слуховой системы при сенсоневральной тугоухости. Сенс Сист 28: 10–15. [Boboshko MYu, Garbaruk ES, Zhilinskaya EV, Abu-Dzhamea A Kh (2014) Temporal resolution of the auditory system in sensorineural hearing loss. Sens Sist 28: 10–15. (In Russ)].
24. *Andreeva IG, Klishova EA, Gvozdeva AP, Sitdikov VM, Golovanova LE, Ogorodnikova EA* (2020) Comparative assessment of spatial and temporal resolutions in the localization of an approaching and receding broadband noise source in healthy subjects and patients with first-degree symmetric sensorineural hearing loss. Hum Physiol 46: 465–472.

Temporal Characteristics of Azimuthally Moving Sound Source Localization in Patients with Mild and Moderate Sensorineural Hearing Loss

E. A. Klishova[a], A. P. Gvozdeva[a, *], L. E. Golovanova[b], and I. G. Andreeva[a]

[a] *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

[b] *Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russia*

**e-mail: kukumalu@mail.ru*

The work is devoted to investigation of auditory motion localization in patients with sensorineural hearing loss (SNHL). Minimal time to determine direction of azimuthal motion (MTAM) was determined for 15 patients with mild SNHL and 16 patients with moderate SNHL. An illusion of the sound source motion in free field was created by counterdirectional change of the amplitude of sound bursts sequences (0.2–8 kHz) at two loudspeakers placed to the left and to the right of the patient by 30º angles. To determine MTAM "one up–one down" adaptive psychoacoustic procedure was implemented with the use of two-alternative forced choice. Individual MTAMs in both groups varied from 0.1 to 1.2 s. Median MTAMs were 0.3 s for mild SNHL and 0.4 s for moderate

SNHL. The values were not significantly different from each other, however they were 3–4 times higher than in normally hearing subjects – 0.1 s. Linear correlational analysis showed that in patients with mild SNHL there was direct relationship between MTAM increase and hearing loss. In patients with moderate SNHL direct linear relationship was found between MTAM and duration of the disease, and hearing thresholds asymmetry, which did not exceed 9 dB. Comparison of MTAMs for patients with and without tinnitus revealed that the symptom significantly affects MTAM in moderate, but not mild SNHL. The data obtained evidence that worsening of auditory motion localization temporal characteristics in SNHL is associated not so much with hearing loss but with decreasing dynamic range of hearing at high frequencies and involvement of central auditory system into pathological process due to its insufficient afferent stimulation.

Keywords: sensorineural hearing loss, spatial hearing, moving sound source localization, azimuthal motion, temporal characteristics of hearing

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2021, том 107, № 12, с. 1583–1596

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

РОЛЬ КАЛИЕВЫХ ТОКОВ В ФОРМИРОВАНИИ ФАЗЫ СЛЕДОВОЙ ГИПЕРПОЛЯРИЗАЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ ДЕЙСТВИЯ ВЕНТРИКУЛЯРНЫХ КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫСЫ В НОРМЕ И ПРИ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

© 2021 г.
И. В. Кубасов[1], А. В. Степанов[1], А. А. Панов[1], О. В. Чистякова[1], И. Б. Сухов[1], М. Г. Добрецов[1, *]

[1]*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия*

**E-mail: dobretsovmaxim@gmail.com*

Поступила в редакцию 24.09.2021 г.
После доработки 05.10.2021 г.
Принята к публикации 07.10.2021 г.

Роль Ca^{2+}-зависимых калиевых каналов низкой проводимости (SK-каналы) в патогенезе диабетической кардиомиопатии остается малоизученной. В наших исследованиях в крысиной модели стрептозотоцин-вызванного сахарного диабета 1 типа (СТЗ-СД1) было продемонстрировано существенное по сравнению с контролем увеличение фракции внеклеточных потенциалов действия (вПД) эпикардиальных миоцитов левого желудочка сердца, характеризующихся выраженной фазой следовой гиперполяризации ($вПД_{СГ}$). В экспериментах с локальной доставкой в зону регистрации $вПД_{СГ}$ блокаторов различных K^+-каналов только доставка селективного блокатора SK-каналов апамина в концентрации 500 нМ сопровождалась подавлением фазы следовой гиперполяризации $вПД_{СГ}$. Полученные данные предполагают, что фаза следовой гиперполяризации вПД связана с активностью SK-каналов и что развитие СТЗ-СД1 ведет к увеличению экспрессии и/или активности этих каналов эпикардиальными кардиомиоцитами левого желудочка сердца крыс.

Ключевые слова: кардиомиоцит, сахарный диабет 1-го типа, диабетическая кардиомиопатия, внеклеточный потенциал действия, калиевые каналы

DOI: 10.31857/S0869813921120062

Ранее, в ряде исследований с использованием метода регистрации потенциалов действия (ПД) с использованием внеклеточных микроэлектродов с диаметром кончика 2–5 мкм (loose patch метод) были выявлены существенные различия в характере генерации ПД и ионных токов на поверхностной мембране и в t-трубочках изолированных скелетных мышц [1] и кардиомиоцитов в составе изолированного сердца [2]. Согласно этим данным, внеклеточно регистрируемые ПД (вПД) миоцитов с помощью пипетки с узким кончиком представляют собой полиморфный сигнал, форма которого определяется активностью электрогенных механизмов (ионных каналов и транспортеров), локализованных на плазматической мембране миоцита непосредственно под кончиком регистрирующего электрода. Стандартный вПД желудочкового кардиомиоцита представляет собой волну, характеризующуюся одним (вПД1) или двумя (вПД2) выраженными негативными пиками. Имеющиеся данные [2] позволяют говорить, что вПД1 и первый негативный пик в соста-

ве вПД2 формируются в результате активации потенциал-зависимых натриевых каналов поверхностной мембраны клетки. Наличие второго негативного пика в волне вПД2 сигнала отражает активность Ca^{2+}-каналов входящего тока, локализованных в Т-системе кардиомиоцита (система регулярных инвагинаций/впячиваний плазматической мембраны внутрь клетки или t-трубочек), и свидетельствует о наличии одного или нескольких устьев t-трубочек на поверхности клетки непосредственно в зоне под кончиком регистрирующего внеклеточного электрода. В согласии с этим, большинство вПД, регистрируемых с помощью пипетки с узким кончиком (наружный диаметр 5 мкм) от кардиомиоцитов желудочков (высокая плотность t-трубочек) и предсердий (низкая плотность t-трубочек) сердец нормальных крыс относится, соответственно, к категории вПД2 и вПД1 сигналов [3]. Ожидаемо, что вПД1 существенно короче, чем вПД2, однако спад, отражающий инактивацию натриевых и Ca^{2+}-каналов и активацию токов выходящего направления (в основном калиевых), обыкновенно представлял собой относительно монотонный процесс снижения потенциала к базовому уровню. Тем не менее, встречались вПД1сг и вПД2сг, которые имели более сложную форму, завершаясь выраженной фазой следовой гиперполяризации (СГ). В норме регистрации вПДсг были редки (не более 7% от всех регистраций в левом желудочке сердца крысы). Однако наши предварительные данные [4] показали, что в левых желудочках сердец крыс с экспериментально вызванным диабетом 1-го типа СГ сопутствует большинству регистрируемых вПД. Эти последние наблюдения поставили вопрос о выяснении ионной природы фазы СГ и проведении более детального анализа профилей вПД, регистрируемых от левых желудочков сердец нормальных и диабетических крыс. При рассмотрении вопроса о природе СГ было учтено, что эта фаза завершает вПДсг, когда в кардиомиоцитах желудочков сердца крысы активны два основных типа K^+-каналов: потенциал-зависимые каналы сверхмедленного (quasi-steady-state, Iss) тока и каналы тока обратного выпрямления (IK1) [5–9]. Активация и/или изменения в экспрессии соответствующих каналов может быть существенным фактором, определяющим параметры реполяризации кардиомиоцитов при сердечной патологии [10], в том числе диабетической кардиомиопатии [8, 11].Это относится и к ряду других калиевых каналов реполяризационного резерва, таких как глибенкламид-чувствительные, АТФ-зависимые K^+-каналы (IK_{ATP}, Kir6.2 каналы) [12], апамин-чувствительные, Ca^{2+}-зависимые K^+-каналы низкой проводимости (IK_{Ca}, SK каналы) [13] и Kir3.x (IKACh, ацетилхолин-зависимого тока входящего выпрямления) [14].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все эксперименты проводились в соответствии с Правилами проведения работ с подопытными животными, утвержденными комиссией по этике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН. Исследования проводили на самцах крыс линии Вистар массой 230–430 г в возрасте 3–4 мес. Части животных в дозе 30–45 мг/кг внутрибрюшинно вводили стрептозотоцин (СТЗ), растворенный в 0.1 М цитратном буфере (pH 4.6) (СТЗ-группа). Оставшиеся животные получали инъекцию эквивалентного объема цитратного буфера (контроль). Развитие СД1 подтверждали на основании измерений уровня случайной глюкозы, определяемого независимо от времени предыдущего приема пищи в последний день эксперимента. Уровень глюкозы измеряли с помощью глюкометра One Touch Select Plus Flex (LifeScan Europe, Швейцария). В данное исследование были включены только крысы СТЗ-группы с уровнем случайной глюкозы, превышающим 11 мМ.

Электрофизиологические эксперименты с использованием loose patch метода проводились на левых желудочках изолированных сердец крыс в условиях сохраненного синусового ритма при постоянной перфузии по методу Лангендорфа. Раствор для перфузии представлял собой аэрируемый карбогеном (5% CO_2 и 95% O_2) раствор Тироде, содержащий (мМ): 140 NaCl, 4.5 KCl, 1 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 10 HEPES, 10 глюкоза, pH 7.2–7.4. Первоначально изолированное сердце с вставленной в аорту пластиковой канюлей на 20–30 мин вывешивалось на колонку, заполненную аэрируемым стандартным раствором Тироде при комнатной температуре для промывки сердца от крови и проверки его на жизнеспособность. Далее сердце, показавшее устойчивую сократительную активность, переносилось в заземленную экспериментальную камеру, выполненную из оргстекла объемом 10 мл, и подключалось к термостатируемой перфузионной системе, заполненной раствором Тироде. Скорость перфузии составляла 5–7 мл/мин. Выведение из экспериментальной камеры избыточного раствора осуществлялось через силиконовую трубочку диаметром 1 мм, подключенную к аспиратору. Устранение сократительных ответов обеспечивалось добавлением в перфузирующий раствор блокатора миозиновой АТФазы 2,3-бутадион-моноксима (BDM, Sigma) в концентрации 20 мМ. Эксперименты проводились при температуре 38–39°C. Изготовление микроэлектродов производилось с использованием программируемого пуллера (Sutter Jnstr., Model P-1000, США). Для регистрации электрических ответов использовалась описанная ранее авторская методика микроэлектродного картирования наружной поверхности миокарда – narrow tipped pipettes loose patch [2] с использованием микроэлектродов с диаметром кончика ~5 мкм. Перемещение микроэлектрода от одного сайта регистрации на поверхности левого желудочка сердца к другому осуществлялось при помощи микроманипулятора NMH-21 (Narishige, Япония). Регистрируемые сигналы подавались на вход усилителя AM-1500 (National Instruments, США), затем оцифровывались с помощью АЦП (частота оцифровки – 10 кГц) и сохранялись для последующей обработки на жестком диске компьютера. Для локальной доставки фармакологических агентов в зону регистрации эти агенты добавлялись в раствор Тироде, заполняющий электрод. Использовались следующие блокаторы K^+-каналов: 4-аминопиридин (4-AP, блокатор ультрабыстрого, быстрого и медленного компонентов тока задержанного выпрямления, Kv1.5, 1.4 и 4.2/4.3 каналы; 5 мМ, Sigma, США), апамин (блокатор IK_{Ca}, SK-каналы; Tocris, США; 500 нМ), глибенкламид (блокатор IK_{ATP}, Kir6.1/6.2 каналы; Tocris, США; 100 мкМ) и Ba^{2+} (в низких, 1 или менее мМ, концентрациях специфический блокатор каналов обратного выпрямления, IK1, Kir2.1/2.2; Sigma, США; 5 мкМ $BaCl_2$). Время непрерывной регистрации от каждого конкретного сайта составляло 1–2 мин в обычных экспериментах и примерно 30 мин в экспериментах с использованием блокаторов K^+-каналов.

Рис. 1 иллюстрирует представительные примеры регистрируемых сигналов и их классификацию, применяемую в данной работе.

