

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Возможности и перспективы поведенческого теста “Водный лабиринт Морриса” <i>Д. П. Чернюк, А. В. Большакова, О. Л. Власова, И. Б. Безпрозванный</i>	267
Физиологические механизмы действия салицилатов на сердечно-сосудистую систему <i>Е. Н. Чуян, И. С. Миرونюк, И. В. Черетаев, М. Ю. Раваева, Т. В. Гришина</i>	288

Экспериментальные статьи

Функциональная активность звеньев стресс-реализующей и стресс-лимитирующей систем в условиях светового десинхрониза <i>О. В. Злобина, А. О. Москвина, А. Н. Иванов, И. О. Бугаева</i>	312
Динамика метаболических показателей у крыс на разных стадиях постстрессорного периода в условиях антигенного воздействия при введении липополисахарида <i>С. С. Перцов, И. В. Алексеева, А. Ю. Абрамова, Е. В. Никенина, А. Ю. Козлов, Е. В. Коплик, А. С. Мартюшева</i>	321
Пифитрин-альфа тормозит дифференцировку вновь образованных клеток субгранулярной зоны зубчатой извилины у крыс линии Крушинского—Молодкиной при аудиогенном киндлинге <i>А. А. Куликов, Е. В. Наслузова, Н. А. Дорофеева, М. В. Глазова, Е. А. Лаврова, Е. В. Черниговская</i>	332
Влияние малых доз L-тироксина на устойчивость к стрессу животных с экспериментально вызванным дефицитом симпатических нервных влияний <i>Е. А. Гусакова, И. В. Городецкая</i>	352
Эффекты фазовых сдвигов чрескожной электрической стимуляции спинного мозга на кинематические характеристики шагательных движений у человека <i>И. Н. Богачева, Н. А. Щербакова, А. А. Гришин, Ю. П. Герасименко</i>	374
Сравнение способности к обучению макаков резусов (<i>Macaca mulatta</i>) и павианов гамадрилов (<i>Papio hamadryas</i>) в свете создания модели когнитивной эволюции приматов <i>А. Е. Аникаев, В. Г. Чалян, Н. В. Мейшвили, Е. Н. Аникаева</i>	382

CONTENTS

Reviews

Opportunities and Prospects of the Behavioral Test "Morris Water Maze"	
<i>D. P. Chernyuk, A. V. Bol'shakova, O. L. Vlasova, and I. B. Bezprozvanny</i>	267
Physiological Mechanisms of Salicilates Action on the Cardiovascular System	
<i>E. N. Chuyan, I. S. Mironyuk, I. V. Cheretaev, M. Yu. Ravaeva, and T. V. Grishina</i>	288

Experimental Articles

Functional Activity of Lines of Stress-Realizing and Stress-Limiting Systems under Light Desynchronization	
<i>O. V. Zlobina, A. O. Moskvina, A. N. Ivanov, and I. O. Bugaeva</i>	312
Metabolic Parameters in Rats at Various Stages of the Post-Stress Period under Conditions of Antigenic Exposure by Administration of Lipopolysaccharide	
<i>S. S. Pertsov, I. V. Alekseeva, A. Yu. Abramova, E. V. Nikenina, A. Yu. Kozlov, E. V. Koplik, and A. S. Martyusheva</i>	321
Pifitrin- α Decreases Neuronal Differentiation of Newborn Cells in Subgranular Zone of Dental Gyrus at Initial Stages of Audiogenic Kindling in the Krushinsky–Molodkina Rats	
<i>A. A. Kulikov, E. V. Nasluzova, N. A. Dorofeeva, M. V. Glazova, E. A. Lavrova, and E. V. Chernigovskaya</i>	332
Effect of Low Doses of L-Thyroxine on Stress Resistance in Animals with Experimentally Induced Deficits of Sympathetic Nervous Influences	
<i>E. A. Gusakova, I. V. Gorodetskaya</i>	352
Effects of Phase Shifts of Transcutaneous Electrical Spinal Cord Stimulation on the Kinematic Characteristics of Stepping Movements in Humans	
<i>I. N. Bogacheva, N. A. Scherbakova, A. A. Grishin, and Yu. P. Gerasimenko</i>	374
Comparison of the Learning Ability of <i>Macaca mulatta</i> and <i>Papio hamadryas</i> in Light of Creating a Model of Cognitive Evolution in Primates	
<i>A. E. Anikayev, V. G. Chalyan, N. V. Meishvili, and E. N. Anikaeva</i>	382

ОБЗОРЫ

**ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ
ПОВЕДЕНЧЕСКОГО ТЕСТА “ВОДНЫЙ ЛАБИРИНТ МОРРИСА”**

© 2021 г. Д. П. Чернюк^{1, *}, А. В. Большакова¹,
О. Л. Власова¹, И. Б. Безпрозванный^{1, 2, **}

¹*Санкт-Петербургский политехнический университета Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия*

²*Отделение физиологии Юго-западного медицинского центра Техасского университета,
Даллас, США*

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

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

Поступила в редакцию 30.11.2020 г.

После доработки 18.12.2020 г.

Принята к публикации 19.12.2020 г.

Поведенческий тест “Водный лабиринт Морриса” является универсальным способом изучения когнитивных функций у подопытных грызунов, особенно он эффективен при выявлении отклонений функций памяти и обучения, что делает его незаменимым при исследовании старения, инсульта, нейродегенеративных заболеваний, влияния терапевтических препаратов и т.д. Однако данный тест может быть намного более информативным инструментом анализа поведения подопытных животных, чем кажется на первый взгляд. Формирование, консолидация памяти и обучение — довольно сложные процессы, которые главным образом задействуют гиппокамп, но и кроме него в этих процессах участвуют многие зоны мозга. Различные протоколы этого теста настолько чувствительны к изменениям нормальной функции различных областей мозга, не только гиппокампа, что их можно использовать в качестве “индикатора” нормального функционирования когнитивных функций. Таким образом, разные модификации “Водного лабиринта Морриса” включают различные механизмы навигации, обучения и памяти, а результаты этих тестов и их правильный анализ могут дать очень много информации о поведении лабораторных животных. В данной обзорной статье мы приводим перечень наиболее популярных методик проведения процедуры “Водного лабиринта Морриса” и разбираем, какие информативные параметры могут помочь исследователю в анализе результатов данного теста.

Ключевые слова: водный лабиринт Морриса, поведенческий тест, автоматизированный анализ, трекинг

DOI: 10.31857/S0869813921030043

ВВЕДЕНИЕ

Головной мозг — самая таинственная и загадочная структура человеческого организма. Несмотря на то, что его строение уже достаточно хорошо изучено, до сих пор функционирование мозга в большей степени остается для человечества загадкой. Обучение и память являются одними из самых сложных и малопонятных функций человеческого мозга. А самой важной для формирования и консолидации

памяти частью мозга считается гиппокамп. Британский нейробиолог Ричард Грэм Майкл Моррис посвятил свою научную деятельность изучению функционирования гиппокампа и в начале 1980-х первым описал процедуру водного лабиринта в открытом поле для грызунов [1, 2]. Идея данного поведенческого теста достаточно проста: животных, обычно крыс или мышей, помещают в большой круговой бассейн с водой, и им необходимо выбраться на скрытую под поверхностью воды платформу. Новизна данной методики заключалась в том, что пройти этот тест возможно только с использованием пространственной памяти, так как никаких локальных сигналов нет — грызунам необходимо определить по памяти местоположение объекта, который они никогда не видели, не чуяли и не могли услышать. После первых публикаций эта методика быстро набрала популярность в нейробиологических исследованиях, в том числе благодаря исследованиям канадской группы ученых во главе с Яном Уишоу [3], стала именоваться “Водным лабиринтом Морриса” (Morris Water Maze, MWM) и приобрела множество различных технических вариаций [4–9]. К преимуществам данной методики можно отнести высокую надежность в широком диапазоне конфигураций водных резервуаров и процедур проведения испытаний, его межвидовую утилитарность (крысы, мыши и даже люди — в виртуальном лабиринте [10]), многочисленные свидетельства его эффективности в качестве способа изучения гиппокамп-зависимой пространственной навигации и “референс” памяти [11–13], а также его относительную невосприимчивость к мотивационным факторам проводимых экспериментов [5]. Таким образом, “Водный лабиринт Морриса” стал золотым стандартом для изучения пространственной памяти и процессов обучения, он входит в перечень необходимых тестов для фенотипирования мутантных и трансгенных мышей [14], а также часто используется в качестве общего анализа когнитивной функции [4], например, для тестирования воздействия различных нарушений нервной системы, таких как модели инсульта на животных [15], старения [16], нейродегенеративных заболеваний [17–22] или потенциального воздействия новых терапевтических препаратов [23]. Главным параметром оценки процессов обучения и памяти во всех этих протоколах является латентный период нахождения платформы испытуемым животным, кроме того, показательным параметром служит и сама траектория плавания до платформы. Так как в век цифровых технологий визуальная регистрация является достаточно необъективной и неточной методикой изучения поведения, широкое распространение получила автоматическая трассировка перемещения животного с помощью присоединенной к компьютеру цифровой видеокамеры [24–26]. Значительным плюсом автоматизации видеонаблюдения и анализа является надежность и последовательность алгоритма, чего сложно достичь при визуальной и ручной обработке данных, тем более, если речь идет о длительных периодах времени. Кроме того, использование автоматизированного анализа дает возможность более качественно и всесторонне анализировать полученные экспериментальные данные, например, путем более сложного обсчета траектории движения подопытного животного, тем самым позволяя выйти за рамки первоначальной поставленной перед MWM-тестом задачи исследования только пространственной памяти. Настоящий обзор нацелен на обсуждение наиболее часто применяемых протоколов проведения поведенческого теста MWM, анализ его классических и современных параметров, а также возможностей, которые можно получить с использованием автоматического анализа полученных данных (в том числе, с помощью разработанного авторами программного продукта).

ВОДНЫЙ ЛАБИРИНТ МОРРИСА И ЕГО МОДИФИКАЦИИ

Процедура “Водного лабиринта” используется для изучения процесса обучения с начала XX века [27–29]. Температура воды и ее повышение, когда грызуны выбирают из всех секторов более теплый [30], а также “способность к плаванию” влияют на скорость обучения в простых тестах [31]. В этих и более усовершенствованных процедурах “Водного лабиринта Морриса” животных не нужно лишать пищи, чтобы мотивировать обучение, или проводить обширную предварительную подготовку, также исключается использование удара током для мотивирования, как, например, в поведенческих тестах, направленных на формирование условных рефлексов, таких как “Условный рефлекс активного избегания” (“active avoidance”) и тест “Условного рефлекса страха” (“fear conditioning”). Крысы и мыши являются естественными пловцами и легко выполняют задачу нахождения скрытой под водой спасательной платформы, даже если они перенесли мозговые поражения различного типа [2]. Вода обеспечивает хороший контроль возможных обонятельных сигналов и позволяет проводить разнообразные обучающие процедуры, чтобы разделить эффекты обучения и работоспособности. Типичные испытания в водном лабиринте ограничены 60-ю с, в то время как испытания в сухом лабиринте часто длятся намного дольше. Это позволяет повысить пропускную способность и эффективность “Водного лабиринта Морриса” [32]. Однако он также имеет определенные ограничения, одним из которых является тот факт, что различные компоненты памяти, то есть “референс” и рабочая память, не могут быть проверены одновременно [33]. Кроме того, для данного теста важным фактором является стабильное положение достаточного количества визуальных ориентиров, так как основная задача MWM — это изучение пространственной памяти. Благодаря своим особенностям “Водный лабиринт Морриса” является универсальным средством для решения множества различных задач [34].

Самая простая задача — это обучение поиску скрытой под водой спасательной платформы в одном фиксированном месте, часто включается в серию иногда довольно сложных протоколов обучения и тестирования для исследования конкретных теоретических вопросов. Разные протоколы задействуют разные механизмы навигации, обучения и памяти. Далее рассмотрим основные из них.

1. Пространственная “референс” память

Самый простой и широко используемый протокол проведения поведенческого теста “Водный лабиринт Морриса” заключается в использовании замутненной воды и скрытой под ее поверхностью (на 0.5–2.0 см) платформы, которая находится в фиксированном месте по отношению к внешним визуальным сигналам, обычно это середина одного из четырех квадрантов бассейна (рис. 1). Во время обучающих испытаний животных помещают в воду в одной из четырех точек у стенки бассейна, головой от центра. Местоположение этих точек выбирается произвольно, но аналогично направлениям сторон света, т.е. крестообразно, и обычно обозначаются N, E, S и W (рис. 1B). Часто стартовые позиции совмещаются с местоположением дополнительных контрастных черно-белых ориентиров четырех типов (ключей MWM), которые используются для стандартизации визуальных сигналов при проведении “Водного лабиринта Морриса”. С животными проводят серию ежедневных испытаний с использованием случайного или полуслучайного набора начальных местоположений. Полуслучайные наборы стартовых позиций являются наиболее распространенными: используются четыре позиции с тем ограничением, что один тест каждый день проводится с каждой из четырех позиций [5].