Если в наших более ранних работах [1–3] все регистрируемые вПД подразделялись на два типа, вне зависимости от наличия или отсутствия фазы следовой гиперполяризации (вПД1 – 1 негативный пик и вПД2 – 2 негативных пика; рис. 1*a* и *b*, соответственно), то теперь сигналы с выраженной (пиковая амплитуда более 5% от амплитуды первого негативного пика) фазой следовой гиперполяризацией были выделены в отдельные группы (вПД1сг и вПД2сг) и анализировались независимо от других типов сигналов. Для анализа временных характеристик использовался параметр T_{90} – время спада единственного (вПД1 и вПД1сг) или второго (вПД2 и вПД2сг) негативного пика на 90% от его абсолютной амплитуды.

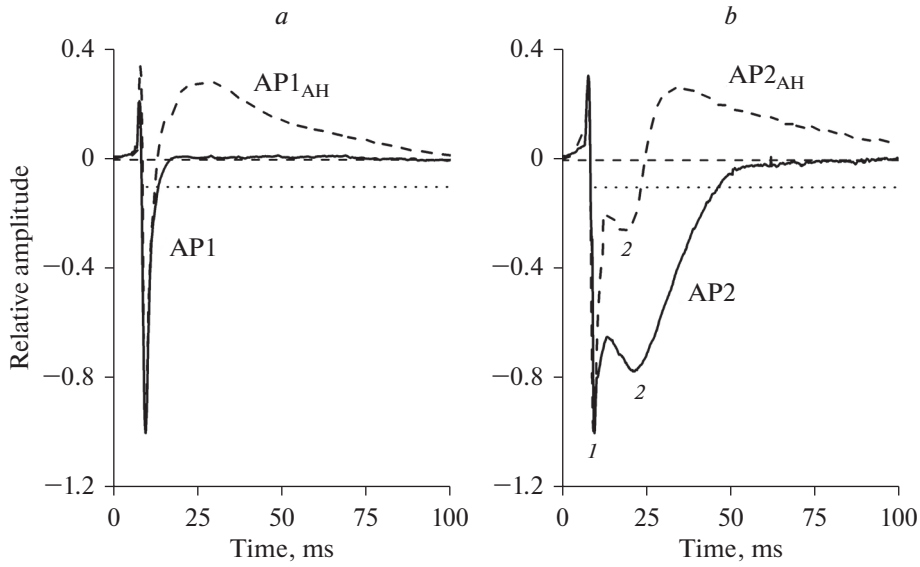


Рис. 1. Примеры и классификация типов внеклеточных потенциалов.
a – примеры вПД1 и вПД1сг сигналов (AP1 и $AP1_{AH}$);
b – примеры вПД2 и вПД2сг сигналов (AP2 и $AP2_{AH}$).
Треки вПД и вПДсг сигналов показаны сплошной и пунктирной линиями, соответственно. Первый и второй (когда присутствует) негативные пики сигнала пронумерованы – цифры около соответствующего пика.

Полученные в экспериментах данные были проверены на нормальность распределения (критерий Шапиро–Вилка; в выборках малого объема, не позволяющего применение этого критерия ($n < 6$), распределение данных предполагалось нормальным). В соответствии с результатами этой проверки, различия между значениями в контрольной и экспериментальной группах принимали как достоверные при $p < 0.05$, используя соответствующие параметрические или непараметрические статистические критерии. Представленные в тексте и на рисунках данные приведены в виде средних значений и их ошибок.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изменения уровня глюкозы и массы животных

Выборки контрольных и СТЗ крыс достоверно не различались по начальной массе (358 ± 12 и 349 ± 7 г) и уровню случайной глюкозы (6.0 ± 0.1 и 6.1 ± 0.1 мМ, контрольная группа 14 крыс и СТЗ группа 21 крыса, соответственно; $p > 0.05$, *t*-критерий Стьюдента). На протяжении 2-х–8-ми нед. эксперимента масса и уровень случайной глюкозы в крови контрольных животных достоверно не изменялись по сравнению с исходными значениями этих параметров (табл. 1). Средние уровни случайной глюкозы, измеренные у СТЗ-СД1 групп крыс на последний день эксперимента (29–20 мМ), существенно превышали таковые, измеренные у этих же крыс в начале эксперимента и у контрольных животных на соответствующих сроках, 2-х–8-ми недель эксперимента (табл. 1). Кроме того, достоверное снижение массы СТЗ-СД1 крыс было зафиксировано в группах 2- и 4-недельных СТЗ-СД1 крыс (табл. 1).

Таблица 1. Масса тела и содержание случайной глюкозы в крови исследованных крыс на разных сроках эксперимента (среднее значение ± стандартная ошибка)

Неделя эксперимента	Масса тела, г		Глюкоза, мМ	
	контроль	СТЗ-СД	контроль	СТЗ-СД
0	358 ± 12 (n = 14)	349 ± 7 (n = 21)	6.0 ± 0.1 (n = 14)	6.1 ± 0.1 (n = 21)
2	380 ± 10 (n = 4)	310 ± 12* (n = 8)	5.9 ± 0.4 (n = 4)	29 ± 2* (n = 8)
4	420 ± 15 (n = 4)	305 ± 9* (n = 6)	5.8 ± 0.3 (n = 4)	27 ± 3* (n = 6)
8	362 ± 17 (n = 6)	324 ± 17 (n = 7)	6.2 ± 0.1 (n = 6)	20 ± 4*$ (n = 7)

* Достоверное отличие средних значений данной группы от значений, измеренных в начале эксперимента ($p < 0.05$, one-way ANOVA, post-hoc Tukey test).
$ достоверное отличие от средней для 2-недельных экспериментов ($p < 0.05$, one-way ANOVA, post-hoc Tukey test).

Частота встречаемости разных типов внеклеточно регистрируемых ПД кардиомиоцитов у крыс в контроле и после 2-х, 4-х и 8-ми недель СТЗ-СД

Все описанные выше четыре категории вПД наблюдали в экспериментах в контрольных сердцах. Однако количество регистраций вПД1$_{СГ}$ и вПД2$_{СГ}$ было незначительным, составляя в среднем 6.8 ± 2.3% от всех зарегистрированных ПД (13 крыс, 31 из 423 сайтов регистрации). Средняя, нормализованная к амплитуде первого негативного пика ответа амплитуда СГ таких ответов была 19.4 ± 8.5%. T_{90} вПД1 и вПД1сг достоверно не отличались (5.2 ± 0.3 мс vs 5.9 ± 0.4 мс; $p > 0.05$, one-way ANOVA), тогда как вПД2$_{СГ}$ характеризовались значительно укороченным по сравнению с вПД2 спадом (T_{90}: 22.7 ± 4.0 мс vs 35.9 ± 1.7 мс, $p < 0.05$, one-way ANOVA).

В сердцах СТЗ-СД крыс, начиная уже с 2-недельного срока СД, наблюдались существенные изменения в отношении характеристик вПДсг сигналов. В первую очередь это касалось прогрессивного увеличения фазы СГ и очевидно связанного с этим подавления второго негативного пика и слияния его с первым негативным пиком вПД2сг. В этих условиях нашим критерием различения вПД1сг и вПД2сг потенциалов было либо, как в контрольных экспериментах, наличие второго негативного пика, либо присутствие отчетливой ступеньки на спаде первого негативного пика регистрируемого сигнала (рис. 2).

С учетом этой модификации классификационного подхода полученные данные демонстрируют статистически значимое (в сердцах СД животных по сравнению с контролем) увеличение относительной частоты регистрации вПД1, вПД1$_{СГ}$ и вПД2$_{СГ}$ и снижение частоты встречаемости вПД2 (рис. 3*a*, $p < 0.05$, one-way ANOVA). Более того, дальнейший анализ этих данных выявил наличие существенной взаимосвязи между встречаемостью вПД2 и вПДсг (вПД1сг и вПД2сг) в контроле и на разных сроках СД (рис. 3*b*).

Прогрессивное возрастание амплитуды следовой гиперполяризации с увеличением срока СД было сходно для вПД1$_{СГ}$ и вПД2$_{СГ}$ сигналов (рис. 4*a*). Однако соответствующие изменения длительности этих классов ПД носили диаметрально противоположный характер: вПД1сг замедлялись, тогда как длительность (T_{90}) вПД2 была снижена в СТЗ крысах по сравнению с контролем (рис. 4*b*). На 4-й и 8-й неделях СД вПД1сг и вПД2сг статистически не различались ни по одному из измеренных параметров (амплитуда следовой гиперполяризации или T_{90}).

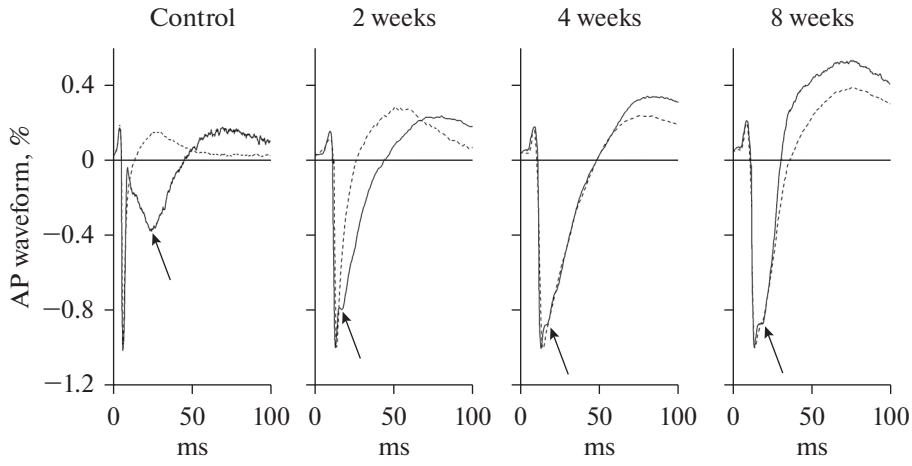


Рис. 2. Репрезентативные примеры регистраций вПДсг в контроле и на разных сроках диабета и их разделения на классы вПД1сг (штриховые линии) и вПД2сг (сплошные линии) сигналов.
Стрелки на рисунках отмечают второй негативный пик сигнала или ступеньку на спаде первого негативного пика сигналов, которые классифицировались как вПД2сг.
Надписи над панелями рисунка – экспериментальная группа животных.

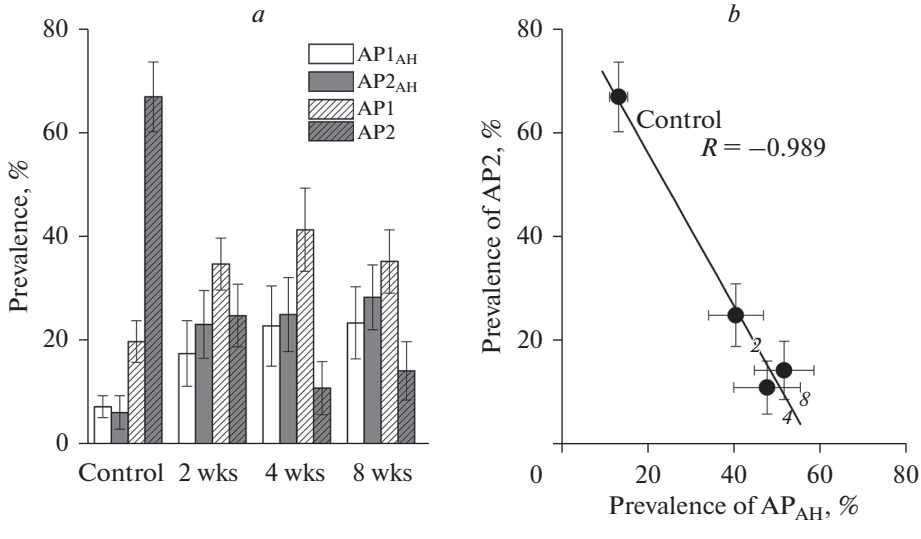


Рис. 3. Частота встречаемости разных типов внеклеточных ПД, регистрируемых в левом желудочке изолированного сердца в контроле и на разных сроках СД.
a – частота встречаемости вПД1, вПД2, вПД1$_{СГ}$ и вПД2$_{СГ}$ (AP1, AP2, AP1$_{АН}$, AP2$_{АН}$) в контроле (13 крыс, 423 сайтов) и на разных сроках СТЗ-СД (2 недели – 8 крыс, 212 сайтов регистрации, 4 нед. – 6 крыс, 204 сайта регистрации и 8 недель – 8 крыс, 224 сайта регистрации).
b – взаимосвязь между частотами встречаемости вПД2 и вПДсг (AP2 и AP$_{АН}$ – объединенная выборка вПД1сг и вПД2сг сигналов) в контроле и на разных сроках СД (срок диабета в неделях указан цифрой около соответствующего символа).

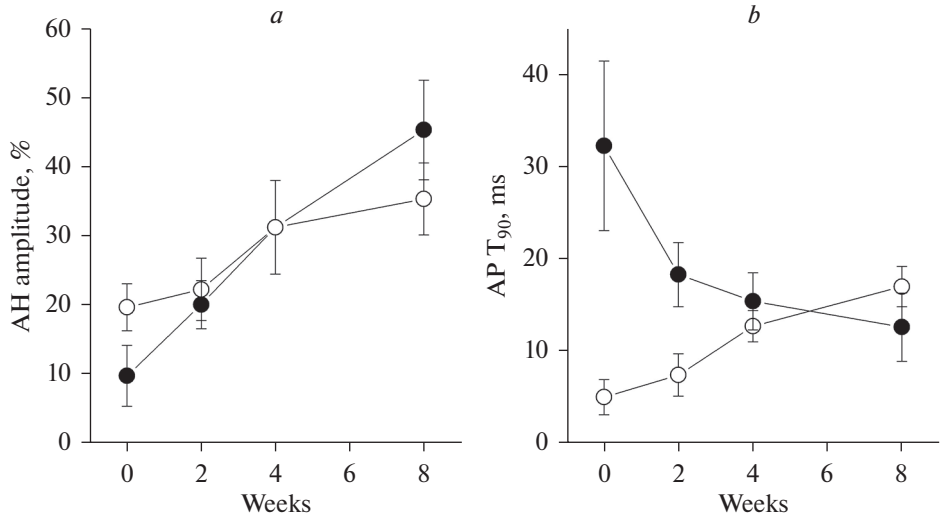


Рис. 4. Изменение характеристик вПД1$_{СГ}$ и вПД2$_{СГ}$ (открытые и закрытые символы соответственно) в контроле (ноль оси абсцисс) и на разных сроках СТЗ-СД.

a – средние (6–13 крыс, 23–54 сайта регистрации на точку) значения амплитуды следовой гиперполяризации (AH amplitude) вПД1 $_{СГ}$ и вПД2 $_{СГ}$.

b – T_{90} этих же сигналов (AP T_{90}) в контроле и на сроках 2-х, 4-х и 8-ми недель СТЗ-СД.

Влияние локальной доставки блокаторов K^+- каналов на профили вПД$_{сг}$

Поскольку в левых желудочках сердец контрольных крыс встречаемость вПДсг сравнительно низка (рис. 3*а*), все эксперименты с применением блокаторов K^+-каналов были проведены на сердцах животных с 2–4-недельным СД. Для локальной доставки к месту регистрации выбранный блокатор загружался в регистрирующую пипетку и эффективность его действия оценивалась из сравнения пиковых амплитуд следовой гиперполяризации вПД, измеренных немедленно после установления контакта пипетки с мышечным волокном и через 30 мин непрерывной регистрации вПДсг от данного сайта. В контрольных экспериментах (электрод заполнен стандартным внеклеточным раствором) и в экспериментах с локальной перфузией сайта регистрации глибенкламидом или $BaCl_2$, 30-минутная непрерывная регистрация вПД не сопровождалась изменениями амплитуды следовой гиперполяризации регистрируемого сигнала (рис. 5). Локальная аппликация 4-АР приводила к достоверному увеличению СГ от 12.8 ± 3.4% до 26.2 ± 2.4% к 30-й минуте регистрации (рис. 5; $p < 0.05$).

Полученные данные демонстрируют отсутствие каких-либо эффектов, связанных с длительной непрерывной регистрацией от одного и того же сайта (например, с повреждением мембраны кардиомиоцитов в зоне регистрации), а также предполагают, что формирование фазы следовой гиперполяризации вПД не может быть приписано активации 4-аминопиридин-, глибенкламид- или Ba^{2+}-чувствительных K^+-каналов плазматической мембраны кардиомиоцита.

Результаты экспериментов с локальной доставкой к сайту регистрации блокатора SK-каналов апамина (500 нМ) резко контрастировали с вышеизложенным. В этих экспериментах не наблюдалось изменения профилей стандартных вПД 1-го и 2-го типа миоцитов левого желудочка сердца крыс. Однако, уже начиная с 10-й мин

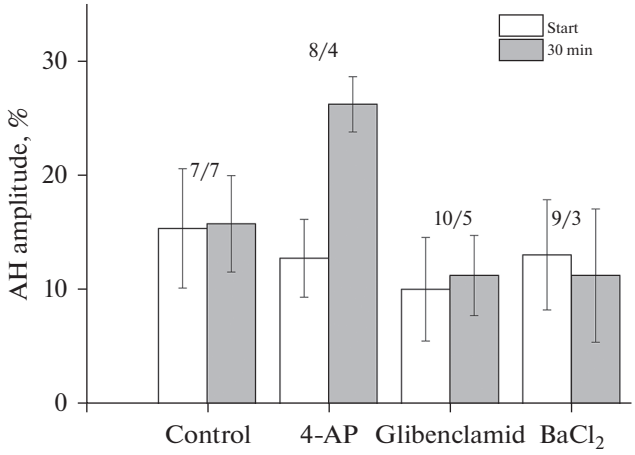


Рис. 5. Амплитуда следовой гиперполяризации вПДсг в начале и через 30 мин (открытые и затемненные столбцы, соответственно) непрерывной регистрации от данного сайта при заполнении регистрирующей пипетки нормальным физиологическим раствором (контроль) или раствором с добавлением выбранного блокатора K^+-каналов.

Приведены средние значения (± стандартная ошибка) для исследованных сайтов в контрольных условиях и при локальной перфузии 4-AP (5 мМ), глибенкламида (100 мкМ) или $BaCl_2$ (5 microM). Количество исследованных сайтов/крыс указано цифрами над соответствующими столбцами гистограммы.

после формирования контакта микропипетки, содержащей апамин, с поверхностью миоцита наблюдалось подавление фазы следовой гиперполяризации у вПДсг с постепенной трансформацией профилей как вПД1сг, так и вПД2сг в сигналы, соответствующие по форме “классическим” вПД2 сигналам (рис. 6).

Прогрессивное подавление фазы следовой гиперполяризации вПДсг в этих экспериментах ассоциировалось и с прогрессивным затягиванием спада этих сигналов (рис. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Скорость реполяризации кардиомиоцитов является одним из критических для поддержания нормальной сердечной активности параметров. Как замедление, так и ускорение реполяризации кардиомиоцитов может вести к нарушениям регулярности в сердечном ритме. Более того, аномальное замедление ПД кардиомиоцитов сопровождается нарушением диастолического расслабления сердечной мышцы – ведущим фактором развития кардиомиопатии и сердечной недостаточности, в частности у больных СД [8, 11]. В связи с последним, результаты нашего исследования, проведенного на модели стрептозотоцинового СД1 (СТЗ-СД1) у крыс, представляют особый интерес.

В наших исследованиях было показано существенное по сравнению с контролем увеличение вПДсг фракции вПД эпикардиальных миоцитов левых желудочков сердец СТЗ-СД1 крыс. Частота встречаемости таких сигналов значимо увеличена уже после двух недель экспериментального диабета и остается высокой на протяжении как минимум еще 6-ти недель СД (рис. 3). Ранее было показано, что на тех же сроках СТЗ-СД (1–8 нед.) внутриклеточно-регистрируемые ПД желудочковых кардиомиоцитов крыс замедлены из-за подавления K^+-токов реполяризационного

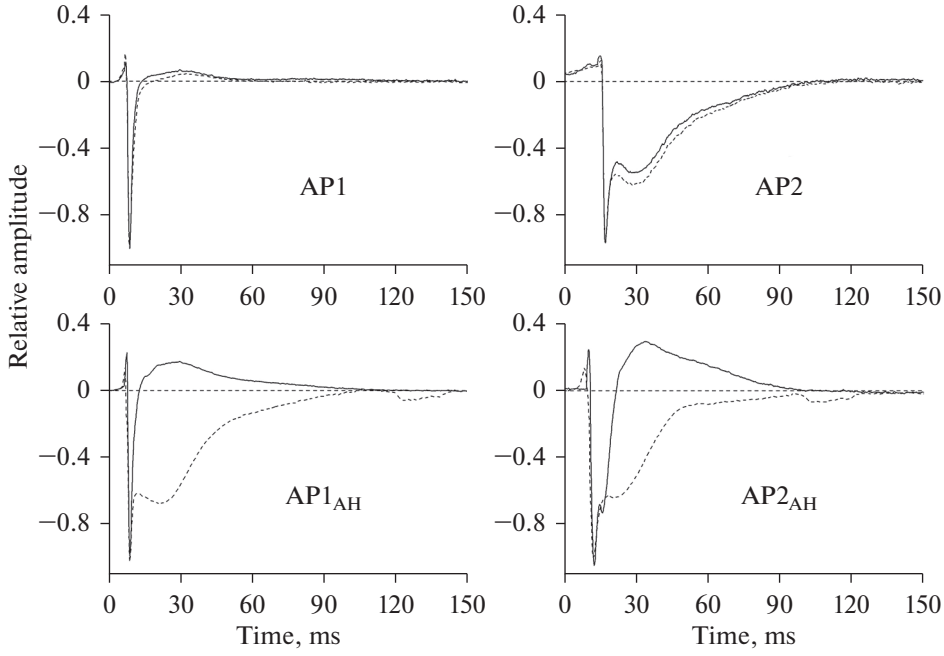


Рис. 6. Примеры изменений разных типов внеклеточных ПД в экспериментах с локальной доставкой апамина к сайту регистрации.
Сплошными и пунктирными линиями показаны треки сигнала, полученного в начале и под конец 30-минутной непрерывной регистрации с пипеткой, заполненной апамин-содержащим раствором (500 нМ). Верхние панели – примеры регистрации вПД1 и вПД2 сигналов; нижние панели – вПД1сг и вПД2сг сигналы.

резерва. А именно, были приведены свидетельства сниженной в кардиомиоцитах СТЗ-СД1 крыс активности/экспрессии трех типов K^+-каналов: каналов 4-АР чувствительного transient-outward (Ito) тока, каналов сверхмедленного (quasi-steady-state, Iss) тока и каналов тока обратного выпрямления (IK1) [5–9]. Наши результаты предполагают, что патогенез СТЗ-СД1 в отношении изменений ионных проводимостей желудочковых кардиомиоцитов более сложен, и наряду с подавлением существует также и активация, возможно компенсаторная, какого-то тока реполяризационного резерва, обеспечивающего появление/усиление фазы следовой гиперполяризации и увеличение фракции вПДсг регистрируемых в сердцах СТЗ-СД1 крыс. При рассмотрении вопроса о природе этого тока следует учесть, что эта фаза следовой гиперполяризации завершает вПД, когда в кардиомиоцитах желудочков сердца крысы активны K^+-каналы сверхмедленного (Iss) тока и тока обратного выпрямления (IK1) [5–9], а также, потенциально, могут активироваться такие токи реполяризационного резерва, как глибенкламид-чувствительные, АТФ-зависимые K^+-каналы (IKATP, Kir6.2 каналы) [12], апамин-чувствительные, Ca^{2+}-зависимые K^+-каналы низкой проводимости (IKCa, SK-каналы) [13] и Kir3.x (IKACh, ацетилхолин-зависимого тока входящего выпрямления) [14]. Однако участие Iss и IK1 токов в формировании фазы следовой гиперполяризации маловероятно, поскольку эти токи подавлены в сердцах СТЗ-СД1 крыс (см. ссылки выше). Более того, роль активации каналов IK1 тока может быть исключена также и на ос-

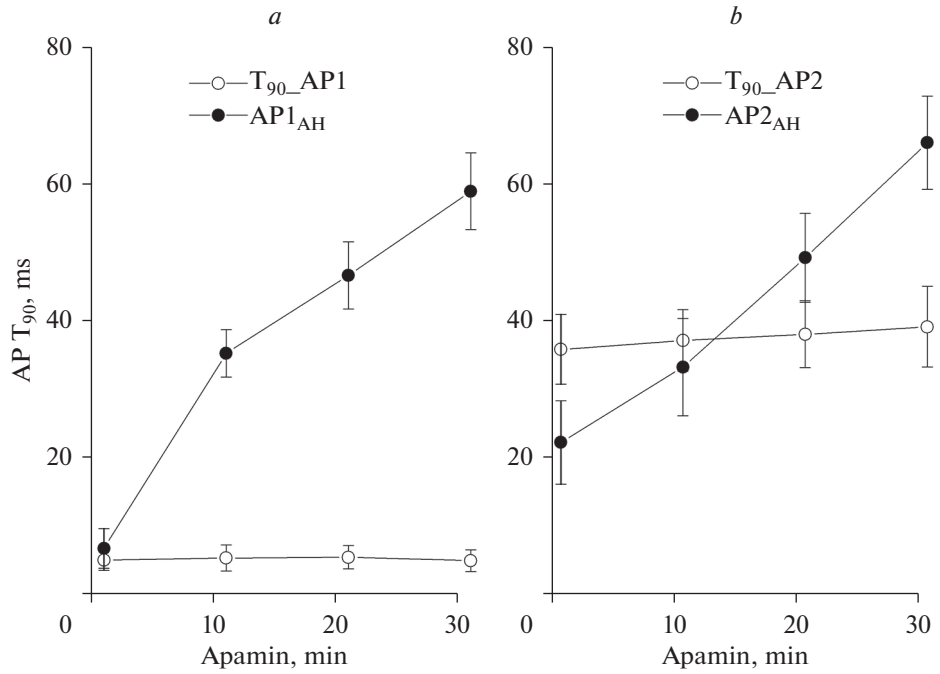


Рис. 7. Изменения временных параметров вПД в экспериментах с локальной доставкой апамина к сайту регистрации вПД1 и вПД1сг (*a*) и вПД2 и вПД2сг (*b*).
Представлены средние значения (± стандартная ошибка), рассчитанные для выборок вПД1, вПД1сг, вПД2 и вПД2сг, зарегистрированных в разных сайтах сердец СТЗ-СД крыс (4, 5, 3, и 5 сайтов, и 3, 4, 2 и 3 крысы, соответственно).