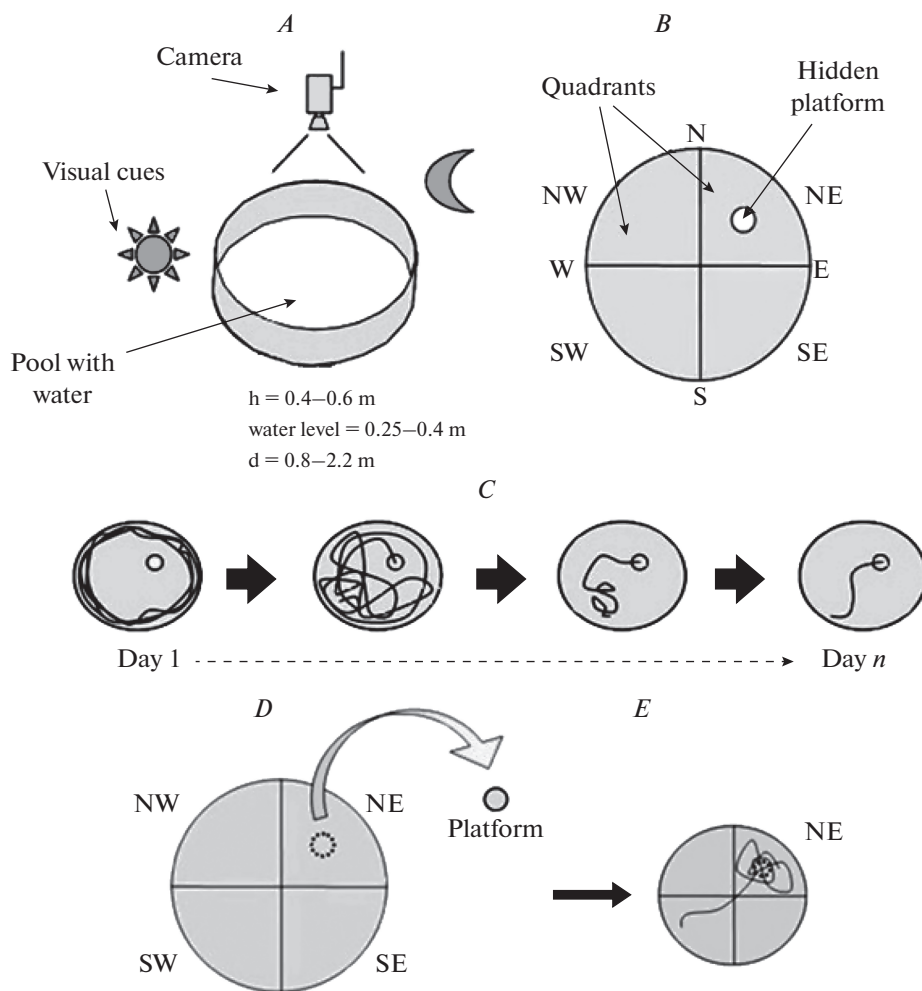


Рис. 1. Стандартный протокол проведения “Водного лабиринта Морриса”. *A* – конфигурация оборудования и основные параметры бассейна. *B* – воображаемое разделение площади бассейна на квадранты (NW, NE, SE и SW) и начальные положения испытуемого животного (N, E, S и W). Показан пример расположения скрытой платформы в центре одного из четырех квадрантов бассейна. *C* – пример изменения траектории плавания грызуна в ходе обучающих испытаний. *D* – пробное испытание в стандартном протоколе проведения “Водного лабиринта Морриса”. Воображаемое разделение площади бассейна на квадранты (NW, NE, SE и SW) и пример положения, где во время тренировочных испытаний располагалась платформа. *E* – пример траектории плавания грызуна в ходе пробного испытания.

Fig. 1. Standard protocol for conducting the “Morris Water Maze” test. *A* – Equipment configuration and basic parameters of the pool. *B* – The imaginary division of the pool into quadrants (NW, NE, SE и SW) and the initial positions of the test animal (N, E, S и W). An example of the location of a hidden platform in the center of one of the four pool quadrants. *C* – An example of changes in the rodent swimming trajectory during training trials. *D* – Probe trial in the standard protocol for conducting the “Morris Water Maze”. The imaginary division of the pool into quadrants (NW, NE, SE и SW) and an example of the position where the platform was located during training trials. *E* – An example of a rodent trajectory during a trial test.

Встречаются исследования, где используются восемь стартовых локаций [35]. Подопытные быстро учатся находить фиксированную платформу: с каждым испытанием уменьшается время ее поиска, а траектории плавания становятся более короткими и прямолинейными (рис. 1С). В процессе испытания система слежения фиксирует сокращение времени поиска платформы и уменьшение длины пути, а также изменения таких параметров как скорость плавания, направленность относительно местоположения платформы и так далее. Наблюдение за животными показывает, что, забравшись на спасательную платформу, они часто встают и оглядываются, словно пытаясь определить свое местоположение в пространстве. Обучение проводится ежедневно в течение от 2 до 14 дней и состоит из 3–6 процедур для каждого животного в день.

После окончания обучения через 24 ч проводится однократное тестирование поведения животного в бассейне в условиях отсутствия спасательной платформы — животное запускается в бассейн на определенное время, после истечения которого испытание заканчивается (рис. 1D, E). В данной процедуре происходит оценка так называемой “силы памяти”, т.е. насколько хорошо животное запомнило место локализации платформы из предыдущих обучающих испытаний. Для измерения чаще всего используют параметр времени, проведенного грызуном в квадранте, где раньше находилась платформа. Более сложные измерения включают среднее расстояние положения животного от местоположения платформы (индекс обучения) [36, 37] или число пересечений местоположения платформы и др. Многие из этих измерений включают видеозапись поведения грызуна и применение компьютерного программного обеспечения для анализа полученных данных [32]. Иногда проводятся промежуточные пробные испытания, например, после каждых 2–3 дней обучения. Тогда результаты этих пробных испытаний можно использовать в качестве показателя скорости обучения [38].

Нередко, как и в исследовании Морриса в 1981 г., в течение 1–2 дней проводятся предварительные ознакомительные процедуры, для чего грызунов помещают на 180 с в бассейн с замутненной водой, но без платформы. В этих предварительных испытаниях делаются только качественные наблюдения [1], например, тестируется зрение и умение животных плавать.

2. Рабочая память

Данная модификация проведения теста отличается от базовой тем, что платформа помещается в одну из четырех новых позиций каждый день тестирования, при этом проводятся только 2 испытания в день для каждого животного, таким образом создается так называемая процедура “отложенного сопоставления с местом” (“delayed matching to place”, DMP) (рис. 2). Главный вопрос, которым задается исследователь, заключается в том, может ли грызун показать улучшенный результат в испытании № 2, основываясь на опыте из испытания № 1 [4, 39]. Такая процедура обучения считается аналогичной быстрому процессу приобретения воспоминаний, задействует рабочую память. По сути, эта процедура позволяет изучать повторяющиеся случаи обучения за одно испытание. Интервал между испытаниями № 1 и № 2 (intertrial interval) может затем систематически изменяться, что помогает выявить, насколько хорошо работает кратковременная пространственная память [8].

К конфигурации “Водного лабиринта Морриса”, в которой испытуемые вынуждены использовать рабочую память, можно отнести “on demand” процедуру (или процедура “по требованию”). Данная разновидность проведения теста была представлена в публикации чешских ученых 1985 г. [6]. Стандартная подводная платформа была заменена складной (платформа “по требованию”, или платформа At-

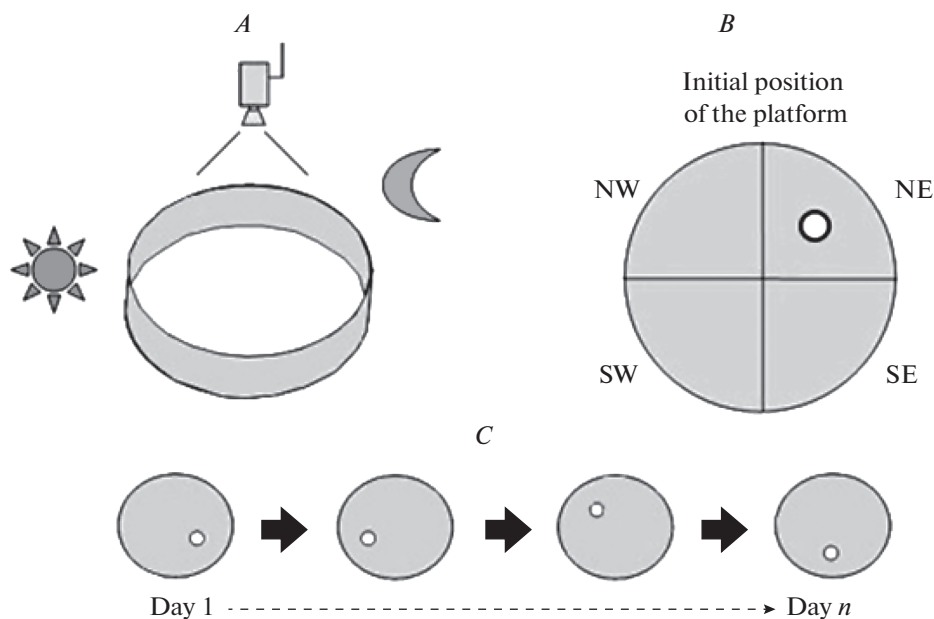


Рис. 2. Протокол проведения “Водного лабиринта Морриса” для изучения рабочей памяти подопытного животного. *A* – конфигурация оборудования. *B* – воображаемое разделение площади бассейна на квадранты и начальное положение скрытой платформы в центре одного из четырех квадрантов. *C* – пример изменения местоположения скрытой платформы в каждый из дней проводимых испытаний.

Fig. 2. The protocol of the “Morris Water Maze” to study the working memory of the experimental animal. *A* – Equipment configuration. *B* – The imaginary division of the pool into quadrants and the example of hidden platform initial position in the center of one of the four quadrants. *C* – An example of a change in the location of a hidden platform in each of the testing days.

lantis, названная в честь потерянного города), чтобы предотвратить случайное обнаружение скрытой цели. Платформу поднимали под поверхность воды только после того, как животное оставалось в целевой области в течение заранее определенного времени. Если это время истекало, но критерий не был достигнут, платформу поднимали и помещали на нее подопытную крысу.

В работах Бурешовой выполнение задания со складной платформой происходило со скоростью, аналогичной скорости с жесткой платформой, когда условия критерия были легкими (расстояние до целевой области – 15 см, время – 2.5 с), но постепенно ухудшались, так как время в целевой области увеличивалось до 10 с. Бурешова и соавторы пришли к выводу, что применение модифицированной методики позволяет исследовать тонкую структуру когнитивных карт и их изменений, вызванных различными вмешательствами [4, 6]. Также эта процедура приводит к приобретению высокосфокусированной стратегии поиска, ориентированной на целевое местоположение во время обучения [40].

3. Обратное обучение

Многие из протоколов проведения теста включают в себя скрытое перемещение спрятанной платформы. Так, например, в процедуре обратного обучения (или переобучения) после проведения ряда обучающих испытаний с фиксированной

платформой она перемещается в другой сектор бассейна. Поскольку платформа остается спрятанной, для животного не очевидно, что что-то изменилось, до тех пор, пока оно не обнаруживает отсутствие платформы на своем обычном месте. Основное внимание уделяется тому, как животное реагирует на это изменение и как быстро оно находит новое место. Повторное обучение, которое происходит в протоколе обратного обучения, использовалось в анализе основных генетических факторов, определяющих поведение разных линий мышей [41].

4. Обучение распознаванию

Эта процедура была разработана для изучения процесса пространственного и непространственного распознавания. В этой конфигурации используются две видимые платформы: одна стандартная, а другая плавающая. При обучении пространственному распознаванию стандартная платформа определялась ее положением в пространстве, в то время как при обучении визуальному распознаванию стандартная платформа отличалась своей яркостью или рисунком, при этом исключались лишние сигналы лабиринта. В дополнение к обычным параметрам также учитывается мера первого выбора между двумя платформами. Было обнаружено, что обучение пространственному распознаванию происходит быстрее, чем обучение визуальному распознаванию, в отличие от данных более ранних работ Морриса [1], в которых обучение по меткам происходило быстрее, чем обучение по локализации (следует помнить, что процедура обучения и характеристики платформ различны в двух задачах). Также была предпринята попытка объединить протоколы, направленные на изучение пространственной памяти и процессов распознавания: рабочую память изучали в двухплатформенном обучающем протоколе, в котором местоположение “правильной” платформы ежедневно изменялось в произвольном порядке [42].

5. Некартографические стратегии

Изначально “Водный лабиринт Морриса” был разработан для изучения пространственной памяти грызунов, однако у подопытных животных есть и другие, не связанные с пространственным ориентированием стратегии, при помощи которых осуществляется решение задачи навигации [43]. Например, крыса может научиться делать определенную последовательность движений — рабочая стратегия. Эта стратегия эффективна только в том случае, если отправная точка и цель всегда фиксированы относительно друг друга. В качестве альтернативы крыса может научиться подходить к определенным локальным (проксимальным) сигналам, связанным с целью — таксис-стратегия. Однако в этом случае крыса может достичь непосредственно цели только с места, откуда видны локальные сигналы. Используя различные варианты процедуры проведения тестирования, можно продемонстрировать приобретение этих стратегий, а также стратегию картографирования: изучение относительного местоположения объектов в ближайшем окружении и прямой переход к цели из любой начальной точки. Крысы могут приобретать как картографические, так и некартографические стратегии и применять их, когда этого требуют особые ситуации, например, если расположение платформы случайное, если недостаточно локальных сигналов, а иногда в качестве дополнительной стратегии к стратегии картографирования. Было высказано предположение, что грызуны одновременно используют ряд поведенческих стратегий, включая ответы по положению, ответы по меткам и ответы по месту [7]. Последние исследования показывают, что поисковая стратегия мыши, выражающаяся в определенном паттер-

не движения, несет важную информацию о ее когнитивных функциях, но тем не менее, все еще малое количество исследований используют данный параметр в своих работах [44].

6. Другие модификации

Другие варианты проведения “Водного лабиринта Морриса” включают в себя такие изменения, как ограничение траектории плавающего животного для минимизации навигационных требований (например, кольцевой водный лабиринт [9]), уменьшение количества доступных внешних сигналов между обучением и пробным тестированием [8], использование плавающих платформ и другие манипуляции. Также был разработан радиальный водный лабиринт, сочетающий достоинства радиального лабиринта с простотой подготовки и проведения водного лабиринта. Такая методика часто используется при тестировании трансгенных мышей, имеющих наследственную форму болезни Альцгеймера [45].

Краткая информация об особенностях упомянутых в этом разделе модификаций проведения поведенческого теста “Водный лабиринт Морриса” представлена в табл. 1.

Как видно из вышесказанного, поведенческий тест “Водный лабиринт Морриса” имеет значительное число модификаций, мы упомянули лишь самые популярные из них. Такое разнообразие протоколов проведения теста направленно на решение множества исследовательских задач, однако кроме правильной процедуры проведения теста важно иметь возможность максимально эффективно и информативно анализировать полученные при помощи выбранного протокола данные. Для этой цели существуют специальные параметры, некоторые из них довольно просты и их вычисление возможно вручную, другие же — требуют специальных сложных вычислений, для которых используют программные продукты, зато отличаются большей точностью и информативностью.

ПАРАМЕТРЫ

Первым и наиболее часто используемым параметром для оценки процессов обучения и запоминания во всех модификациях протокола проведения “Водного лабиринта Морриса” является время, за которое подопытное животное находит платформу. Этот параметр обычно называют временем задержки, или *латентным временем* поиска платформы. Он является самым простым и легко регистрируемым параметром, для которого необходимо только наличие таймера, измеряющего время от начала плавания животного до нахождения им платформы. В этом случае регистрация траектории плавания грызуна, скорости и пройденного им расстояния не обязательна, и на данный момент многие исследователи из-за недоступности трекинговых программ вынуждены ограничивать свои работы только этим параметром. Однако для более объективной оценки поведения и различных когнитивных процессов латентного времени поиска платформы недостаточно, и многие ученые отмечали, что на само время задержки влияют другие переменные, кроме мнемонических функций, и оно может варьироваться по причинам, не связанным со способностью животного к обучению [32, 36, 46]. Кроме того, использование данного параметра невозможно при пробных испытаниях, когда платформы вообще нет в бассейне. Некоторые современные исследования стали использовать вместо латентного времени нахождения животным платформы длину проделанного им пути, что стало возможным с использованием трекинговых программ, отслежи-

Таблица 1. Общая краткая информация различных модификаций “Водного лабиринта Морриса”
Table 1. General summary of various modifications of the “Morris Water Maze”

Задача Task	Модификации MWM Modification of MWM	Особенности протокола Protocol features	Задельствованные зоны мозга Involved brain areas
“Референс” память “Reference” memory	Стандартный протокол [1, 5] Standard protocol [1, 5]	Несколько дней обучающих испытаний, в конце – одно пробное. Во время обучающих – платформа фиксирована в одном месте, не видна, вода непрозрачна. Во время пробного – платформа изымается Several days of training trials, at the end – one of probe trial. During training – the platform is fixed in one place, not visible, the water is opaque. During the probe trial – the platform is removed	Гиппокамп, неокортекс, кора (лобная доля) Hippocampus, neocortex, cortex (frontal lobe)
Рабочая память Working memory	“Отложенное сопоставление с местом” (DMP) [8, 39] “Delayed matching to place” (DMP) [8, 39]	Платформа перемещается на новую позицию каждый день тестирования, проводится только 2 испытания в день The platform is moved to a new position every day of testing, only 2 tests per day are performed	Гиппокамп, кора (затылочная, теменная доли) Hippocampus, cortex (occipital, parietal lobe)
Обратное обучение Retraining	“По требованию” [6, 40] “On demand” [6, 40]	Стандартная платформа заменяется складной и предъявляется при нахождении животного в целевой области в течение определенного времени The standard platform is replaced by a folding one and is presented when the animal is in the area for a set time	Гиппокамп, кора (затылочная, теменная доли) Hippocampus, cortex (occipital, parietal lobe)
Обучение распознаванию Recognition training	Протокол переобучения [41] Retraining protocol [41]	После проведения обучающих испытаний с фиксированной платформой она перемещается на другую позицию After training tests with a fixed platform, it is moved to another position	Дорсо-медиальный таламус, кора (лобная доля), хвостатое ядро стриатума Dorso-medial thalamus, cortex (frontal lobe), caudate nucleus of the striatum
Некартографические стратегии Non-cartographic strategies	Двухплатформенный обучающий протокол [1, 42] Two-platform training protocol [1, 42]	Используются две видимые платформы: одна стандартная, а другая плавающая. Они могут выглядеть идентично, или быть визуально разными для анализа пространственного или визуального распознавания There are two visible platforms, one standard and the other floating. They may look identical or be visually different for analysis of spatial or visual recognition	Гиппокамп, кора, вентральная область покрышки, неокортекс, базальные ядра Hippocampus, cortex, ventral tegmental region, neocortex, basal nuclei
Другие Others	Различные варианты процедур Various options for procedures	Например, случайное расположение платформы или скудность локальных сигналов [7] For example, random platform arrangement or scarcity of local signals [7]	Различные зоны мозга Different areas of the brain
	Множество различных модификаций Many different modifications	Например, кольцевой водный лабиринт [9] или уменьшение внешних сигналов между обучением и пробным испытанием [8] For example, a circular water maze [9] or a decrease in external signals between training and probe trials [8]	Различные зоны мозга Different areas of the brain

вающих движение животного. Однако и этот параметр сильно зависит от индивидуальных особенностей локомоторных функций животного.

Вторым по популярности использования параметром является *процентное время плавания* грызуна в *квадранте*, где находится спрятанная платформа. Чаще данную меру используют в пробных испытаниях, когда после обучения платформа из бассейна изымается. Также вместо квадранта нередко используют круговую зону вокруг места, где стояла платформа. Равносильным этому параметру считают *количество пересечений животным зоны*, где раньше находилась поверхность платформы. Эти меры более характерны для целевого поиска местоположения, но они все же не являются достаточно надежными. Например, две крысы могут проводить одно и то же время в целевом квадранте, но одна может искать более близко к фактическому местоположению платформы [36, 46]. Аналогично, крыса может искать в узком круге очень близко к месту локализации платформы, но не может пересечь это место. Кроме того, для этих параметров недостаточно вариативности внутри испытываемой группы животных, необходимое для надежного корреляционного анализа с другими поведенческими или нейробиологическими маркерами.

Чтобы лучше охарактеризовать стратегию поиска, которую животное использует в обучающих испытаниях, был введен *индекс обучения* (learning index или близость Галлахера, Gallagher's proximity) [37] — средняя мера близости, которая опирается на постоянную оценку расстояния между местоположением платформы и животным, в пробных испытаниях — между животным и местом, где платформа раньше находилась (рис. 3А). В оригинальной статье 1993 г. близость вычислялась десять раз в секунду, а среднее значение принималось каждую секунду. В настоящее время повышения частоты вычисления и, соответственно, качественного измерения можно добиться с использованием компьютерного анализа. Из этого параметра можно получить дополнительную переменную — *кумулятивную ошибку поиска* [36] (рис. 3В). В обучающих или пробных испытаниях кумулятивная ошибка поиска вычисляется путем суммирования средней секундной близости животного к платформе. Кумулятивная ошибка поиска является более чувствительным показателем пространственной памяти. Расстояние между начальной точкой плавания грызуна и местоположением платформы иногда вычитается из кумулятивной ошибки поиска, чтобы нормализовать параметр по различным начальным местоположениям. Чувствительность этих параметров позволяет лучше определить даже небольшие различия в поведении.

Также для контроля динамики обучения подопытных животных можно воспользоваться индексами приобретения (acquisition index) и сохранения (savings index) [47, 48]. *Индекс приобретения* — мера обучения в течение дня, высчитанная с использованием первого и последнего латентного времени поиска платформы в испытаниях обучающей сессии, и усредненная за все дни обучения. *Индекс сохранения* — мера консолидации и сохранения памяти животного, основанная на вычислении разности латентного времени между последним испытанием данного дня обучения и первого испытания следующего дня, усредненное по всем дням.

Еще одним интересным и показательным параметром для оценки поведения животного в “Водном лабиринте Морриса” является *ошибка Уишоу* (Whishaw's error) — отклонение направления плавания грызуна от корректного направления к платформе [49, 50]. Для расчета данного параметра строится воображаемый коридор с произвольной шириной, которая определяется исследователем. Центральная линия этого коридора является прямой, соединяющей начальное положение испытываемого животного с местоположением платформы (рис. 4А). Рассчитывается процент времени, проведенного животным в воображаемом коридоре. Основываясь на данном параметре, можно разделить испытания на удачные, в которых жи-

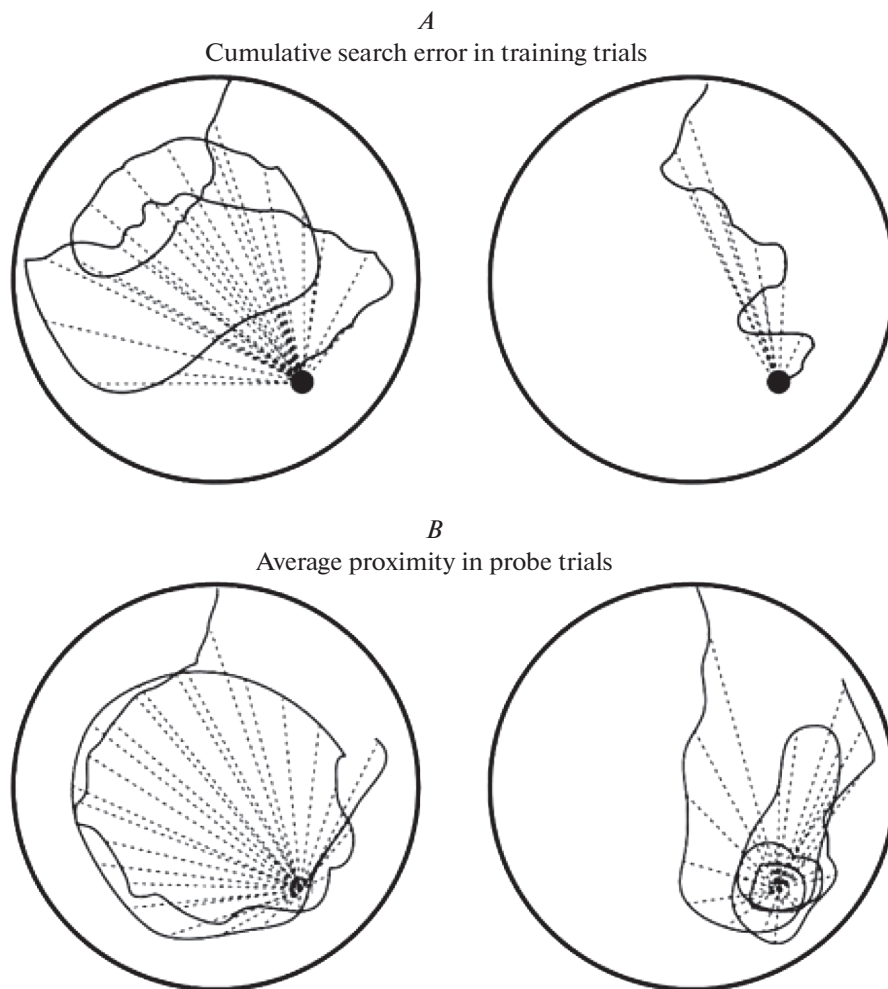


Рис. 3. Примеры обучающих (*A*) и пробных (*B*) испытаний с использованием расчета индекса обучения и кумулятивной ошибки поиска. Сплошные линии — траектория движения грызуна. Пунктирные линии — средние ежесекундные значения близости животного к месту расположения платформы.