новании отсутствия изменений в форме вПДсг при их регистрации с помощью электродов, заполненных Ba^{2+}-содержащим раствором (рис. 5). Из трех других, использованных нами в экспериментах с локальной доставкой к месту регистрации блокаторов калиевых каналов, только локальная доставка апамина (блокатор Ca^{2+}-зависимых K^{+}-каналов низкой проводимости; SK [13]) вела к подавлению фазы следовой гиперполяризации вПДсг (рис. 6). Глибенкламид (блокатор IK_{ATP}) не влиял, а 4-АР (блокатор I_{to}) увеличивал амплитуду следовой гиперполяризации (рис. 5). Таким образом, на основании полученных данных именно активность SK-каналов представляется ответственной за формирование вПДсг. При этом следует отметить, что мы не наблюдали изменения формы регистрируемых вПД в контрольных экспериментах с локальной доставкой апамина к сайтам регистрации в которых регистрировались “классические” вПД1 или вПД2, не имеющие выраженной фазы следовой гиперполяризации (рис. 6). Наиболее простое объяснение этого феномена заключается в отсутствие мишени для апамина (SK-каналов) в зоне регистрации вПД в этих случаях. Наконец, предположение о ведущей роли активности SK-каналов в генерации следовой гиперполяризации подтверждается и, казалось бы, неожиданным, увеличением амплитуды следовой гиперполяризации в экспериментах с локальной доставкой к месту регистрации вПДсг 4-аминопиридина. 4-АР в сердечных кардиомиоцитах подавляет I_{to}, калиевый ток, ответственный за раннюю реполяризацию и, соответственно, существенно ограничивающий

активацию Ca^{2+}- каналов и вход Ca^{2+} в клетку. Снятие этого ограничения при блокаде ранней реполяризации 4-АР, вне сомнения, должно сопровождаться активацией всех Ca^{2+}-зависимых механизмов, включая увеличение тока через SK-каналы и увеличение амплитуды следовой гиперполяризации.

SK-каналы широко распространены в тканях млекопитающих, включая сердце грызунов. Известны SK1, SK2 и SK3 изоформы каналов, кодируемые соответственно *KCNN1*, *KCNN2* и *KCNN*3 генами [13]. Вне зависимости от изоформы все эти каналы характеризуются небольшой проводимостью (10–20 ps) для калия и активируются не напряжением, а внутриклеточным свободным Ca^{2+} в субмикромолярных концентрациях [13]. В сердце грызунов, SK1 и SK2 изоформы наиболее представлены в предсердиях, тогда как SK3 изоформа демонстрирует сходные уровни экспрессии как в предсердиях, так и в желудочках [15, 16]. Нормальная активность предсердных SK-каналов является важным механизмом контроля длительности потенциалов действия кардиомиоцитов, а нарушения в этой активности – одним из патогенетических механизмов фибрилляции предсердий при инфаркте миокарда, сердечной недостаточности, предсердной и желудочковой аритмии [17, 18]. Тем не менее, в целом, вопрос о роли SK-каналов в норме и при сердечной патологии остается открытым. В частности, насколько нам известно, роль SK-каналов при развитии диабетической кардиомиопатии была исследована только в одной работе на СТЗ-модели Т1СД мыши [19] и в двух работах, использующих крысиные модели Т2СД [11, 20]. Все эти исследования были ограничены анализом экспрессии и функции предсердных SK и сходны в демонстрации подавляющего SK-токи в предсердных кардиомиоцитах эффекта СД. Полученные нами данные предполагают, что эффект СД на активность/экспрессию SK-каналов желудочковых кардиомиоцитов может быть диаметрально противоположен описанному ранее для предсердий, приводя к существенному (по сравнению с контролем) увеличению фракции вПДсг в экспериментах на желудочках сердец 2–8-недельных СТЗ-СД1 крыс. Подтверждение предполагаемого феномена, уточнение его природы и функционального значения требует дальнейших исследований, в частности, поскольку увеличение активности SK-каналов в кардиомиоцитах эпикарда желудочков сердца было идентифицировано как одна из причин развития желудочковой аритмии сердца [21].

Отдельного обсуждения заслуживает обновленная в данной работе классификация форм вПД (вПДсг выделены в отдельные категории сигналов) и наблюдения того, что при действии апамина вПД1сг трансформируются в вПД2 (рис. 6, левая нижняя панель), а в сердцах СТЗ-крыс увеличиваются по сравнению с контролем встречаемости вПД1 (однопиковых вПД без следовой гиперполяризации), вПД1сг и вПД2сг, но не вПД2 (двух-пиковые вПД без фазы следовой гиперполяризации (рис. 3*a*). Более того, фракция вПДсг возрастает пропорционально убыванию фракции вПД2 (рис. 3*b*). Ранее нами было обосновано, что с большой долей вероятности первый и второй негативные пики вПД волны формируются в результате активации, соответственно, входящих натриевого и кальциевого токов кардиомиоцита в зоне внеклеточной регистрации. Далее были также предоставлены аргументы в пользу того, что вПД1 регистрируется в тех случаях, когда кончик регистрирующего микроэлектрода (при условии его малого размера) оказался помещенным в зону клетки, свободную от выходов t-трубочек, характеризующуюся низкой плотностью кальциевых каналов. В то же время наличие под электродом выходов t-трубочек и доступа к Т-системе кардиомиоцита, мембрана которой насыщена Ca^{2+}-каналами, является условием регистрации вПД2 [22]. В рамках этой трактовки наши новые наблюдения предполагают, что вПД1сг – это в действительности вПД2 сигналы, в которых входящий Ca^{2+}-ток полностью маскируется выходящим

K^+-током SK-каналов (что объясняет трансформацию вПД1сг в вПД2 при в экспериментах с локальной доставкой апамина к месту регистрации). Второе, как было показано и ранее с использованием конфокальной микроскопии [3, 4], СТЗ-СД1 ассоциирован с дезорганизацией Т-системы кардиомиоцитов и уменьшением плотности устьев t-трубочек на поверхности мембраны (что объясняет увеличение фракции вПД1 в экспериментах в СТЗ-СД1 модели крысы). Наконец, в-третьих, предполагаемое увеличение активности SK-каналов в кардиомиоцитах диабетических животных происходит за счет увеличения экспрессии этих каналов в Т-системе кардиомиоцитов (объясняя обратную пропорциональность изменений во фракции вПДсг и вПД2 форм сигналов, регистрируемых в контроле, и на 2-й и более поздних неделях СТЗ-СД1).

В заключение, представленные здесь данные позволяют предположить, что СТЗ-СД1 ассоциируется с увеличением активности/экспрессии SK-каналов в кардиомиоцитах левого желудочка сердца крысы. Подтверждение этого предположения, а также изучение механизмов и выявление функционального значения предполагаемых изменений требует дальнейших исследований.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты №№ 19-015-00139 и 20-34-90010) и государственного задания АААА-А18-118012290427-7.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы, планирование экспериментов, анализ данных и написание манускрипта (И.В.К. и М.Г.Д.), экспериментальная работа (И.В.К., А.В.С., А.А.П., О.В.Ч., и И.Б.С), окончательное редактирование и подготовка манускрипта к подаче (О.В.Ч. и И.Б.С).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kubasov IV, Dobretsov M* (2012) Two types of extracellular action potentials recorded with narrow-tipped pipettes in skeletal muscle of frog, *Rana temporaria*. J Physiol 590: 2937–44. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.230813
2. *Kubasov IV, Stepanov A, Bobkov D, Radwanski PB, Terpilowski MA, Dobretsov M, Gyorke S* (2018) Sub-cellular electrical heterogeneity revealed by loose patch recording reflects differential localization of sarcolemmal ion channels in intact rat hearts. Front Physiol 9: 1–9. https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00061
3. *Кубасов ИВ, Добрецов МГ, Бобков ДЕ, Панов АА* (2020) Возможная взаимосвязь между полиморфизмом внеклеточно регистрируемых потенциалов действия и организацией Т-системы миоцитов желудочков и предсердий сердца крысы. Журн эвол биохим физиол 56: 299–302. [*Kubasov IV, Dobretsov M, Bobkov DE, Panov AA* (2020) Putative relationship between polymorphism of extracellularly recorded action potentials and organization of the T-tubular system in rat ventricular and atrial cardiomyocytes. J Evol Biochem Fusiol 56: 299–302. (In Russ)]. https://doi.org/10.31857/s0044452920040075
4. *Кубасов ИВ, Чистякова ОВ, Сухов ИБ, Панов АА, Добрецов МГ* (2020) Изменения внеклеточно регистрируемых потенциалов действия изолированного сердца крысы при развитии стрептозотоцинового диабета. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 106: 1266–1277. [*Kubasov IV, Chistyakova OV, Sukhov IB, Panov AA, Dobretsov M* (2020) Functional changes in the T-system of cardiomyocytes of the isolated rat heart during development of streptozotocin-induced diabetes. Russ J Physiol 106: 1266–1277. (In Russ)]. https://doi.org/10.31857/s0869813920100052
5. *Jourdon P, Feuvray D* (1993) Calcium and potassium currents in ventricular myocytes isolated from diabetic rats. J Physiol 470: 411–429.

6. *Shimoni Y, Ewart HS, Severson D* (1998) Type I and II models of diabetes produce different modifications of K+ currents in rat heart: role of insulin. J Physiol 507 (Pt 2): 485–496.

7. *Shimoni Y, Ewart HS, Severson D* (1999) Insulin stimulation of rat ventricular K+ currents depends on the integrity of the cytoskeleton. J Physiol 514: 735–745. https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.735ad.x

8. *Casis O, Gallego M, Iriarte M, Sánchez-Chapula JA* (2000) Effects of diabetic cardiomyopathy on regional electrophysiologic characteristics of rat ventricle. Diabetologia 43: 101–109. https://doi.org/10.1007/s001250050013

9. *Brouillette J, Clark RB, Giles WR, Fiset C* (2004) Functional properties of K+ currents in adult mouse ventricular myocytes. J Physiol 559: 777–798. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.063446

10. *Grunnet M* (2010) Repolarization of the cardiac action potential. Does an increase in repolarization capacity constitute a new anti-arrhythmic principle? Acta Physiol 198 (Suppl): 1–48.

11. *Fu X, Pan Y, Cao Q, Li B, Wang S, Du H, Duan N, Li X* (2018) Metformin restores electrophysiology of small conductance calcium-activated potassium channels in the atrium of GK diabetic rats. BMC Cardiovasc Disord 18: 1–8. https://doi.org/10.1186/s12872-018-0805-5

12. *Negroni J, Lascano E, del Valle H* (2012) Glibenclamide action on myocardial function and arrhythmia incidence in the healthy and diabetic heart. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem 5: 43–53. https://doi.org/10.2174/187152507779315868

13. *Gu M, Zhu Y, Yin X, Zhang DM* (2018) Small-conductance Ca2+-activated K+ channels: insights into their roles in cardiovascular disease. Exp Mol Med 50: 1–7. https://doi.org/10.1038/s12276-018-0043-z

14. *Мельников КН, Вислобоков АИ, Колпакова МЭ, Борисова ВА, Игнатов ЮД* (2009) Калиевые ионные каналы клеточных мембран. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии 7: 3–27. [*Mel'nikov KN, Vislobokov AI, Ignatov YD, Kolpakova ME, Borisova VA* (2009) Potassium of ionic channels of cellular membranes Reviews on clinical pharmacology and drug therapy 7: 3–27. (In Russ)].