Fig. 3. Examples of training (*A*) and probe (*B*) trials using the calculation of the learning index and cumulative search error. Solid lines — the trajectory of the rodent. Dotted lines — 1-s averages of the proximity of the animal to the platform location.

вотное не выходило за пределы коридора, и неудачные, что упрощает итоговое сравнение экспериментальных групп.

Ошибка углового направления (heading angle error) — достаточно эффективный, но редко используемый параметр. Он определяется как величина угла между направлением движения животного в определенной точке и прямым путем из стартового положения до платформы (рис. 4*B*). Иногда вместо первоначального положения животного сравнивают изменение угла ориентации животного в пространстве относительно платформы между каждой первой и второй секундой испытания [51].

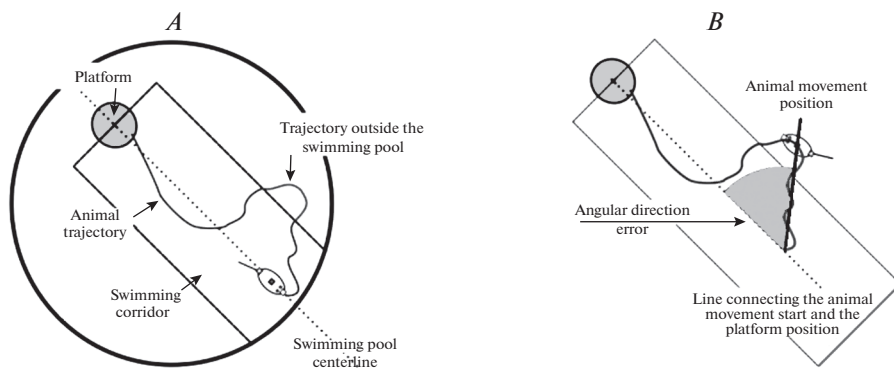


Рис. 4. Визуализация расчета ошибки Уишоу (A) и ошибки углового направления (B).

Fig. 4. Visualization of calculation of Whishaw's error (A) and heading angle error (B).

Задержка в 1 с необходима, чтобы животное имело возможность поменять курс своего плавания. Но чаще всего используется однократное измерение ошибки углового направления на каждое испытание, для чего экспериментатором задается определенное условие положения животного, например, 10 см пройденного пути, 10% процентов от него, или местоположение грызуна через 10 с от начала движения [52].

С момента создания “Водного лабиринта Морриса” были предложены различные методы анализа полученных с его помощью данных, в том числе и сложные методы классификации траекторий плавания животных по поведенческим классам, известным как *поисковые стратегии* (или *стратегии исследования*). Методы классификации обеспечивают дополнительное понимание различных типов поведения животных, но только ограниченное число исследователей использует их [53]. Также классификация целых траекторий может привести к потере важной информации [44], так как не дает возможности выявить животных со смешанным поведением, поэтому наиболее качественный метод выявления стратегий исследования заключается в разделении траектории на сегменты, а затем классификации этих сегментов в поведенческие стратегии, часть из которых будет повторяться, пропадать или появляться в каждом из последующих испытаний. Таким образом, можно отследить изменения в поведении животных с каждым испытанием, а путь плавания животных в целом разделяется на более чем одну стратегию, раскрывая, как изменяется их поведение. Кроме того, кумулятивную ошибку поиска, ошибку Уишоу и ошибку углового направления можно отнести к индивидуальным особенностям поведения испытуемого животного, и на их основании вывести стратегию поиска платформы. Пример определения стратегий поиска представлен на рис. 5 [53]. Эффективная и точная классификация подразумевает полное отсутствие ручной настройки и должна опираться только на компьютерные алгоритмы обработки данных, полученных в результате проведения испытаний. Поэтому наличие качественного программного обеспечения, способного измерить параметры более сложные, чем латентное время поиска платформы, является актуальной проблемой современных нейробиологических исследований.

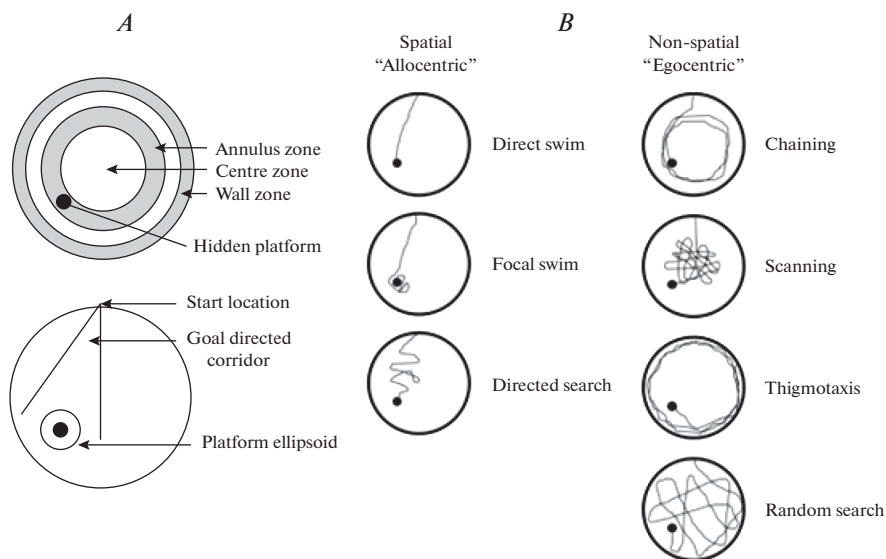


Рис. 5. Качественное определение стратегии поиска платформы подопытного грызуна в поведенческом тесте “Водный лабиринт Морриса”. *A* — определение различных качественных аспектов траектории плавания, необходимых для различия стратегий друг от друга. *B* — примеры различных стратегий поиска.
Fig. 5. Qualitative determination of the search platform strategies of the experimental rodent in the behavioral test “Morris Water Maze”. *A* — Identification of the various qualitative aspects of a trial’s swim path needed to distinguish the strategies from each other. *B* — Examples of the various search strategies.

Краткая информация о рассмотренных в этой главе параметрах оценки когнитивных функций в поведенческом тесте “Водный лабиринт Морриса” представлена в табл. 2.

АППАРАТУРА И УСЛОВИЯ

Аппаратура, используемая при проведении теста “Водный лабиринт Морриса”, имеет широкий диапазон разных конфигураций: круглый бассейн может быть сделан из различных материалов, диаметр его 0.80–2.20 м, высота 0.40–0.60 м, при этом уровень воды устанавливается на высоте 0.25–0.40 м над основанием, температура воды в бассейне 18–26°C, а размеры платформы, на которую грызуны должны взбираться из воды, 9 × 9–13 × 13 см или, если она круглая, — диаметром 9–13 см. В первых своих экспериментах Моррис использовал большой круглый бассейн из ДВП, покрытый изнутри стекловолокном [1]. Размеры бассейна составляли 1.30 м в диаметре и 0.60 м в высоту, а уровень воды устанавливался на высоте 0.40 м над основанием. Температура воды в бассейне поддерживалась на уровне $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Бассейн помещали на опору с металлическим каркасом таким образом, чтобы уровень воды был 0.80 м над уровнем пола, а весь аппарат помещали в центр лабораторного помещения размером 3 × 4 м. Видекамера с широкоугольным объективом была установлена над центром бассейна, и изображение передавалось на записывающее оборудование в соседней комнате.

Определенная постоянная температура воды также является очень важным условием проведения данного теста. Существует обратная U-образная зависи-

Таблица 2. Параметры “Водного лабиринта Морриса”
Table 2. Parameters of “Morris Water Maze”

Параметры Parameters	Определение Definition
Латентное время (время задержки) Latency	Время, за которое подопытное животное находит платформу [1, 32] The time during which the experimental animal finds the platform [1, 32]
Процентное время плавания в квадранте Percentage swimming time in the quadrant	Процентное время плавания грызуна в воображаемом квадранте, где находится (или находилась) спрятанная платформа [46] Percentage swimming time of the rodent in the imaginary quadrant where the hidden platform is (or was) [46]
Количество пересечений зоны платформы The number of platform area crossings	Количество пересечений подопытным животным зоны, где раньше находилась платформа [46] The number of crossings by the experimental animals of the area where the platform was previously located [46]
Индекс обучения (близость Галлахера) Learning Index (Gallagher's proximity)	Средняя мера близости, которая опирается на постоянную оценку расстояния между местоположением платформы и животным [37] An average measure of proximity that relies on a constant estimate of the distance between the platform location and the animal [37]
Кумулятивная ошибка поиска Cumulative search error	Вычисляется путем суммирования средней секундной близости животного к платформе [36] Calculated by summing the average second proximities of an animal to the platform [36]
Индекс приобретения Acquisition index	Разность между латентным временем поиска платформы в первом и последнем испытаниях тренировочной сессии, усредненное по всем дням обучения [47, 48] The difference between the latency in the first and last trials of the training session, averaged over all training days [47, 48]
Индекс сохранения Savings index	Разность между латентным временем поиска платформы в последнем испытании первого дня и первом испытании следующего дня, усредненное по всем дням обучения [47, 48] The difference between the latency in the last trial of the one day and the first trial of the next day, averaged over all training days [47, 48]
Ошибка Уишоу Whishaw's error	Угол отклонения направления плавания грызуна от прямого пути от стартовой позиции к платформе, который отражает корректность траектории движения животного по отношению к платформе [49, 50] The deviation angle of the swimming direction of the rodent from the straight path from the starting position to the platform, which reflects the correctness of the animal trajectory in relation to the platform [49, 50]
Ошибка углового направления Heading angle error	Величина отклонения угла между ориентацией животного в определенной точке своего плавания в бассейне и прямым путем начала движения животного к платформе. Одна из вариаций – сравнение не начального положения животного, а между каждой первой и второй секундой испытания [51] The value of the angle deviation between the animal's orientation at a certain point of its swimming in the pool and the direct path of the animal's beginning of movement towards the platform. One of the variations is to compare not the initial position of the animal, but between every first and second seconds of the trial [51]
Поисковые стратегии (стратегии исследования) Search strategies (research strategies)	Сложные методы классификации траекторий плавания животных по поведенческим классам [44, 53] (рис. 5) Complex methods of classification of animal swimming trajectories by behavioral classes [44, 53] (fig. 5)

мость, связывающая стресс с когнитивными функциями, согласно этой зависимости температура воды в бассейне на 13°C ниже температуры тела животного (обычно около 38°C) является достаточным стимулом для грызуна, чтобы начать активно искать скрытую платформу, но недостаточным стрессовым фактором, чтобы препятствовать функции обучения [54]. При понижении температуры воды до 19°C когнитивные способности испытуемого животного увеличиваются, но уменьшаются стимулирующие условия для нахождения спасательной платформы, а при достижении 12°C, стрессовые условия становятся превалирующими над когнитивными функциями грызуна.

Бассейн должен быть размещен в комнате с достаточным количеством визуальных ориентиров. Эти дистальные сигналы могут быть преднамеренными (например, использование ключей) или эндогенными для комнаты, при этом очень важно, чтобы сигналы не перемещались во время тестирования, поскольку они являются навигационными ориентирами животного для поиска цели. Ключи могут размещаться как в некотором отдалении от бассейна, так и непосредственно на его стенках над водой, что облегчает обучение животных. Расстояние сигналов от внешней стены лабиринта также может иметь важное значение [55]. Полезным дополнением являются шторы вокруг бассейна, с их помощью можно контролировать наличие или отсутствие необходимых дистальных сигналов, а также регулировать освещенность [5]. Освещаться помещение с бассейном должно рассеянным светом без преобладания одной конкретной точки — источника света, тем более, если производится запись эксперимента для дальнейшей обработки программным обеспечением. Камера и программное обеспечение для отслеживания чувствительны к отражениям света от поверхности воды, бликам и пересветам. На отражающие способности воды и блики может также повлиять степень мутности воды в бассейне. На данный момент существует много способов приведения воды в непрозрачное состояние — разведение сухого молока или сухих сливок, добавление мела, водорастворимой нетоксичной краски или специальных красителей [18, 56].

Влияние экспериментатора в MWM главным образом заключается в контакте с испытуемым животными и эффекте видимости экспериментатора. Влияние данных факторов на чистоту проводимого эксперимента и качество получаемых результатов аналогично, как и для любого поведенческого теста. Экспериментатор может: (а) покинуть комнату во время тестирования, что не всегда выполнимо; (б) стоять за визуальным барьером, например, шторами, либо сидеть на стуле, оставаясь ниже верхнего края стенки бассейна, будучи таким образом невидимым для животного; или (в) оставаться в фиксированном положении. Последнее является наиболее распространенным, но не следует забывать, что экспериментатор становится одним из дистальных сигналов. У животных, которые тестируются в разных квадрантах, особенно в дистальной и проксимальной половине лабиринта, иногда наблюдаются разные показатели латентного времени, в зависимости от того, плывут ли они к экспериментатору или от него [57].