15. *Xu Y, Tuteja D, Zhang Z, Xu D, Zhang Y, Rodriguez J, Nie L, Tuxson HR, Young JN, Glatter KA, Vázquez AE, Yamoah EN, Chiamvimonvat N* (2003) Molecular identification and functional roles of a $Ca(^{2+})$-activated K^{+} channel in human and mouse hearts. J Biol Chem 278: 49085–49094. https://doi.org/10.1074/jbc.M307508200

16. *Tuteja D, Xu D, Timofeyev V, Lu L, Sharma D, Zhang Z, Xu Y, Nie L, Vázquez AE, Nilas Young J, Glatter KA, Chiamvimonvat N* (2005) Differential expression of small-conductance Ca2+-activated K+ channels SK1, SK2, and SK3 in mouse atrial and ventricular myocytes. Am J Physiol Hear Circ Physiol 289: 2714–2723. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00534.2005

17. *Diness JG, Bentzen BH, Sørensen US, Grunnet M* (2015) Role of calcium-activated potassium channels in atrial fibrillation pathophysiology and therapy. J Cardiovasc Pharmacol 66: 441–448. https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000249

18. *Daniel E Shumer NJNNPS* (2017) SK Channels and Ventricular Arhythmias in Heart Failure. Physiol Behav 176: 139–148. https://doi.org/10.1016/j.tcm.2015.01.010.SK

19. *Yi F, Ling TY, Lu T, Wang XL, Li J, Claycomb WC, Shen WK, Lee HC* (2015) Down-regulation of the small conductance calcium-activated potassium channels in diabetic mouse atria. J Biol Chem 290: 7016–7026. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.607952

20. *Liu CH, Hua N, Fu X, Pan YL, Li B, Li XD* (2018) Metformin regulates atrial SK2 and SK3 expression through inhibiting the PKC/ERK signaling pathway in type 2 diabetic rats. BMC Cardiovasc Disord 18: 1–9. https://doi.org/10.1186/s12872-018-0950-x

21. *Gui L, Bao Z, Jia Y, Qin X, Cheng ZJ, Zhu J, Chen QH* (2013) Ventricular tachyarrhythmias in rats with acute myocardial infarction involves activation of small-conductance Ca2+-activated K+ channels. Am J Physiol Hear Circ Physiol 304: 118–130. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00820.2011

22. *Hong TT, Shaw RM* (2017) Cardiac t-tubule microanatomy and function. Physiol Rev 97: 227–252. https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2015

Role of Potassium Currents in the Formation of After-Hyperpolarization Phase of Extracellular Action Potentials Recorded from the Control and Diabetic Rat Heart Ventricular Myocytes

I. V. Kubasov[a], A. V. Stepanov[a], A. A. Panov[a], O. V. Chistyakova[a], I. B. Sukhov[a], and M. G. Dobretsov[a, *]

[a] *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

**e-mail: dobretsovmaxim@gmail.com*

The role of small conductance (SK) Ca^{2+}-dependent potassium channels in pathogenesis of diabetic cardiomyopathy remains uncertain. In our studies in the rat model of streptozotocin-induced type 1 diabetess mellitus (STZ-DM1) a significant increase above control in the prevalence of extracellular action potentials (eAP) recorded from isolated heart left ventricles and terminating with a prominent phase of after-hyperpolarization was observed. In experiments with local delivery to the site of recording of several tested potasssium channel blockers suppression of this phase of eAP after hyperpolarization was achieved only with application of apamin, the selective SK channel inhibitor. These data suggest that eAP afterhyperpolarization phase is associated with activation of SK channels and that activity and/or expression of these channels is increased in epicardial cardiomyocytes of left ventricles of STZ-DM1 rat hearts.

Keywords: cardiomyocyte, diabetes mellitus type 1, diabetic cardiomyopathy, extracellular action potential, potassium channels

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2021, том 107, № 12, с. 1597–1610

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВЕРТИКАЛЬНОЙ ПОЗЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ПРОСЛУШИВАНИИ ПРИБЛИЖАЮЩИХСЯ СПЕРЕДИ И СЗАДИ ШАГОВ

© 2021 г. О. П. Тимофеева[1], И. Г. Андреева[1, *], А. П. Гвоздева[1]

[1] *Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия*

**E-mail: ig-andreeva@mail.ru*

Поступила в редакцию 17.09.2021 г.
После доработки 08.10.2021 г.
Принята к публикации 08.10.2021 г.

В исследовании проверено предположение о том, что постуральные реакции на конспецифическую звуковую информацию о движении могут существенно отличаться от реакций, которые были описаны в случае движущихся в том же направлении непрерывных звуковых образов. Зарегистрированы постуральные показатели для группы из 14-ти испытуемых с нормальным слухом при пассивном прослушивании с закрытыми глазами звуков шагов человека, подаваемых в условиях свободного поля с громкоговорителей, расположенных спереди и сзади. Выполнена оценка динамики этих показателей с периодом 8 с в течение 40 с до прослушивания, 24 с во время звучания и 32 с после него. При ожидании звуков приближающихся шагов было показано снижение скорости перемещения центра давления (ЦД) и разброса в сагиттальной плоскости до 10% от первого к пятому периоду. Причем интегральные показатели положения ЦД изменялись в направлении повышения устойчивости в большей степени при шагах сзади, чем спереди. Реакции вертикальной позы в ответ на звуки приближающихся сзади и спереди шагов проявлялись в сходном – на 8–10% увеличении показателей, характеризующих положение ЦД в сагиттальной плоскости (длина траектории, скорость и разброс), по сравнению с последним периодом ожидания. Достоверное различие в ответах на приближение сзади и спереди наблюдали только по показателю смещение: направление изменений было противоположным: при шагах спереди испытуемые отклонялись назад, при шагах сзади – вперед. После окончания звуковой стимуляции среднее положение ЦД (смещение) возвращалось к исходному перед стимуляцией. Постуральные реакции в ответ на приближающиеся шаги несущественно отличались как по направлению, так и по величине изменений показателей, характеризующих положение ЦД, от реакций на приближающийся непрерывный звуковой образ.

Ключевые слова: постуральный контроль, конспецифические сигналы, ориентация в пространстве, преднастройка, движение источника звука

DOI: 10.31857/S0869813921120098

В ответ на звуки, источник которых меняет свое местоположение в вертикальной плоскости, наблюдали постуральные реакции, состоящие в увеличении амплитуды раскачивания тела в плоскости движения этого источника [1]. Данные реакции характеризовались нестабильной амплитудой изменения положения центра давления (ЦД) тела и значительно варьирующей латентностью, что затрудняло ста-

тистический анализ и интерпретацию результатов. Переход от одиночной стимуляции к повторяющемуся звуковому образу с одинаковой траекторией и другими характеристиками движения позволил выявить ряд важных особенностей вертикальной позы при прослушивании движущихся источников звука. Мы наблюдали выраженные изменения постурального контроля в ответ на приближающиеся и удаляющиеся непрерывные звуковые образы по сравнению с неподвижным сигналом при стимуляции в течение 40 с [2]. Разделение периода ответа на две – начальную и конечную части по 20 с, показало различие их постуральных характеристик. Таким образом, продолжительная стимуляция формировала динамически развивающийся и относительно стабильный ответ системы регуляции позы. Выраженность постуральных реакций на движение зависела от его направления: наиболее выраженные изменения стабилографических показателей были отмечены в случае биологически значимого приближающегося сигнала [2, 3].

Известно, что биологическое и эмоциональное значение звуковой и зрительной стимуляции проявляется в постуральных реакциях, возникающих в ответ на нее. Наиболее детально постуральные реакции изучены в ответ на аффективные зрительные стимулы [4–7]. В частности, при изучении контроля позы во время просмотра видеоклипов было обнаружено, что счастливые и несчастные лица вызывают большее колебание ЦД тела по сравнению с нейтральными лицами [8]. В отличие от зрительных, роль эмоционально значимых слуховых стимулов в контроле равновесия изучена недостаточно [9].

Для выживания человека, как и других социальных видов, восприятие конспецифичных сигналов со стороны представителей своего вида и реагирование на них подразумевает развитую способность к слуховому анализу их движения. В качестве конспецифических сигналов для человека большое биологическое значение имеют звуки приближающихся шагов, побуждающих к последующему взаимодействию. Итак, приближающиеся шаги как сигнал о возможном контакте с представителем своего вида неизбежно имеет эмоцинальную окраску. Поэтому можно предположить, что постуральные реакции на конспецифические движущиеся звуковые стимулы могут существенно отличаться от реакций, которые были описаны в случае шумовых звуковых образов, применявшихся в наших работах [2]. Методом функциональной магнитно-резонансной томографии при прослушивании шагов вправо, влево, в направлениях приближения и удаления была показана объемная активация коры больших полушарий, в том числе вне первичных слуховых областей [10]. В ответ на пассивное прослушивание приближающихся, удаляющихся и неподвижных шагов на месте была зарегистрирована устойчивая и объемная активация в надкраевой и угловой извилинах [11]. В случае наиболее биологически значимых приближающихся шагов активность была обнаружена также в области предклинья, а у части испытуемых и в области MT/V5 [12]. Активация мультисенсорных областей, которые специализированы на ориентации в пространстве, предполагает формирование непроизвольной постуральной реакции, которая необходима для подготовки к последующим активным действиям. И наиболее четко такая реакция будет сформирована в случае приближающихся шагов.

Отметим, что изменения постуральных показателей наблюдались нами не только во время звукового воздействия, но и при ожидании, а также в течение некоторого времени после его окончания. Продолжительные изменения постурального контроля в процессе ожидания известной звуковой стимуляции для разных типов звуковых моделей (приближение, удаление и неподвижный сигнал) выражались в смещении ЦД назад, в уменьшении длины траектории и скорости ЦД в сагиттальной плоскости при анализе последовательных временных интервалов. В большей степени изменения были выражены для движущихся звуковых образов по сравнению с неподвижными, и особенно в случае биологически значимого приближаю-

щегося сигнала [2]. Феномен постурального последействия для движущихся зрительных и слуховых образов был описан в ряде работ [2, 13]. Показан “негативный” эффект последействия, который состоит в смещении ЦД тела в противоположном направлении в течение 20 с после окончания звучания приближающегося звукового образа [2]. Таким образом, представляет интерес проанализировать постуральные показатели не только во время звуковой стимуляции конспецифическими сигналами (приближающиеся шаги), но также до и после нее.

Хорошо известно, что слуховая информация может быть получена из любой точки пространства, тогда как зрительная – существенно ограничена в переднем полупространстве. Поэтому звуковая информация о локализации объектов, приходящая из полупространства позади человека, не имеет конкуренции с другими модальностями. Это обуславливает ее актуальность для формирования последующего поведения. Следовательно, постуральные реакции в ответ на звуки шагов, приближающихся сзади и спереди, могут отличаться не только направлением смещения ЦД, но и величиной других постуральных показателей, в том числе интегральных, таких как площадь и сжатие эллипса, качество равновесия.

Целью настоящей работы было проверить гипотезу о различии постуральных реакций в ответ на звуки конспецифических сигналов приближающихся с разных направлений, проанализировав изменения показателей позы в сагиттальной плоскости и интегральные показатели положения ЦД тела в периоды ожидания, во время и после прослушивания звуков шагов, приближающихся сзади и спереди.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании приняли участие 14 испытуемых с нормальным слухом, без диагностированных нарушений вестибулярной системы и опорно-двигательного аппарата в возрасте от 18 до 53 лет (в среднем 27 лет) – 7 женщин, 7 мужчин. Состояние слуха испытуемых оценивали с помощью тональной аудиометрии, которую проводили на клиническом аудиометре АА-02 (Биомедилен). В дополнение к тональной аудиометрии оценка временного разрешения слуха проводилась с применением теста обнаружения паузы [14]. Все испытуемые, участвовавшие в экспериментах, успешно прошли аудиометрические тесты и тесты на обнаружение паузы. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие (Протокол заседания этического комитета Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН по биоэтике № 1-07 от 16 июля 2019 г.).