Для качественной записи и обработки эксперимента необходимо соответствующее оборудование. Существует целый ряд коммерческих поставщиков, предоставляющих системы видеосъемки и отслеживания, которые можно использовать для “Водного лабиринта Морриса”. Например, HVS Image, San Diego Instruments, Accuscan, View Point, Clever Systems, Noldus, Columbus Instruments, Watermaze Software, Coulbourn Instruments и другие. Обычно коммерческие системы видеосъемки включают обязательную покупку отслеживающего программного обеспечения.

Поведение животных обычно регистрируется либо вручную, либо полуавтоматически. Традиционно принято наблюдать за поведением животного в лабиринте;

если исследователь считает, что воспроизводится определенная модель поведения, экспериментатор регистрирует данный факт, записывая его или вводя данные в программу регистрации событий [24]. Ручная запись поведения может быть реализована с относительно небольшими затратами, и для некоторых моделей поведения это может быть единственным способом обнаружения и записи их возникновения. Однако автоматическое наблюдение может обеспечить значительные преимущества. Поведение регистрируется более надежно, потому что компьютерный алгоритм работает таким же образом, но система не зависит от усталости или невнимательности наблюдателя. Например, в отличие от ручного наблюдения автоматизированное отслеживание выполняет шаблонный анализ видеоизображения исследуемых животных, чтобы извлечь количественные измерения их поведения. Автоматическое наблюдение с использованием видеонаблюдения особенно подходит для измерения двигательной активности и локомоторной функции, выраженной в пространственных измерениях (расстояние, скорость, поворот и т.д.), которые наблюдатель-человек не может точно оценить [58].

В настоящее время поведенческий тест “Водный лабиринт Морриса” практически не используется без автоматизированного анализа полученных данных, так как единственный параметр, который возможно зарегистрировать вручную — это латентное время нахождения платформы. А он, как уже было упомянуто, является малоинформативным и упускает многие показательные аспекты сложного поведения животных. Поэтому автоматизация теста практически неизбежна. Такая компьютеризированная система должна обеспечивать быстрое и точное отслеживание с вычислением в реальном времени определенных параметров. У современного ученого есть два очевидных способа получить доступ к автоматизированному анализу MWM:

(I) Можно воспользоваться общедоступными программами, разработанными учеными, работающими в этой области, и выложенными ими для безвозмездного пользования любого желающего, например, Tracking [13], MouBeAT [58] или ToxTrac [59]. Плюсы такой программы — абсолютно простой и незатратный способ приобретения. А вот к минусам можно отнести возможное низкое качество анализа, сложный для обычного пользователя интерфейс, избирательную специализацию и низкую апробацию таких программ. Также для некоторых общедоступных опций программного обеспечения требуется лицензия MATLAB [60], что приводит к увеличению стоимости, занимает намного больше времени или ограничено операционными системами. Существует набор инструментов для поведенческого анализа мыши с открытым исходным кодом (MouBeAT) [58], основанный на программном обеспечении для анализа изображений ImageJ. Нами была сделана попытка воспользоваться одной из наиболее популярных и высоко оцениваемых общедоступных трекинговых программ — ToxTrac, которая была разработана группой шведских ученых в 2017 г. [59]. Но, к сожалению, при обработке снятых нами видеофайлов траектория плавания подопытного животного не всегда определялась правильно, и нам не удалось настроить данную программу на безошибочное определение трека. Поэтому от использования данного программного продукта мы были вынуждены отказаться.

(II) Можно воспользоваться проверенной и удобной коммерческой программой. Такие программы обычно очень просты в использовании, имеют интуитивный интерфейс, заточены на конкретный поведенческий тест, в том числе на различные модификации “Водного лабиринта Морриса”, и часто дополнительно имеют подробную инструкцию от производителя. Примерами таких коммерческих автоматизированных программ для анализа поведения у грызунов могут служить EthoVision [24], Smart Video Tracking Software (www.panlab.com), Video-

Track (www.viewpoint.fr) и AnyMaze (www.stoeltingco.com). Значительный недостаток у них — очень высокая стоимость. Большинство коммерческих продуктов продаются в виде аппаратного и программного пакета, что делает их недоступными для многих лабораторий.

Ввиду перечисленных проблем, нами было принято решение воспользоваться третьим вариантом — разработать программное обеспечение самостоятельно. Первые полученные нами результаты свидетельствуют о том, что разработанная нами программа Minorontikos не уступает популярным коммерческим продуктам [52]. Мы рассчитываем, что в перспективе разработанная нами программа, способная высококачественно анализировать такие параметры, как латентное время, процентное время в квадрантах, скорость движения, длина трека, близость Галлахера, кумулятивная ошибка поиска, ошибка Уишоу, ошибка углового направления и различные стратегии поиска, может стать мощным инструментом анализа поведенческого теста MWM.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной статье были рассмотрены различные модификации процедур проведения “Водного лабиринта Морриса”, а также перспективы его использования в лабораторной практике и результаты, которые можно получить с его помощью. Первоначальная задача MWM — это анализ пространственной памяти у подопытных грызунов, однако после изобретения данного теста в 80-х годах прошлого столетия его развитие и совершенствование не стоит на месте, и сейчас при помощи “Водного лабиринта Морриса” можно решать задачи, выходящие за рамки первоначальной. Изучение особенностей индивидуального поведения, поисковых стратегий — это относительно новые и малоизученные информационные возможности, которые дает MWM. Отчасти это проблема обусловлена отсутствием доступного программного обеспечения, способного качественно обрабатывать полученные данные. Без сомнения, популярные коммерческие продукты доказали свою эффективность, однако и у них есть ограничения по информативности — предварительное знакомство с некоторыми из них показало, что из перечисленных нами в данной статье сложных параметров единицы способны к полноценному их анализу, но в большинстве своем ограничиваются латентным временем, процентным временем в квадранте и некой угловой ошибкой (упрощенный вариант ошибки углового направления, для которой вычисление происходит только в одном положении из всей траектории подопытного животного). Таким образом, разработка качественного программного продукта для эффективного автоматизированного анализа “Водного лабиринта Морриса” все еще является актуальной задачей современной нейронауки.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Публикация подготовлена за счет гранта Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-315-90010, главы “Водный лабиринт Морриса и его модификации” и “Аппаратура и условия”) и гранта Российского научного фонда (проект № 20-45-01004, глава “Параметры”).

ВКЛАД АВТОРОВ

Написание текста рукописи — Д.П. Чернюк, обзор публикаций по теме статьи — Д.П. Чернюк, А.В. Большакова, редактирование — И.Б. Безпрозванный, О.Л. Власова.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Morris R.G.M.* Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation*. 12 (2): 239–260. 1981.
2. *Morris R.G.M.* Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods*. 11 (1): 47–60. 1984.
3. *Sutherland R.J., Whishaw I.Q., Kolb B.* Contributions of cingulate cortex to two forms of spatial learning and memory. *J. Neurosci.* 8 (6): 1863–1872. 1988.
4. *Brandeis R., Brandys Y., Yehuda S.* The use of the Morris Water Maze in the study of memory and learning. *Int. J. Neurosci.* 48(1–2): 29–69. 1989.
5. *Vorhees C.V., Williams M.T.* Morris water maze: Procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat. Protoc.* 1(2): 848–858. 2006.
6. *Buresova O., Krekule I., Zahalka A., Bures J.* On-demand platform improves accuracy of the Morris water maze procedure. *J. Neurosci. Methods*. 15(1): 63–72. 1985.
7. *Whishaw I.Q., Mittleman G.* Visits to starts, routes and places by rats (*Rattus norvegicus*) in swimming pool navigation tasks. *J. Compar. Psychol.* 100. 422–443. 1987.
8. *Nakazawa K., Quirk M.C., Chitwood R.A., Watanabe M., Yeckel M.F., Sun L.D., Kato A., Carr C.A., Johnston D., Wilson M.A., Tonegawa, S.* Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall. *Science*. 297 (5579): 211–218. 2002.
9. *Brun V.H., Otnass M.K., Molden S., Steffenach H.A., Witter M.P., Moser M.B., Moser E.I.* Place cells and place recognition maintained by direct entorhinal-hippocampal circuitry. *Science*. 296 (5576): 2243–2246. 2002.
10. *Kallai J., Makany T., Karadi K., Jacobs W.J.* Spatial orientation strategies in Morris-type virtual water task for humans. *Behav. Brain Res.* 159(2): 187–196. 2005.
11. *Morris R.G.M.* An attempt to dissociate ‘spatial-mapping’ and ‘working-memory’ theories of hippocampal function. *Neurobiology of the Hippocampus*. New York. Acad. Press. 1993.
12. *Lindner M.D., Balch A.H., VanderMaelen C.P.* Short forms of the “reference-” and “working-memory” Morris water maze for assessing age-related deficits. *Behav. Neural. Biol.* 58 (2): 94–102. 1992.
13. *Smolensky I.V., Zubareva O.E., Kalemenev S.V., Lavrentyeva V.V., Dyomina, A.V., Karepanov A.A., Zaitsev A.V.* Impairments in cognitive functions and emotional and social behaviors in a rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Behav. Brain Res.* 372 112044. 2019.
14. *Crawley J.N.* Behavioral phenotyping strategies for mutant mice. *Neuron*. 57(6): 809–818. 2008.
15. *Nunn J.A., LePeillet E., Netto C.A., Hodges H., Gray J.A., Meldrum B.S.* Global ischaemia: hippocampal pathology and spatial deficits in the water maze. *Behav. Brain Res.* 62 (1): 41–54. 1994.
16. *Gallagher M., Rapp P.R.* The use of animal models to study the effects of aging on cognition. *Annu. Rev. Psychol.* 48. 339–370. 1997.
17. *Hsiao K., Chapman P., Nilsen S., Eckman C., Harigaya Y., Yonkin S., Yang F. Cole G.* Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*. 274(5284): 99–102. 1996.
18. *Bromley-Brits K., Deng Y., Song W.* Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer’s disease model mice. *J. Vis. Exp.* (53): 2011.
19. *Edwards S.R., Hamlin A.S., Marks N., Coulson E.J., Smith M.T.* Comparative studies using the Morris water maze to assess spatial memory deficits in two transgenic mouse models of Alzheimer’s disease. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 41(10): 798–806. 2014.
20. *Shariatpanahi M., Khodaghali F., Ashabi G., Bonakdar Yazdi B., Hassani S., Azami K., Abdollahi M., Noorbakhsh F., Taghizadeh G., Sharifzadeh M.* The involvement of protein kinase G inhibitor in regulation of apoptosis and autophagy markers in spatial memory deficit induced by Abeta. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 30(4): 364–375. 2016.
21. *Wu M.N., Zhou L.W., Wang Z.J., Han W.N., Zhang J., Liu X.J., Tong J.Q., Qi J.S.* Colivelin ameliorates amyloid beta peptide-induced impairments in spatial memory, synaptic plasticity, and calcium homeostasis in rats. *Hippocampus*. 25(3): 363–372. 2015.
22. *Ge M., Zhan Y., Hao Q., Zhao Y., Dong B.* Effects of mesenchymal stem cells transplantation on cognitive deficits in animal models of Alzheimer’s disease: A systematic review and meta-analysis. *Brain Behav.* 8(7): e00982. 2018.
23. *D’Hooge R., De Deyn P.P.* Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 36(1): 60–90. 2001.
24. *Noldus L.P., Spink A.J., Tegelenbosch R.A.* EthoVision: a versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. *Behav. Res. Methods Instrum. Comput.* 33(3): 398–414. 2001.

25. *Spink A.J., Tegelenbosch R.A., Buma M.O., Fursenko D.V., Kulikov A.V.* Conducting and automating Morris water maze test under SPF conditions. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 6: 394–399. 2016.
26. *Khotskin N.V., Kulikov V.A., Zavyalov E.L., Fursenko D.V., Kulikov A.V.* Conducting and automating Morris water maze test under SPF conditions. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 6: 394–399. 2016.
27. *Glaser O.C.* The formation of habits at high speed. *J. Compar. Neurol. Psychol.* 20(3): 165–184. 1910.
28. *Wever E.G.* Water temperature as an incentive to swimming activity in the rat. *J. Compar. Psychol.* 14(2): 219–224. 1932.
29. *Waller M.B., Waller P.F., Brewster L.A.* A Water Maze for Use in Studies of Drive and Learning. *Psychol. Rep.* 7(1): 99–102. 1960.
30. *Woods P.J., Davidson E.H., Peters R.J. Jr.* Instrumental Escape Conditioning in a Water Tank: Effects of Variations in Drive Stimulus Intensity and Reinforcement Magnitude. *J. Compar. Physiol. Psychol.* 57: 466–470. 1964.
31. *Woods P.J., Holland C.H.* Performance on a black-white discrimination problem in water-maze as influenced by water temperature and swimming ability. *Psychol. Reports.* 9: 433–439. 1961.
32. *Morgan D.* Water Maze Tasks in Mice: Special Reference to Alzheimer's Transgenic Mice. *Methods Behav. Anal. Neurosci.* 2: 14. Boca Raton (FL). 2009.
33. *Bryan K.J., Lee H., Perry G., Smith M.A., Casadesus G.* Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease: Behavioral Testing and Considerations. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience.* 2: 1. Boca Raton (FL). 2009.
34. *Morris R.G.M.* Morris water maze. *Scholarpedia.* 6315. 2008.
35. *Kim J.J., Lee H.J., Han J.S., Packard M.G.* Amygdala is critical for stress-induced modulation of hippocampal long-term potentiation and learning. *J. Neurosci.* 21(14): 5222–5228. 2001.
36. *Tomas Pereira I., Burwell R.D.* Using the spatial learning index to evaluate performance on the water maze. *Behav. Neurosci.* 129 (4): 533–539. 2015.
37. *Gallagher M., Burwell R., Burchinal M.* Severity of spatial learning impairment in aging: development of a learning index for performance in the Morris water maze. *Behav. Neurosci.* 107 (4): 618–626. 1993.
38. *Westerman M.A., Cooper-Blacketer D., Mariash A., Kotilinek L., Kawarabayashi T., Younkin L.H., Carlson G.A., Younkin S.G., Ashe K.H.* The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 22(5): 1858–1867. 2002.
39. *Steele R.J., Morris R.G.* Delay-dependent impairment of a matching-to-place task with chronic and intrahippocampal infusion of the NMDA-antagonist D-AP5. *Hippocampus.* 9(2): 118–136. 1999.
40. *Spooner R.I., Thoson A., Hall J., Morris R.G., Salter S.H.* The Atlantis platform: a new design and further developments of Buresova's on-demand platform for the water maze. *Learn. Mem.* 1(3): 203–211. 1994.
41. *Lipp H.P., Wolfer D.P.* Genetically modified mice and cognition. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8(2): 272–280. 1998.
42. *Morris R.G., Hagan J.J., Rawlins J.N.* Allocentric spatial learning by hippocampectomised rats: a further test of the "spatial mapping" and "working memory" theories of hippocampal function. *Q. J. Exp. Psychol. B.* 38 (4): 365–395. 1986.
43. *Sutherland R.J., Dyck R.H.* Place navigation by rats in a swimming pool. *Canad. J. Psychol.* 38: 322–347. 1984.
44. *Vouros A., Gehring T.V., Szydlowska K., Janusz A., Tu Z., Croucher M., Lukasiuk K., Konopka W., Sandi C., Vasilaki E.* A generalised framework for detailed classification of swimming paths inside the Morris Water Maze. *Sci. Rep.* 8 (1): 15089. 2018.
45. *Morgan D., Diamond D.M., Gottschall P.E., Ugen K.E., Dickey C., Hardy J., Duff K., Jantzen P., DiCarlo G., Wilcock D., Connor K., Hatcher J., Hope C., Gordon M., Arendash G.W.* A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature.* 408(6815): 982–985. 2000.
46. *Maei H.R., Zaslavsky K., Teixeira C.M., Frankland P.W.* What is the Most Sensitive Measure of Water Maze Probe Test Performance? *Front. Integr. Neurosci.* 3 4. 2009.
47. *Whiting M.D., Kokiko-Cochran O.N.* Assessment of Cognitive Function in the Water Maze Task: Maximizing Data Collection and Analysis in Animal Models of Brain Injury. *Methods Mol. Biol.* 1462: 553–71. 2016.
48. *Kokiko-Cochran O., Ransohoff L., Veenstra M., Lee S., Saber M., Sikora M., Teknipp R., Xu G., Bemiller S., Wilson G., Crish S., Bhaskar K., Lee Y.S., Ransohoff R.M., Lamb B.T.* Altered Neuroinflammation and Behavior after Traumatic Brain Injury in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J. Neurotrauma.* 33 (7): 625–40. 2016.

49. *Whishaw I.Q.* Cholinergic receptor blockade in the rat impairs locale but not taxon strategies for place navigation in a swimming pool. *Behav. Neurosci.* 99 (5): 979–1005. 1985.
50. *Harker, K.T. and Whishaw, I.Q.* Impaired spatial performance in rats with retrosplenial lesions: importance of the spatial problem and the rat strain in identifying lesion effects in a swimming pool. *J. Neurosci.* 22 (3): 1155–1164. 2002.
51. *Bye C.M., Hong N.S., Moore K., Deibel S.H., McDonald R.J.* The effects of pool shape manipulations on rat spatial memory acquired in the Morris water maze. *Learn. Behav.* 47 (1): 29–37. 2019.
52. *Chernyuk D.P., Zorin A.G., Derevtsova K.Z., Efimova E.V., Prikhodko V.A., Sysoev Y.I., Vlasova O.L., Bolsunovskaia M.V., Bezprozvanny I.B.* Automatic analysis of the “Morris Water Maze” behavioral test data. *I.P. Pavlov J. Higher Nerv. Activity.* 71(1): 121–130. 2021.
53. *Rogers J., Churilov L., Hannan A.J., Renoir T.* Search strategy selection in the Morris water maze indicates allocentric map formation during learning that underpins spatial memory formation. *Neurobiol. Learn. Mem.* 139. 37–49. 2017.
54. *Morris R.* Neurobiology of Learning and Memory. *Neurosci. in the 21st Century.* 2173–2211. 2013
55. *Maurer R., Derivaz V.* Rats in a transparent morris water maze use elemental and configural geometry of landmarks as well as distance to the pool wall. *Spatial Cognit. Comput.* 2 135–156. 2000.
56. *Nunez J.* Morris Water Maze Experiment. *J. Vis. Exp.* (19): 897. 2008.
57. *Hodges H.* Maze procedures: the radial-arm and water maze compared. *Brain Res. Cogn. Brain Res.* 3(3–4): 167–181. 1996.
58. *Bello-Arroyo E., Roque H., Marcos A., Orihuel J., Higuera-Matas A., Desco M., Caiolfa V.R., Ambrosio E., Lara-Pezzi E., Gomez-Gaviro M.V.* MouBeAT: A New and Open Toolbox for Guided Analysis of Behavioral Tests in Mice. *Front. Behav. Neurosci.* 12. 201. 2018.
59. *Rodriguez A., Zhang H., Klaminder J., Brodin T., Andersson P.L., Andersson M.* ToxTrac: A fast and robust software for tracking organisms. *Methods Ecol. and Evolut.* 9 (3): 460–464. 2018.
60. *Aragao Rda S., Rodrigues M.A., de Barros K.M., Silva S.R., Toscano A.E., de Souza R.E., Manhaes-de-Castro, R.* Automatic system for analysis of locomotor activity in rodents—a reproducibility study. *J. Neurosci. Methods.* 195(2): 216–221. 2011.

Opportunities and Prospects of the Behavioral Test “Morris Water Maze”

D. P. Chernyuk^{a,*}, A. V. Bol'shakova^a, O. L. Vlasova^a, and I. B. Bezprozvanny^{a,b,}**

^a*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia*

^b*Department of Physiology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA*

^{*}*e-mail: dashachernuk@gmail.com*

^{**}*e-mail: mnlabsph@gmail.com*

The Morris Water Maze behavioral test is a universal method for testing cognitive functions in experimental rodents, and it is especially effective in detecting deviations in memory functions and learning, which makes it indispensable in the study of aging, stroke, neurodegenerative diseases, effect of therapeutic drugs, etc. However, this test can be a much more informative tool for analyzing the behavior of experimental animals than it seems at first glance. The formation, consolidation of memory and learning are quite complex processes that mainly involve the hippocampus, but in addition to it, many areas of the brain are involved in these processes. The various protocols for this test are so sensitive to changes in normal function in various areas of the brain, not just the hippocampus, that they can be used as an “indicator” of normal cognitive function. Thus, different modifications of the “Morris Water Maze” include different mechanisms of navigation, learning and memory, and the results of these tests and their correct calculation can give a lot of information about the behavior of the tested rodents. In this review article, we provide a list of the most popular methods for conducting the Morris Water Maze procedure and discuss what informative parameters can help a researcher in analyzing the results of this test.

Keywords: Morris Water Maze, behavioral test, automated analysis, tracking

ЦИТИРОВАТЬ:

Чернюк Д.П., Большакова А.В., Власова О.Л., Безпрозванный И.Б. Возможности и перспективы поведенческого теста “Водный лабиринт Морриса”. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 107(3): 267–287. 2021.

DOI: 10.31857/S0869813921030043

TO CITE THIS ARTICLE:

Chernyuk D.P., Bol'shakova A.V., Vlasova O.L., Bezprozvanny I.B. Opportunities and prospects of the behavioral test “morris water maze”. Russian Journal of Physiology. 107(3): 267–287. 2021.

DOI: 10.31857/S0869813921030043

ОБЗОРЫ

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ САЛИЦИЛАТОВ
НА СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТУЮ СИСТЕМУ**

© 2021 г. Е. Н. Чуян^{1, *}, И. С. Мironюк¹, И. В. Черетаев¹,
М. Ю. Раваева¹, Т. В. Гришина¹

¹*Таврическая академия (структурное подразделение) “Крымский федеральный университет
им. В.И. Вернадского”, Симферополь, Республика Крым, Россия*

**E-mail: elena-chuyan@rambler.ru*

Поступила в редакцию 17.12.2020 г.

После доработки 14.01.2021 г.

Принята к публикации 14.01.2021 г.

В современной литературе четко прослеживается возросший интерес к изучению биологических и терапевтических эффектов салицилатов. Крупные клинические испытания продемонстрировали эффективность ацетилсалициловой кислоты (АСК) и ее комплексных соединений в лечении и профилактике ишемической болезни сердца, хронической сердечной недостаточности, гипертонии и других заболеваний, что позволяет оценить широту благоприятных эффектов, оказываемых АСК на функционирование сердечно-сосудистой системы (ССС) и констатировать отсутствие в ближайшие годы других равноценных лекарственных средств. Важнейшим направлением остается расширение и усиление известной терапевтической активности (антипиретическая, анальгезирующая, противовоспалительная, антиоксидантная, антидепрессантная, противомигренозная, ангиолитическая и др.) на фоне снижения и/или ликвидации побочных эффектов, поскольку АСК занимает лидирующее положение среди всех нестероидных противовоспалительных препаратов по объемам применения и одно из первых мест по количеству побочных эффектов. Перспективным для решения этой проблемы является создание комплексных соединений салицилатов, поскольку при образовании новых координационных соединений на их основе возможно возникновение новых полезных биологических свойств, а также усиление физиологических эффектов, характерных для АСК, что поможет решить проблему снижения побочных эффектов, резистентности к терапии аспирином и повышения терапевтического потенциала исходного соединения для получения эффективных лекарственных препаратов нового поколения. В статье обобщены и проанализированы обширные сведения о физиологических и молекулярных механизмах действия АСК и ее производных на ССС в норме и патологии, в том числе на различные физиологические и биохимические звенья гомеостаза организма: вазорегулирующую функцию эндотелия сосудов, сосудисто-тромбоцитарный гемостаз; фибринолиз; процессы свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты; циклооксигеназный и липоксигеназный пути окисления арахидоновой кислоты; молекулярные маркеры процессов воспаления (простагландины; про- и противовоспалительные цитокины; противовоспалительные липидные медиаторы). Подробно изложены и проанализированы имеющиеся данные литературы и результаты собственных экспериментальных исследований о влиянии салицилатов на центральную гемодинамику и тканевую микроциркуляцию. Сделан вывод о перспективности исследований количественных и качественных изменений микроциркуляторных процессов под влиянием АСК и ее производных, что позволит уточнить механизмы биологического действия этих соединений на ССС.

Ключевые слова: ацетилсалициловая кислота, кардиотропные эффекты, центральная гемодинамика, микроциркуляция, сосудисто-тромбоцитарный гемостаз, фибринолиз

DOI: 10.31857/S0869813921030055

Распространенной проблемой современности являются патологии сердечно-сосудистой системы (ССС), что является причиной поиска и разработки новых лекарственных препаратов, механизм действия которых направлен на борьбу с сердечно-сосудистыми патологиями. Повышенное внимание исследователей привлекает и возможность использования традиционных лекарственных препаратов для создания на их основе новых, более эффективных (менее токсичных) биологически активных форм или же выявления новых видов активности таких соединений. В рамках такого научного поиска актуален и интересен подход, основанный на изобретении новых лекарственных форм и средств, являющихся производными ацетилсалициловой кислоты (АСК) с различными металлами [1, 2].

Аспирин как лекарственное средство применяется уже более 100 лет, относится к группе нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) и обладает широким спектром терапевтических эффектов. Однако несмотря на длительное и широкое использование, в конце 20-го—начале 21-го веков к АСК и ее производным заметно возрос интерес как со стороны исследователей, так и в медицинской практике, что нашло свое отражение в современной отечественной и зарубежной литературе.