В качестве звуковых раздражителей применялись стереозаписи приближающихся шагов, выполненные в длинном коридоре с реверберацией. Акустические характеристики коридора оценивали путем определения уровня звукового давления в месте расположения записывающих микрофонов во время и после импульсов белого шума. Снижение уровня сигнала после резкого прерывания шумового импульса составило 35 дБ в течение 400 мс. Оценку задержек эхо-сигналов (звуковых сигналов отраженных от стен, пола и потолка) по сравнению с прямым сигналом выполняли посредством записи в коридоре короткого щелчка высокой амплитуды, который воспроизводили при помощи громкоговорителя, расположенного на расстоянии 1 м от микрофона. Первый, различимый на записи эхо-сигнал был зарегистрирован через 15 мс, а второй – через 38 мс после прямого сигнала. Для формирования ритмических шагов и оценки скорости человека запись производили под

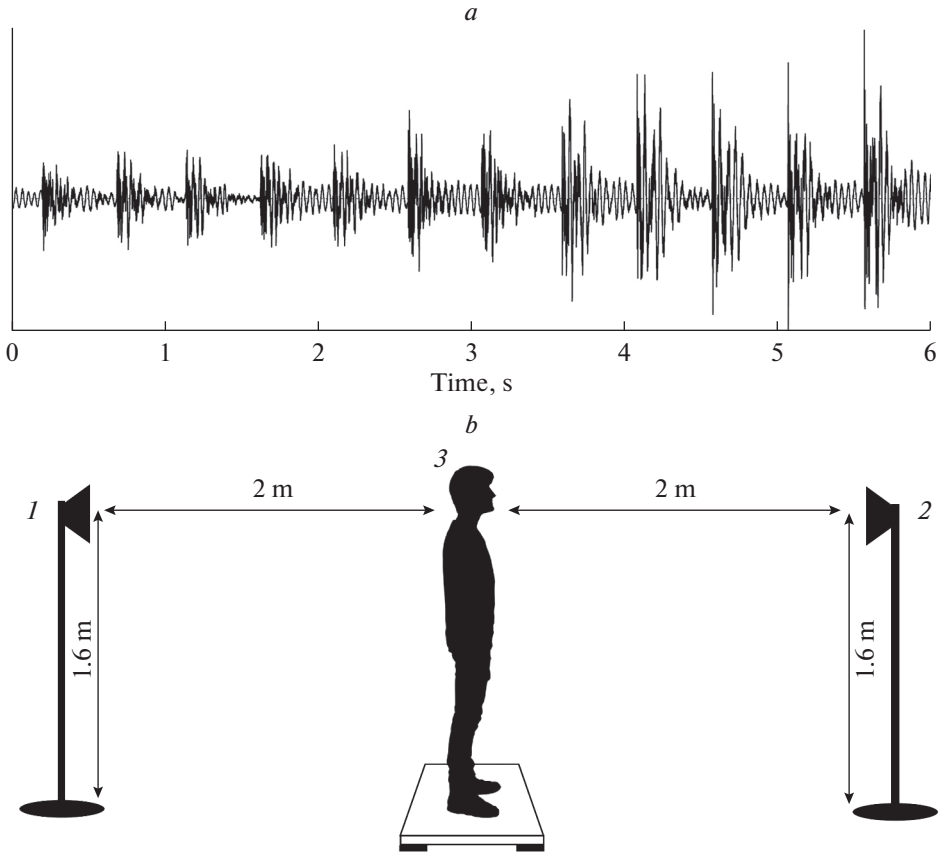


Рис. 1. (*a*) – осциллограмма записи приближающихся шагов, которая была использована в качестве конспецифического биологически значимого звукового сигнала. (*b*) – схема взаимного расположения громкоговорителей (*1*, *2*) и испытуемого (*3*) во время проведения экспериментов.

звуки метронома, передаваемые человеку через наушники. Ритм шагов составлял 133 в мин, скорость приближения – около 1.6 м/с (рис. 1*a*).

Стереозапись шагов производили с помощью калиброванной пары конденсаторных микрофонов Oktava MK 012, которые располагали на расстоянии 15 см от пола, параллельно друг другу, так что расстояние между микрофонами составляло 15.5 см. Микрофоны были ориентированы в направлении движущегося человека. Для записи звука использовали ноутбук с внешним USB-аудиоинтерфейсом AKAI EIE, который поддерживает одновременную запись четырех каналов с частотой дискретизации 44100 отсчетов в секунду. Человек, чьи шаги были записаны, двигался по прямой линии, последний шаг при приближении записывали на расстоянии 0.75 м от микрофонов. Генерацию звука производили ПК через USB-аудиоинтерфейс Creative E-MU 0202.

Регистрацию постуральных показателей проводили при звуковой стимуляции, которую выполняли с двух громкоговорителей, расположенных на расстоянии 2.0 м от испытуемого, стоящего на платформе, на высоте 1.6 м (рис. 1*b*). Один из них размещали прямо перед испытуемым (0° по азимуту, 0° – по элевации), а второй –

позади испытуемого (180° по азимуту, 0° – по элевации). Уровень сигнала на громкоговорителе регулировался с помощью усилителя мощности NevaAudio SA-3004. Измерения уровня сигнала в месте головы испытуемого производились с помощью микрофона 41-45, предусилителя 26-39 и усилителя 26-06 от Brüel and Kjœr. Максимальный уровень всех звуковых раздражителей в месте прослушивания составил 52 дБ уровня звукового давления.

В звукоизолированной камере объемом 62.2 м^3, имеющей специальное покрытие потолка, стен и пола, обеспечивающее условия для свободного поля, выполняли регистрацию постуральных показателей при трех видах стимуляции: приближающиеся шаги спереди, сзади и контрольные сигналы, не содержащие информацию о движении. Последние создавали многократным повторением звуковой записи одного шага, подаваемой на громкоговоритель, расположенный позади испытуемого. Уровень ослабления внешнего шума в камере был не менее 40 дБ в диапазоне частот от 0.5 до 16 кГц. Испытуемые стояли на стабилометрической платформе “Стабилан 01” в позе “пятки вместе, носки врозь”, руки свободно опущены вдоль тела, глаза закрыты. Платформа располагалась на массивной опоре в центре камеры. Изменения положения ЦД регистрировались программой Stabmed 2.05. Частота дискретизации сигнала ЦД – составляла 50 Гц. Один цикл записи изменений положения ЦД общей длительностью 96 с состоял из трех последовательных периодов: 40 с тишины перед стимуляцией, 20.5 с звуковой стимуляции и 35.5 с тишины после стимуляции. Звуковая стимуляция включала три последовательных одинаковых фрагмента записи шагов по 6.5 с и интервалом 0.5 с между ними. Для каждого из испытуемых регистрацию стабилограммы проводили в течение одного дня, при одном типе стимуляции выполняли 10 циклов регистрации. После каждых 2-х регистраций испытуемому предоставляли 2–20-минутный период отдыха. Общая продолжительность регистрации составляла не более 2-х ч.

Для анализа полученные записи стабилограммы были разделены на 12 периодов по 8 с: 5 периодов до стимуляции, 3 периода во время стимуляции (включая 3.5 с после ее окончания, т.к. по нашим данным и данным Агаевой с соавт. [1, 2] постуральный ответ на звук завершается в течение примерно 3 с по окончанию стимуляции), 4 периода после стимуляции. Для каждого из 12-ти фрагментов определяли следующие показатели колебаний ЦД тела: смещение, длину траектории, скорость и разброс положения ЦД вдоль сагиттальной оси. Помимо характеристик колебания ЦД вдоль сагиттальной оси оценивали интегральные показатели вертикальной позы: площадь эллипса, характеризующую часть площади опоры, в которой перемещается во фронтальной и сагиттальной плоскости ЦД при стоянии и его сжатие, а также качество функции равновесия. Последний показатель рассчитывается в виде процентного отношения площади, ограниченной функцией распределения длин векторов скоростей, и некоторой константы, равной площади прямоугольника, ограниченного осями координат, горизонтальной асимптотой функции кривой распределения длин скоростей и вертикальной границей (StabMed2). Статистические расчеты проводили в пакете программ Statistica v.5.5A. Достоверность различий величин стабилографических показателей в группе испытуемых осуществляли для разных временных периодов с применением парного непараметрического метода Вилкоксона. Достоверность различий показателей при разных видах стимуляции осуществляли с применением непараметрического критерия Манна–Уитни для независимых выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При анализе динамики стабилометрических показателей вертикальной позы человека до, во время и после прослушивания конспецифических звуковых сигналов

(шаги человека) были выявлены изменения показателей длина траектории ЦД, линейная скорость и разброс по сагиттальной оси (рис. 2).

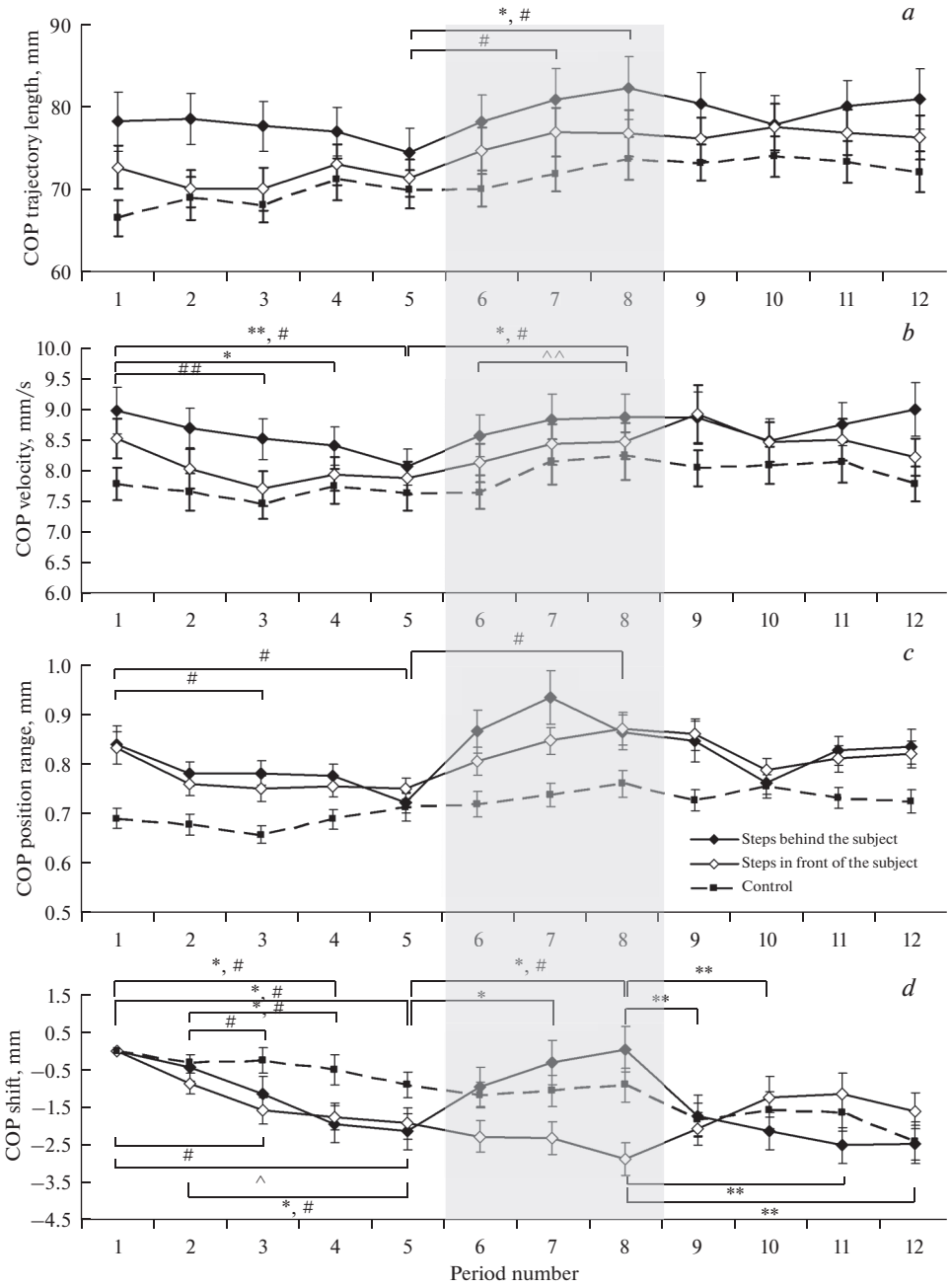
Длина траектории во время ожидания звуковых сигналов всех трех видов достоверно не изменялась (рис. 2*a*). Прослушивание приближающихся шагов приводило к увеличению данного показателя, в среднем до 10% при шагах сзади, и 8% – спереди. Достоверные отличия пятого периода наблюдали по сравнению с восьмым для сигнала, приближающегося сзади ($p < 0.02$), и по отношению к седьмому и восьмому периодам для сигнала спереди ($p < 0.02$ и $p < 0.04$ соответственно). В случае неподвижного сигнала (повторяющийся шаг, не содержащий признаков движения) увеличение составило в среднем 5% и происходило от пятого к восьмому периоду в виде тенденции ($p < 0.07$). Прекращение звуковой стимуляции не вызывало значимых изменений данного показателя при всех видах воздействия. Более выраженная динамика наблюдалась для показателя скорость перемещения ЦД (скорость ЦД).

Скорость ЦД снижалась во время ожидания звуковой стимуляции всех видов: для шагов спереди в среднем на 9%, достоверно от первого периода к третьему и пятому ($p < 0.001$ и $p < 0.03$ соответственно), для шагов сзади – на 10% к четвертому и пятому ($p < 0.04$ и $p < 0.001$ соответственно) (рис. 2*b*). В случае неподвижного сигнала также были отмечены небольшие изменения в среднем на 4% от первого периода к третьему в виде тенденции ($p < 0.06$). Во время прослушивания приближающихся шагов с обоих направлений скорость ЦД достоверно возрастала от последнего периода ожидания, предшествующего звуковой стимуляции, к концу воздействия в среднем на 10% для шагов сзади и 7.5% для шагов спереди ($p < 0.03$ и $p < 0.01$ соответственно). В случае неподвижного сигнала сзади испытуемого скорость ЦД возрастала от первого периода стимуляции к ее окончанию на 8% ($p < 0.01$). При сравнении периодов прослушивания с периодами после него не было выявлено значимых изменений данного показателя для всех видов сигналов.

Стабилометрический показатель разброс демонстрировал изменения, сходные с изменениями описанных выше показателей (рис. 2*c*). Выявлено достоверное снижение в среднем на 10% во время ожидания звуков приближающихся спереди шагов от первого периода к третьему и пятому ($p < 0.02$ и $p < 0.05$ соответственно), а при ожидании звуков шагов сзади – от первого к пятому на 15% в виде тенденции ($p < 0.07$). Сравнение последнего периода ожидания с периодами прослушивания выявило тенденцию к увеличению разброса при всех видах звуковой стимуляции. При этом значимый рост показателя на 17% во время стимуляции при сравнении пятого и восьмого периодов выявлен только в случае шагов, приближающихся спереди ($p < 0.01$). По окончании прослушивания приближающихся спереди или сзади шагов разброс снижался незначительно ($p < 0.17$). Динамика разброса в случае неподвижного сигнала не выявлена в течение всего времени регистрации.

При рассмотрении изменений показателя смещение, который характеризует среднее положение ЦД за интервал времени, его величина в последовательные 8-

Рис. 2. Динамика стабилографических показателей, характеризующих положение и движение ЦД вдоль сагиттальной оси во временные интервалы до, во время и после звуковой стимуляции. (*a*) – длина траектории ЦД. (*b*) – скорость ЦД. (*c*) – разброс положений ЦД. (*d*) – смещение ЦД. По оси абсцисс указаны временные периоды продолжительностью по 8 с каждый: 1–5 – до стимуляции; 6–8 – во время стимуляции; 9–12 – после стимуляции. Вертикальной линией показана стандартная ошибка среднего. Разные маркеры соответствуют разным условиям звуковой стимуляции: приближающиеся шаги сзади, приближающиеся шаги спереди и повторение одного звука шага с постоянной амплитудой – контрольное условие (см. легенду), $n = 140$. Для приближающихся шагов сзади: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$; для приближающихся шагов спереди: # – $p < 0.05$, ##– - $p < 0.01$; для контрольного условия: ^ – $p < 0.05$, ^^ – $p < 0.01$, непараметрический парный тест Вилкоксона.


a
COP trajectory length, mm
b
COP velocity, mm/s
c
COP position range, mm
Steps behind the subject
Steps in front of the subject
Control
d
COP shift, mm
Period number

секундные периоды регистрации была нормирована относительно первого периода (значение смещения для него принимали за нулевое). В период ожидания звукового сигнала происходили однонаправленные изменения данного показателя по сагиттальной оси вне зависимости от вида звукового сигнала (рис. 2*d*). Они проявлялись в виде смещения ЦД назад в последовательные временные периоды. Бóльшие изменения наблюдали для движущихся шагов по сравнению с неподвижным сигналом: в среднем 1.9 и 2.2 мм для шагов спереди и сзади соответственно против 0.9 мм для неподвижного. В случае приближающихся спереди шагов выявлена достоверная разница между первым и вторым периодами со всеми последующими периодами ожидания, для приближающихся сзади шагов – с четвертым и пятым, а также между первым и пятым в контроле ($p < 0.05$).

В ответ на звуки приближающихся спереди и сзади шагов ЦД испытуемых смещался в противоположных направлениях. Испытуемые отклонялись от источника звука в противоположную от него сторону. При шагах спереди испытуемые увеличивали отклонение назад на 1 мм, а при шагах сзади – смещались в среднем на 2.2 мм вперед от положения, которое они занимали в конце периода ожидания. Достоверные изменения выявлены в первом случае между пятым периодом и восьмым ($p < 0.04$), во втором случае – пятого с седьмым и восьмым периодами ($p < 0.05$ и $p < 0.03$ соответственно). Сравнение показателя смещение при прослушивании шагов с противоположных направлений выявило достоверные различия только в восьмом периоде ($p < 0.05$, критерий Манна–Уитни для независимых выборок). При прослушивании неподвижного звукового сигнала достоверных изменений по показателю смещение не было выявлено.

По окончании звуковой стимуляции испытуемые смещались к положению, занимаемому перед воздействием. После шагов сзади смещение назад достигало 2.5 мм и было достоверно между восьмым периодом и всеми последующими ($p < 0.01$). После сигнала спереди смещение вперед на 1.7 мм к десятому периоду наблюдалось в виде тенденции ($p < 0.08$). После окончания неподвижного звукового сигнала достоверных изменений по показателю смещение не было выявлено так же, как и при прослушивании.

Наряду с изменениями стабилометрических показателей вдоль сагиттальной оси выявили динамику интегральных показателей вертикальной позы – площади эллипса, его сжатия и качества равновесия. Для показателя площадь эллипса наибольшие изменения были получены в случае звуков шагов, приближающихся сзади (рис. 3*a*). Уменьшение показателя в периоды ожидания достигало 32%, достоверные отличия показателя для первого периода с четвертым и пятым ($p < 0.04$ и $p < 0.01$ соответственно). Во время прослушивания сигнала наблюдали рост показателя максимально в среднем по группе на 87% в седьмом периоде (достоверные отличия показателя для пятого периода с шестым, седьмым и восьмым ($p < 0.04$, $p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно). После прослушивания шагов, приближающихся сзади, происходило достоверное уменьшение на 30% площади эллипса к десятому периоду по сравнению с шестым ($p < 0.02$) и в виде тенденции по сравнению с седьмым ($p < 0.06$). При ожидании шагов спереди наблюдалась тенденция к уменьшению площади эллипса на 20% в четвертом периоде по сравнению к первым ($p < 0.08$). Во время прослушивания сигнала увеличение параметра составило 14% и было достоверно в седьмом и восьмом периодах по сравнению с четвертым периодом ожидания ($p < 0.03$ и $p < 0.02$ соответственно). Различий в площади эллипса при прослушивании приближающихся шагов спереди и сзади не было выявлено. По окончании прослушивания тенденция к увеличению площади эллипса сохранялась еще на протяжении 8 с, после чего происходило постепенное уменьшение данного показателя в среднем на 17% в последнем периоде по сравнению с девятым. Однако это изменение оказалось недостоверным. При ожидании, прослушивании и после-

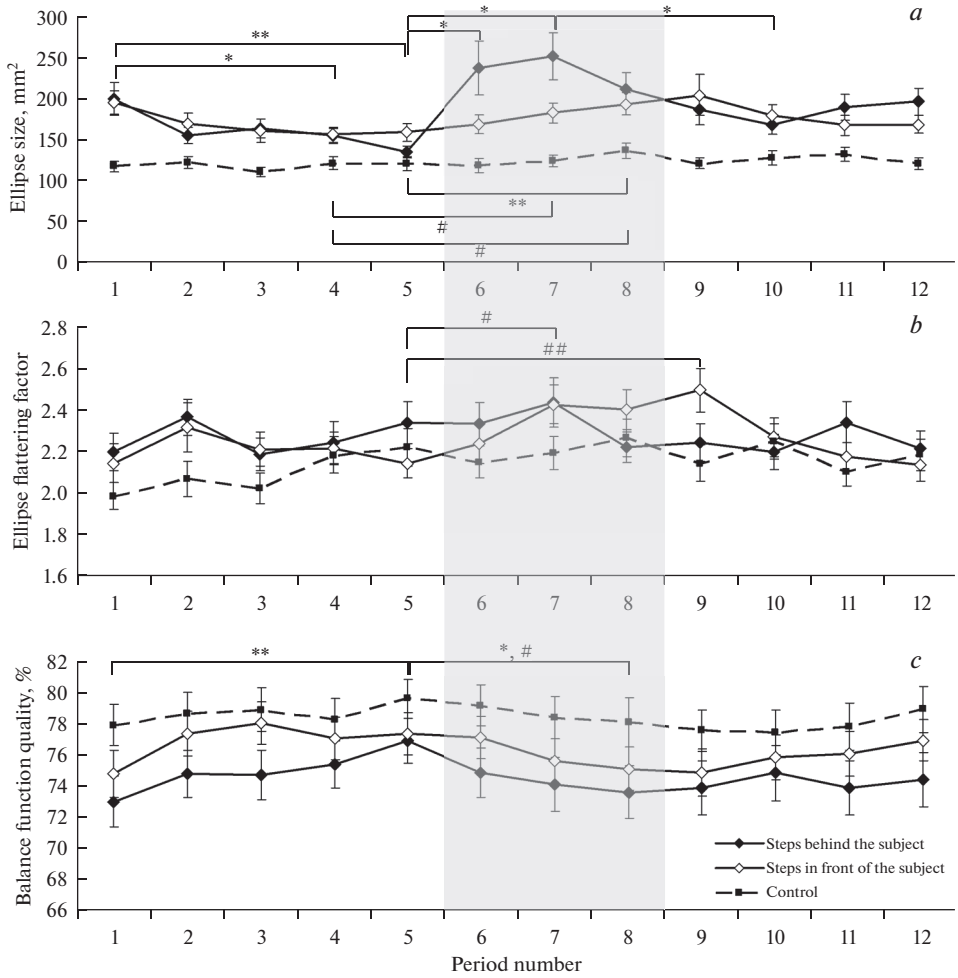


Рис. 3. Динамика стабилографических показателей, отражающих разброс положений ЦД по двум осям и устойчивость испытуемых во временные интервалы до, во время и после звуковой стимуляции. (*a*) – площадь эллипса, (*b*) – сжатие эллипса, (*c*) – качество функции равновесия. По оси абсцисс указаны временные периоды продолжительностью по 8 с каждый: 1–5 – до стимуляции; 6–8 – во время стимуляции; 9–12 – после стимуляции. Разные маркеры соответствуют разным условиям звуковой стимуляции: приближающиеся шаги сзади, приближающиеся шаги спереди и повторение одного звука шага с постоянной амплитудой – контрольное условие (см. легенду). $n = 140$. Для приближающихся шагов сзади: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$; для приближающихся шагов спереди: # – $p < 0.05$, ## – $p < 0.01$; непараметрический парный тест Вилкоксона.

действии неподвижного звукового сигнала изменения площади эллипса для разных периодов регистрации не превышали 13%, и достоверных различий выявлено не было.

Другая характеристика эллипса – его сжатие, изменялась незначительно при всех видах звуковой стимуляции (рис. 3*b*). Достоверных изменений не было выявлено кроме случая прослушивания шагов спереди, при котором обнаружено достоверное увеличение сжатия эллипса в среднем на 14 и 17% в седьмом и девятом пе-

риодах по сравнению с пятым предшествовавшем звуковой стимуляции ($p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно).

Показатель “качество функции равновесия” демонстрировал изменения при ожидании стимуляции только в случае шагов сзади (увеличение в пятом периоде на 5% по сравнению с первым ($p < 0.01$) и в ответ на звуки шагов при приближении как сзади, так и спереди (рис. 3*c*). Прослушивание сигнала сзади вызывало достоверное снижение данного показателя в среднем на 4%, а сигнала спереди – на 3% в восьмом периоде по сравнению с пятым ($p < 0.03$ и $p < 0.04$ соответственно). При регистрации ответа на неподвижный стимул в течение всего времени наблюдения не было выявлено изменений показателя “качество функции равновесия”.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В соответствии с нашим предположением об изменениях постуральных показателей до, во время и после прослушивания конспецифических сигналов в эксперименте были получены различия в эти интервалы времени регистрации по целому ряду показателей. В период ожидания звука приближающихся шагов, независимо от их направления, и даже в случае неподвижного сигнала отмечали смещение ЦД назад. Причем величина смещения была вдвое выше при ожидании приближающегося звукового образа по сравнению с неподвижным. Направление смещения ЦД совпадало с направлением, характерным для преднастройки позы при подготовке к шаганию, и проявлялось в смещении тела назад [15]. Вместе с тем, интегральные показатели вертикальной позы в наших экспериментах свидетельствовали об уменьшении колебаний тела, что можно рассматривать как повышение устойчивости, тогда как преднастройка для последующего движения, напротив, характеризуется дестабилизацией позы, как показано в упомянутой выше работе. По временным характеристикам процесса мы также не обнаруживаем соответствия наблюдаемых нами постуральных изменений эффекту преднастройки, поскольку наиболее выраженные изменения выявлены в интервалах 8–16 с перед началом стимуляции, что несопоставимо с описанным ранее процессом позной преднастройки для последующего движения тела, который не превышает 1.5 с [15]. Это противоречие можно объяснить разными физиологическими задачами, которые стояли перед испытуемыми – ответным движением в работе [15] и пассивным прослушиванием с поддержанием позы в нашем иследовании. В соответствии с инструкцией испытуемому в наших экспериментах не предполагалась ответная двигательная реакция на звук. Таким образом, выявленная нами динамика постуральных показателей не соответствует описанной в цитируемой выше работе преднастройке позы для формирования движения по физиологическим проявлениям, т.к. перед звуками шагов мы получили повышение устойчивости вместо дестабилизации.