Одним из важнейших направлений исследований АСК остается расширение и усиление известной терапевтической активности (антипиретическая, анальгезирующая, противовоспалительная, антиагрегантная, антиоксидантная, антидепрессантная, противомигренозная, анксиолитическая и др.) [2–9].

Аспирин способен влиять на нервные клетки и центры. Так, жаропонижающий эффект обусловлен влиянием на гипоталамические центры терморегуляции. АСК и ее производные способны непосредственно изменять возбудимость нервных клеток, влиять на нейромедиаторы и процессы проведения импульса в нервных отростках [10]. Эта кислота и ее метаболиты способны непосредственно изменять функционирование ионных каналов [10, 11], влиять на концентрацию синаптических медиаторов [12].

В последнее время появились указания на возможность использования салицилатов в роли перспективных препаратов, обладающих противовоспалительной, противомикробной, противоопухолевой активностями [13–15]. Так, в литературе активно обсуждается антинеопластическое действие аспирина. Есть данные, что аспирин способен оказывать протекторное воздействие и снижать риск возникновения онкологических заболеваний [16–18]. Отмечен выраженный эффект аспирина в отношении опухолей желудочно-кишечного тракта, в особенности, ободочной и прямой кишки [18–20]. Вместе с тем совместное рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование американских и австралийских ученых на более чем 19-ти тысячах пациентов старше 65 лет из США и Австралии показало, что ежедневный прием низких доз аспирина (100 мг) среди здоровых пожилых людей без сердечно-сосудистых заболеваний, деменции и других серьезных патологий может ускорить прогрессирование рака [21]. Безусловно, этот вопрос еще далек от решения, требует дополнительных исследований, однако указывает на широкий спектр возможного применения салицилатов и нуждается в дальнейших крупных исследованиях.

Не меньший интерес вызывают и широкие возможности применения АСК при сердечно-сосудистой патологии. Многочисленные крупные клинические испытания продемонстрировали эффективность АСК и ее комплексных соединений в ле-

чении и профилактике ишемической болезни сердца, хронической сердечной недостаточности, гипертонии и других, что позволяет оценить широту благоприятных эффектов, оказываемых АСК на функционирование ССС, и констатировать отсутствие в ближайшие годы других лекарственных средств, равноценных АСК.

Необходимо отметить, что наряду с целой плеядой положительных терапевтических эффектов, АСК занимает лидирующее среди всех НПВП положение в Российской Федерации не только по объемам применения, но и совокупному количеству *побочных эффектов*, среди которых негативные воздействия на иммунную и пищеварительную системы, а также кожу и подкожные ткани, а именно: ангионевротический отек, крапивница и эрозийный гастрит [22].

АСК и некоторые ее производные провоцируют гастропатии, язвообразование, поражают клетки печени, угнетают кишечную микрофлору. Также салицилаты способствует развитию синдрома Рейе [23], нарушают функционирование митохондрий, вмешиваясь в цикл Кребса [24], ингибируют синтез АТФ и оказывают влияние на фактор транскрипции простагландинов [25]. В частности, отмечается, что длительный прием аспирина вызывает увеличение числа больших кровотечений в 1.6 раза [26], в том числе, желудочно-кишечных. При этом основными факторами риска развития кровотечений являются совместное применение нестероидных противовоспалительных препаратов, антикоагулянтов, кортикостероидов, возраст старше 60–75 лет [26], наличие *Helicobacter pylori* [27], предшествующий анамнез желудочно-кишечных кровотечений [28].

Таким образом, учитывая клиническую эффективность АСК и ее производных в отношении сердечно-сосудистых патологий на фоне нежелательных последствий данной терапии, крайне важной задачей остается не только расширение и усиление терапевтического потенциала АСК (аспирина), но и снижение, а, по возможности, ликвидация максимального количества побочных эффектов. По мнению ряда авторов, перспективным способом для реализации этой цели является создание комплексных соединений салицилатов, в частности, с двухвалентными металлами [1, 22], с редкоземельными элементами [29, 30].

Первым комплексом металла и АСК, который показал свою большую противовоспалительную активность и меньший вред для ЖКТ, нежели аспирин, был ацетилсалицилат (АСТ) меди [31]. С тех пор стало ясно, что подобные соединения могут иметь клиническую значимость.

Важно отметить, что у координационных солей — производных АСК — происходит не только возникновение новых, полезных свойств и биологических эффектов, но и усиление уже существующих, характерных непосредственно для самой АСК [30, 32]. Так, установлено, что АСТ меди превосходит АСК по всем основным свойствам — антитромботическому, анальгетическому, противораковому и т.д., имея при этом значительно меньшую токсичность [33] и в 7 раз большую селективность к циклооксигеназе (ЦОГ)-2 [34].

В экспериментальных исследованиях, выполненных в разных лабораториях, установлено, что АСТ цинка проявляют более выраженный, чем АСК противовоспалительный эффект. Также было обнаружено, что двухъядерные комплексы проявляли большую противовоспалительную активность, чем одноядерные АСТ металлов [35]. Причем, данный эффект увеличивался в ряду АСТ никель–кобальт–цинк–медь. При этом биодоступность и концентрация салициловой кислоты в плазме крови кроликов [36] и людей (перорально, таблетка в оболочке, 50 мг) [33] была выше при применении АСТ цинка, чем АСК. Также было установлено, что АСТ цинка обладает значительно меньшим эрозивным влиянием на слизистую оболочку желудка [37].

Нейротропные, психоактивные и анальгетические эффекты производных АСК с кобальтом и цинком были установлены в многочисленных экспериментальных исследованиях на моллюсках и крысах [38–44].

Даже этот небольшой перечень позволяет оценить широту эффектов, оказываемых салицилатами, а учитывая большие синтетические возможности при модифицировании производных АСК, перспективным является синтез и биоскрининг ее новых производных, что поможет решить проблему снижения побочных эффектов, резистентности к терапии аспирином и повышения терапевтического потенциала исходного соединения для получения эффективных лекарственных препаратов нового поколения. Однако применение ацетилсалицилатов для лечения заболеваний ССС крайне ограничено, что связано в том числе и с недостаточным количеством экспериментальных и клинических исследований, проводимых в данной области.

Целью данного обзора явилось обобщение современных сведений о физиологических и молекулярных механизмах действия АСК и ее производных на ССС в норме и патологии.

ВЛИЯНИЕ НА СИСТЕМУ ГЕМОСТАЗА. АНТИАГРЕГАНТНОЕ (АНТИТРОМБОТИЧЕСКОЕ) ДЕЙСТВИЕ

Многочисленные крупные клинические испытания продемонстрировали эффективность АСК в лечении и профилактике ишемической болезни сердца, гипертонии, инфаркта, инсульта и прочих сердечно-сосудистых заболеваний [44]. Как показано еще в исследовании [45], применение АСК при инфаркте миокарда необходимо для сохранения жизни, т.к. вдвое снижает частоту нефатальных рецидивов инфаркта и инсульта и летальных исходов. По способности снижать риск смерти от инфаркта миокарда АСК сопоставима с таким тромболитическим препаратом как стрептокиназа, а при совместном их использовании риск смертности снижается еще значительней.

Активация тромбоцитов и последующее тромбообразование играют ведущую роль в развитии большинства сердечно-сосудистых патологий [18], а терапевтические эффекты аспирина связаны, прежде всего, с его антиагрегантным (антитромботическим) действием. В настоящее время эффективность аспирина подтверждена многочисленными клиническими, экспериментальными исследованиями и метаанализами [46, 47]. Этот препарат является “золотым стандартом” антитромбоцитарной терапии и единственным из антитромботических препаратов, который рекомендован для использования в целях первичной профилактики сердечно-сосудистых патологий (инфаркта миокарда, внезапная смертность от коронарных причин, ишемический инсульт). А согласно [46], при вторичной профилактике сердечно-сосудистых патологий аспирин еще более эффективен, чем при первичной.

Отдельно следует отметить большой резонанс, который вызвало пилотное ретроспективное когортное исследование 412-ти взрослых пациентов, госпитализированных с COVID-19 в несколько больниц США в период с марта по июль 2020 г., проведенное учеными Мэрилендского университета (University of Maryland College Park) и направленное на изучение влияния коронавирусной болезни на гиперкоагуляцию и повышение риска тромбоза у тяжелобольных пациентов. В результате специалисты показали прямую связь между приемом аспирина и уменьшением вероятности развития тяжелых симптомов заболевания (применения ИВЛ, поступления в отделение интенсивной терапии) и уровня внутрибольничной смертности, хотя подчеркнули необходимость в проведении рандомизированного контролируемого исследования, которое позволило бы установить связь

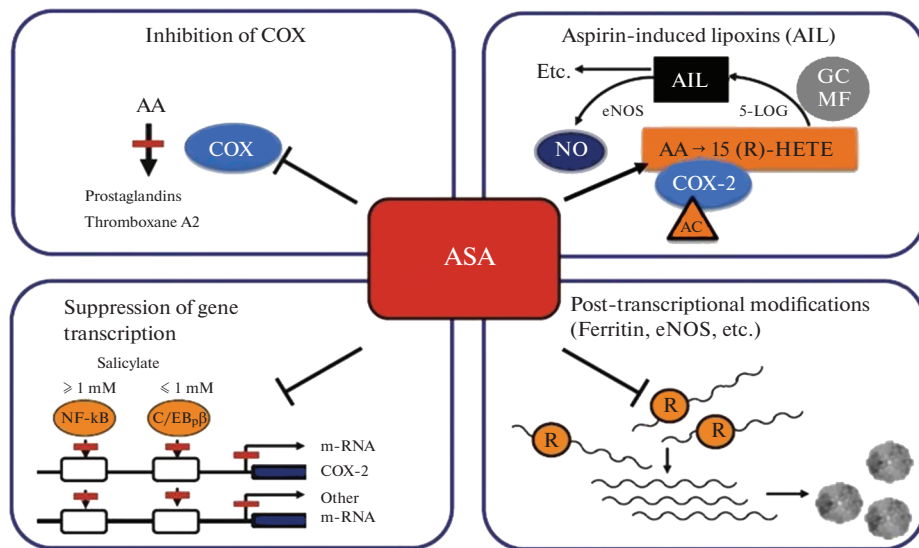


Рис. 1. Механизмы действия аспирина. AA – арахидоновая кислота, ASA – ацетилсалициловая кислота, AC – ацетилирование, GC – гранулоциты, MF – макрофаги, COX – циклооксигеназа, AIL – аспирин-индуцированные липоксины, 5-LOG – 5-липоксигеназа, 15-R-HETE – 15-гидрокси-5,8,11,13-эйкозатетраеновая кислота, e-NOS – эндотелиальная синтаза оксида азота, NF-κB – транскрипционный фактор, C/EBPβ – CCAAT-энхансер-связывающий белок, m-RNA – м-РНК (по [49] с модификациями).

Fig. 1. Mechanisms of action of aspirin AA – arachidonic acid, AC – acetylation, ASA – acetylsalicylic acid, GC – granulocytes, MF – macrophages, COX – cyclooxygenase, AIL – aspirin-induced lipoxins, 5-LOG – 5-lipoxygenase, 15-R-HETE – 15R-hydroxy-5,8,11,13-eicosatetraenoic acid, e-NOS – endothelial nitric oxide synthase, NF-κB – transcription factor, C/EBPβ – CCAAT-enhancer-binding protein, m-RNA – matrix RNA (after [49] with modifications).

между применением аспирина и снижением повреждения легких у пациентов с коронавирусом [48].

Аспирин может принципиально модифицировать все три компонента системы гемостаза, то есть функцию тромбоцитов, плазматическую коагуляцию и фибринолиз, хотя ингибирование функции тромбоцитов, несомненно, является наиболее значительным и наиболее интенсивно изучаемым явлением. Активация тромбоцитов также является триггерным событием, по крайней мере с двумя компонентами, чувствительными к аспирину: биосинтез тромбосана и образование тромбина на поверхности тромбоцитов. По формальным причинам эти эффекты аспирина на тромбоциты, плазматическую коагуляцию и фибринолиз рассматриваются поочередно. Однако *in vivo* они образуют функциональную единицу, и отдельные изменения только одного компонента без изменения других обычно не происходят [49]. Следовательно, с точки зрения влияния АСК на ССС наиболее важным является антитромботическое действие аспирина, из чего следует и его терапевтическая эффективность.