При ожидании звуков приближающихся шагов наблюдалось снижение скорости перемещения ЦД и разброса в сагиттальной плоскости до 10% от первого к пятому периоду. Данные изменения, выявленные непосредственно перед прослушиванием приближающихся шагов, были сходны как по направлению, так и по величине с наблюдаемыми нами ранее изменениями показателей разброса и длины траектории в случае приближающихся непрерывных звуковых образов [16]. Ожидание звука вызывало практически одинаковые сдвиги постуральных показателей вне зависимости от характера звукового сигнала. Сходство результатов было обусловлено тем, что в обоих экспериментах реализовывалась непроизвольная подготовка к возможному контакту с биологически значимым приближающимся сигналом.

Реакции вертикальной позы в ответ на пассивное прослушивание звуков приближающихся сзади и спереди шагов проявлялись в сходном – на 8–10% увеличе-

нии показателей, характеризующих положение ЦД в сагиттальной плоскости, таких как длина траектории, скорость и разброс. По направлению и величине изменения, наблюдаемые нами в ответ на звуки приближающихся шагов, были близки к полученным ранее результатам для смещения ЦД при прослушивании приближающихся звуковых образов [2, 16]. Заметим, что в отличие от звуковых образов, которые формируют непрерывное движение источника, особенностью звуков шагов как акустического сигнала является их прерывистый характер – ритм шагов составлял около 2 шагов в секунду. Такой ритм формирует прерывистое движение и создает трудности у испытуемого в интерпретации направления движения. Вторая особенность конспецифического сигнала состоит в нерегулярном изменении амплитуды звука шагов, причем идентичные звуки шагов не интерпретируются как шаг, а только как стук [17]. Обе особенности конспецифического сигнала создают неопределенность при оценке стимула в течение продолжительного времени его звучания, что неизбежно должно отражаться в динамике постуральных показателей. Во время звучания шагов изменения показателей, характеризующих положение ЦД, происходили на протяжении 2–3 периодов наблюдения, т.е. в течение 16–24 с. При исследовании реакций позы на непрерывный приближающийся звуковой образ ранее нами также были получены медленные линейные тренды положения ЦД в 20-секундные интервалы [2], что свидетельствовало о длительном периоде развития постуральной реакции в ответ на звуковую информацию о движении объекта. Таким образом, ожидаемых нами принципиальных особенностей временной динамики постуральных реакций в ответ на действие конспецифического сигнала не было выявлено.

Влияние звуковой стимуляции на позу демонстрирует участие слуховой системы в пространственной ориентации. В частности, у пациентов с нарушением слуха наблюдаются характерные изменения позы [18, 19]. Результаты исследований влияния звуковой стимуляции на позу показали, что звуковые стимулы могут улучшать или ухудшать постуральную устойчивость [9]. В работах этого направления применяли разные методические приемы, в том числе способы подачи звука и звук разного перцептивного качества, что нередко приводило к противоречивым результатам. Подробный анализ влияния на позу пространственной составляющей слуховой информации дан в работе [9]. Как оказалось, существенное влияние имеет наличие движения источника звука и его направление, что было продемонстрировано результатами наших исследований [2, 3]. Если в работах [20, 21] неподвижные и регулярно вращающиеся источники звука оказывают стабилизирующее воздействие, то при перемещении источника звука в передне-заднем направлении, как и в нашем исследовании, обнаруживается увеличение постуральных качаний [1, 2].

По данным литературы интерпретация звуков шагов влияет не только на постуральные показатели, как было показно в наших экспериментах, но и на показатели собственного движения по принципу обратной связи. В случае ходьбы с обратной акустической связью, при которой имитировали звуки шагов по разным поверхностям (по бетону, по снегу, по беговой дорожке), был выявлен разный угол сгибания коленей в зависимости от типа поверхности [22]. В исследовании пациентов с кохлеарными имплантами также была показано влияние обратной связи по слуху на параметры ходьбы [23]. Таким образом, три перечисленных аспекта – контроль позы в ожидании звуковой информации о движении, поддержание позы при прослушивании движущихся источников звука, показанные в наших работах, включая настоящую, и формирование обратной связи с участием звуковой информации о собственном движении свидетельствуют об интеграции слуховой афферентации в мультисенсорную модель постурального контроля [24, 25].

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана средствами государственного бюджета по госзаданию (тема № АААА-А18-118013090245-6).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (И.Г.А., О.П.Т., А.П.Г.), сбор данных (О.П.Т.), обработка данных (О.П.Т.), написание и редактирование манускрипта (И.Г.А., О.П.Т., А.П.Г.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы статьи выражают благодарность Лаборатории физиологии движения Института физиологии им. И.П. Павлова РАН за предоставленную возможность выполнить работу на стабилографе “Стабилан 01”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Agaeva MY, Al’tman YA, Kirillova IY* (2006) Effects of a sound source moving in a vertical plane on postural responses in humans. Neurosci Behav Physiol 36: 773–780. https://doi.org/10.1007/s11055-006-0087-8
2. *Andreeva IG, Bobrova EV, Antifeev IE, Gvozdeva AP* (2018) Aftereffects of approaching and receding sound sources on postural responses in humans. Neurosci Behav Physiol 48: 45–53. https://doi.org/10.1007/s11055-017-0528-6
3. *Тимофеева ОП, Гвоздева АП, Боброва ЕВ, Андреева ИГ* (2020) Постуральные колебания у людей с разным когнитивным стилем при ожидании слуховой информации о движении. Журн высш нервн деят им ИП Павлова 70: 752–762. [*Timofeeva OP, Gvozdeva AP, Bobrova EV, Andreeva IG* (2020) Postural sway in humans with different cognitive styles at waiting auditory motion. Zhurn vyssh nervn deyat 70: 752–762. (In Russ)]. https://doi.org/10.31857/S0044467720060106
4. *Fawver B, Beatty GF, Naugle KM, Hass CJ, Janelle CM* (2015) Emotional state impacts center of pressure displacement before forward gait initiation. J Appl Biomech 31: 35–40. https://doi.org/10.1123/JAB.2013-0306
5. *Hillman CH, Rosengren KS, Smith DP* (2004) Emotion and motivated behavior: postural adjustments to affective picture viewing. Biol Psychol 66: 51–62. https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2003.07.005
6. *Lelard T, Krystkowiak P, Montalan B, Longin E, Bucchioni G, Ahmaidi S, Godefroy O, Mouras H* (2014) Influence of postural threat on postural responses to aversive visual stimuli. Behav Brain Res 266: 137–145. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.02.051
7. *Stins JF, Beek PJ* (2007) Effects of affective picture viewing on postural control. BMC Neurosci 8: 83. https://doi.org/10.1186/1471-2202-8-83
8. *Gea J, Munoz MA, Costa I, Ciria LF, Miranda JGV, Montoya P* (2014) Viewing pain and happy faces elicited similar changes in postural body sway. Plos One 9: e104381. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104381
9. Chen X, Qu X (2017) Influence of affective auditory stimuli on balance control during static stance. Ergonomics 60: 404–409. https://doi.org/10.1080/00140139.2016.1182649.
10. *Bidet-Caulet A, Voisin J, Bertrand O, Fonlupt P* (2005) Listening to a walking human activates the temporal biological motion area. Neuroimage 28: 132–139. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2005.06.018
11. *Orlov V, Gvozdeva A, Zavyalova V, Ushakov V, Andreeva I* (2016) Neural substrates of the auditory motion aftereffect: a functional MRI study. Proc Comp Sci 88: 282–287. https://doi.org/10.1016/j.procs.2016.07.436

12. *Andreeva IG, Orlov VA, Ushakov VL* (2018) Activation of multimodal areas in the human cerebral cortex in response to biological motion sounds. J Evol Biochem Phys 54: 363–373. https://doi.org/10.1134/S0022093018050046
13. *Holten V, Smagt MJ, Donker SF, Verstraten FAJ* (2014) Illusory motion of the motion aftereffect induces postural sway. Psychol Sci 25: 1831–1834. https://doi.org/10.1177/0956797614540177
14. *Keith RW* (2000) Development and standardization of SCAN-C test for auditory processing disorders in children. J Am Acad Audiol 11: 438–445. PMID: 11012239
15. *Watanabe T, Saito K, Ishida K, Tanabe S, Nojima I* (2017) Auditory stimulus has a larger effect on anticipatory postural adjustments in older than young adults during choice step reaction. Eur J Appl Physiol 117: 2409–2423. https://doi.org/10.1007/s00421-017-3727-5
16. *Timofeeva OP, Gvozdeva AP, Bobrova EV, Andreeva IG* (2019) Anticipatory postural adjustments for auditory motion information. J Evol Biochem Phys 55: 502–505. https://doi.org/10.1134/S0022093019060097
17. *Kozhevnikova EV* (1989) Perception of sounds of approaching and receding steps, conditions for the emergence of a perceptive effect of movement. Sens Sist 3: 93–100.
18. *Lin FR, Ferrucci L* (2012) Hearing loss and falls among older adults in the united states. Arch Int Med 172: 369–371. https://doi.org/10.1001/archinternmed.2011.728
19. *Rumalla K, Karim AM, Hullar TE, Thomas E, Martines F, Bianco A, Messina G, Giustino V, Zangla D, Iovane A, Palma A* (2018) Decreased postural control in people with moderate hearing loss. Medicine (Baltimore) 97: e0244. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000010244
20. *Gandemer L, Parseihian G, Bourdin C, Kronland-Martinet R* (2016) Sound and posture: an overview of recent findings. CMMR hal-01311011. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67738-5_5
21. *Zhong X, Yost WA* (2013) Relationship between postural stability and spatial hearing. J Am Acad Audiol 24: 782–788. https://doi.org/10.3766/jaaa.24.9.3
22. *Turchet L, Camponogara I, Cesari P* (2015) Interactive footstep sounds modulate the perceptual motor aftereffect of treadmill walking. Exp Brain Res 233: 205–214. https://doi.org/10.1007/s00221-014-4104-9
23. *Camponogara I, Turchet L, Carner M, Marchioni D, Cesari P* (2016) To hear or not to hear: sound availability modulates sensory-motor integration. Front Neurosci 10: 22. https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00022
24. *Maurer C, Mergner T, Peterka R* (2006) Multisensory control of human upright stance. Exp Brain Res 171: 231–250. https://doi.org/10.1007/s00221-005-0256-y
25. *Assländer L, Hettich G, Mergner T* (2015) Visual contribution to human standing balance during support surface tilts. Hum Mov Sci 41: 147–164. https://doi.org/10.1016/j.humov.2015.02.010

Dynamics of Postural Indicators When Listening to Steps Approaching from the Front and from Behind

O. P. Timofeeva[a], I. G. Andreeva[a, *], and A. P. Gvozdeva[a]

[a] *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

**e-mail: ig-andreeva@mail.ru*

In the study the hypothesis was tested on substantial difference between postural reactions to conspecific auditory motion information and previously shown postural reactions to continuous sound images moving in the same direction. Postural indices were obtained for 14 subjects with normal hearing in case of passive listening with their eyes closed to human steps sounds played back in free field via loudspeakers placed in front of and behind the subject. The indices were assessed in 8-s periods for 40 s before, 24 s during and 32 s after listening to steps sounds. When waiting for the sounds of approaching steps up to 10% decrease in the center of pressure (CoP) velocity and its spread in the sagittal plane were shown in fifth period compared to first period of CoP recording. Moreover, integral indices of CoP position showed increasing postural stability, which

was more prominent for steps presented behind the subject than in front. Postural reactions on steps approaching from behind and in front of the subject were the same with regard to 8–10% increase of indices, characterizing CoP position in the sagittal plane (CoP trajectory length, velocity and spread) compared to the last period of waiting. Statistically significant difference in postural responses to steps approaching from behind and from the front was found only for CoP shift: directions of the shift were opposite – when the steps were approaching from the front, subjects leaned back, while during listening to steps sounds approaching from behind they leaned forward. When the stimulation was finished, CoP position returned to its initial value before the stimulation. Postural responses on approaching steps sounds were not substantially different from the corresponding responses on the continuous approaching sound image by both direction and magnitude of changes of postural indices characterizing CoP position.

Keywords: postural control, sound source motion, conspecific signal, spatial orientation, anticipation, sound source movement