Основной механизм действия салицилатов связан с угнетением системы циклооксигеназ, синтеза простагландинов, торможением факторов свертывания крови. На рис. 1 представлена схема основных фармакологических эффектов аспирина. АСК оказывает свое действие, главным образом, путем влияния на биосинтез циклических простаноидов, т.е. тромбосана А₂ (TXA₂), простагличина и других про-

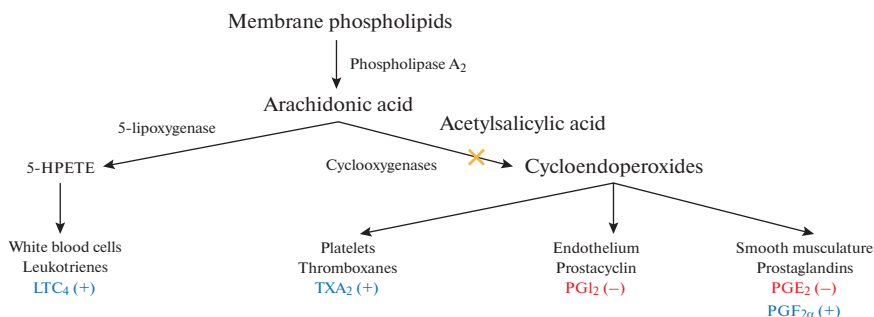


Рис. 2. Схема метаболизма арахидоновой кислоты (+) – вазоконстрикция; (–) – вазодилатация, PGE₂ – простагландин E₂, PGF_{2α} – простагландин F_{2α}, PGI₂ – простагландин I₂, TXA₂ – тромбоксан A₂, LTC₄ – лейкотриен C₄, 5-HPETE – 5-гидропероксизйкозатетраеновая кислота (по [50] с модификациями).

Fig. 2. Arachidonic acid metabolism scheme (+) – vasoconstriction, (–) – vasodilation, PGE₂ – prostaglandin E₂, PGF_{2α} – prostaglandin F_{2α}, PGI₂ – prostaglandin I₂, TXA₂ – thromboxane A₂, LTC₄ – leukotriene C₄, 5-HPETE – 5 – 5-hydroperoxyeicosatetraenoic acid (after [50] with modifications).

стагландинов. Данные молекулы способны появляться в результате ферментативного каскада окислительных реакций арахидоновой кислоты (АК), источниками которой служат мембранные фосфолипиды (рис. 2).

АК метаболизируется простагландин-Н-синтазой, которая с помощью ЦОГ и пероксидазы приводит к производству соответственно простагландинов PGG₂ и PGH₂. PGH₂ затем модифицируется специфическими синтазами до простагландинов D₂, E₂, F_{2α}, I₂ и TXA₂, которые опосредуют специфические клеточные функции [3].

PGH-синтаза, также известная как ЦОГ, существует в двух изоформах (ЦОГ-1 и ЦОГ-2), которые имеют значительную степень гомологии их аминокислотных последовательностей. Единственное замещение аминокислоты в каталитическом сайте фермента – в 523 положении у ЦОГ-1 находится изолейцин, а у ЦОГ-2 – валлин, определяет селективность к ингибиторам изоформ ЦОГ. ЦОГ-1 присутствует в эндоплазматическом ретикулуме подавляющего числа клеток и кровяных пластинок. Именно она способствует синтезу простагландинов, определяющих протекторные свойства слизистой оболочки желудка, нормальный почечный кровоток, процессы активации и агрегации тромбоцитов. ЦОГ-2 присутствует у млекопитающих в ограниченном числе клеток. Производство данной изоформы ЦОГ активируется воспалительными стимулами и факторами роста, способствует образованию простагландинов и последующему развитию воспалительной реакции [3].

Основной механизм антитромботического эффекта АСК реализуется благодаря ингибированию ЦОГ. При этом данный эффект в 170 раз более мощный для ЦОГ-1 по сравнению с ЦОГ-2. ЦОГ-1 полностью инактивируется АСК, а ЦОГ-2 превращает АК не в PGH₂, а в 15-R-гидроксизйкозотетраеновую кислоту (15-R-НЕТЕ). Обе изоформы ЦОГ способны превращать АК в PGH₂, что является обязательным условием для образования простаноидов.

Из-за эффектов аспирина блокируется синтез PGF₂ и PGE₂ клетками гладкой мускулатуры кровеносных сосудов. PGF₂ является простаноидом с сосудосуживающими свойствами, а PGE₂, напротив, вызывает вазодилатацию, увеличивает про-

нищаемость сосудов, способствуя экстравазации жидкости [51], и играет решающую роль в развитии пяти основных признаков воспаления: отека, эритемы, боли, лихорадки и потери функции [50].

Изменение метаболизма арахидоновой кислоты под влиянием аспирина влияет и на продукцию эндотелием сосудов простаглицина PGI_2 (рис. 2), который является сильнодействующим вазодилатором и ингибитором адгезии тромбоцитов к эндотелию и действует через Gs-белок, что аналогично действию эндотелиального оксида азота. Благодаря этому аспирин предотвращает повреждение эндотелия, которое возникает, например, при атеросклерозе, вызывая спазм сосудов и тромбоз [50].

Тромбоциты продуцируют тромбоксан TXA_2 , который является одним из основных индукторов агрегации тромбоцитов и мощным вазоконстриктором, действующим через путь Gq-белка. Его синтез усиливается во время воспаления и повреждения тканей, а также после активации тромбоцитов. Это важно для сужения артериальных сосудов при повреждении сосуда и кровотечении (гемостатическая функция) [50]. Как видно из рис. 2, антитромбоцитарный эффект АСК связан с уменьшением образования TXA_2 вследствие ингибирования ЦОГ-1 тромбоцитов.

Индucedированное АСК ингибирование TXA_2 и PGI_2 оказывает противоположные эффекты на гемостаз, однако антитромботические эффекты ингибирования TXA_2 преобладают [3, 51]. При этом снижение выработки простаглицлинов и TXA_2 может предопределять как терапевтические, так и токсические свойства аспирина.

При сосудисто-тромбоцитарном гемостазе (СТГ) активация тромбоцитов коллагеном или аденозиндифосфатом (АДФ) сопровождается стимуляцией функции гранулоцитов, их адгезией и агрегацией. При этом агрегация гранулоцитов находится в прямой зависимости от числа тромбоцитов, а оптимальный ее уровень достигается при количественном соотношении тромбоциты/лейкоциты как 46/1. В результате стимуляции тромбоциты выделяют факторы с выраженным хемотаксисом относительно гранулоцитов – антигепариновый фактор (P4), тромбоцитарный фактор роста (PDGF) и β -тромбоглобулин (β -TG) [53].

Существуют утверждения, что молекулярный механизм активации СТГ осуществляется с помощью *провоспалительных (усиливают агрегацию и адгезию тромбоцитов и агрегацию гранулоцитов) и противовоспалительных (подавляют агрегацию) цитокинов* [52, 53]. Сразу после активации тромбоцитов происходит секреция IL-1, IL-6 и GM-CSF. IL-1, выделяясь из тромбоцитов, стимулирует синтез и секрецию других провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-8, TNF- α), стимулируя воспалительные реакции. Так, повышение концентрации TNF- α , IL-1, IL-6 в крови приводит к увеличению содержания фактора Виллебранда [53], а повышение IL-1 и IL-8 – к увеличению количества белков клеточной адгезии Р-селектина (CD62P) и CD63 (TSPAN30), а также тромбоцитарных микровезикул [54]. IL-6, TNF- α и IFN γ также дозозависимо снижают концентрацию (или активность) металлопротеиназы ADAMTS-13, которая разрывает гигантские мультимеры фактора Виллебранда, играющего важную роль в свертываемости крови [55, 56]. Также IL-8 и TNF- α дозозависимо стимулируют образование эндотелиальными клетками “необычно крупных” мультимеров фактора Виллебранда (UL-vWF) [57]. Были выявлены и другие предположения по поводу механизма усиления СТГ провоспалительными цитокинами. Например, TNF- α может участвовать в этом процессе путем увеличения секреции катепсина G из нейтрофилов и активации тромбоцитов [58], IL-2 – способствовать агрегации, а затем и адгезии тромбоцитов с помощью белка LFA-1 [51]. Gori и соавт. указывают на немаловажный факт того, что агрегация тромбоцитов зависит не столько от какого-то конкретного цитокина, сколько от общего баланса между про- и противовоспалительными цитокинами. Они уста-

новили, что TNF- α и IL-4 играют значимую роль в обеспечении такого баланса и снижения риска остаточной реактивности тромбоцитов при остром коронарном синдроме [59].

Поскольку АСК подавляет активность тромбоцитов, препятствуя образованию TXA₂, то увеличение процессов адгезии и агрегации нейтрофилов не наблюдается [60] и соответственно данный механизм СТГ, реализуемый с участием провоспалительных цитокинов, выключается. В открытом проспективном рандомизированном исследовании ASCET было показано снижение маркеров воспаления С-реактивного белка, TNF- α , IL-6, IL-10, MCP-1, CD40L, Р-селектина и TGF- β после года терапии АСК [61]. Нужно отметить, что именно с высокой концентрацией TNF- α в сыворотке крови у 8% пациентов с метаболическим синдромом связывают резистентность к антитромботической терапии АСК [61, 62].

Следовательно, аспирин, подавляя секрецию провоспалительных и усиливая выработку противовоспалительных цитокинов, оказывает антиагрегантное, антиадгезивное и противотромботическое действие.

АСК может оказывать дополнительный *антитромботический эффект за счет образования резольвинов — гидроперекисей полиненасыщенных жирных кислот* (ПНЖК), потенцирующих ее противовоспалительное действие вследствие ингибирования синтеза PGE₂, PGF₂, TXA₂ и LT серии 4, снижения экспрессии генов IL-1 β , -2, -6, -8, -12, IFN- γ , TNF α , ЦОГ-2 [63, 64]. Так, под влиянием АСК эндотелиоциты преобразуют эйкозопентаеновую кислоту (ЭПК) в 18R-гидроксиэйкозапентаеновую кислоту (18R-гидрокси-ЭПК) при непосредственном участии ЦОГ-2. АСК ацетирует ЦОГ-2 и данный фермент утрачивает способность принимать участие в образовании простагландинов, но способен влиять на каталитическую реакцию преобразования ЭПК в 18R-гидрокси-ЭПК, которая является основным предшественником так называемого резольвина E1 (PE1). Далее 18R-гидрокси-ЭПК высвобождается из эндотелиоцитов и с участием фермента 5-липоксигеназы нейтрофилов преобразуется в 5S,12R,18R-тригидрокси-ЭПК, которая и является PE1 [65, 66]. Энзимы микросомальной системы окисления в организме человека преобразуют ЭПК в 18R-гидрокси ЭПК, далее нейтрофилы трансформируют ее в резольвины PE1 и PE2 [65]. Установлено, что содержание PE1 в плазме и сыворотке крови повышается в случае терапевтического применения АСК и/или приема ЭПК [66].

PE1 препятствует активации и трансэндотелиальной миграции нейтрофилов, что достигается за счет противовоспалительной активности данного липидного медиатора [65]. PE1 также тормозит активацию NF- κ B и снижает образование супероксид-аниона, препятствуя благодаря этим механизмам развития функционального ответа полиморфно-ядерных лейкоцитов на воспалительные стимулы. PE1 понижает уровень L-селектина и CD-18, способствующих процессу клеточной адгезии, а также продукции тромбоксанов и процессам агрегации тромбоцитов, стимулируемой посредством АДФ, тормозит высвобождение IL-12 из дендритных клеток, увеличивает экспрессию апоптотическими лейкоцитами рецептора к хемокинам CCR5, стимулирует фагоцитоз полиморфно-ядерных лейкоцитов, подвергшихся апоптозу [67, 68]. Таким образом, биологические эффекты PE1 обуславливают как противовоспалительную активность, так и работу молекулярных механизмов, обеспечивающих разрешение воспалительного процесса.

Физиологические эффекты PE1 реализуются посредством G-белок-сопряженных рецепторов ChemR 23 и BLT1 [66, 68]. Первый рецептор присутствует на мембране моноцитов, дендритных клеток и тромбоцитов, а второй — на мембране нейтрофилов. Первый молекулярный механизм действия PE1 основан на взаимодействии с рецептором ChemR23, приводящем к ингибированию активации фактора NF- κ B на поверхности макрофагов, активации фосфатидилинозитол-3-киназного/Akt-ки-

назного каскада внутриклеточной сигнализации, и как следствие — значительному росту фагоцитоза полиморфно-ядерных лейкоцитов макрофагами [69]. Второй молекулярный механизм действия PE1 основан на антагонистическом взаимодействии с BLT1 — рецептором лейкотриена B₄ и торможении физиологических эффектов лейкотриенов, обладающих провоспалительной активностью [68]. PE2 обладает сходными с PE1 биологическими эффектами, но рецепторы, на которые он способен воздействовать, пока неизвестны [70]. В условиях применения АСК из докозагексаеновой кислоты (ДГК) образуются эписомы резольвинов D (PD), например, 7S,8R,17R-тригидрокси-ДГК — эписом PD1. G-белок-сопряженные рецепторы ALX и GPR32 способны взаимодействовать с PD1 [71]. PD1 в значительной степени ингибирует миграцию нейтрофилов через эндотелий, а в клетках микроглии блокирует транскрипцию IL-1 β . В обзорах [72, 73] отмечается, что разработка и использование препаратов, способствующих разрешению воспалительного процесса, в частности, комбинированное использование АСК и ω -3 полиненасыщенных жирных кислот и/или синтетических резольвинов перспективна для борьбы с воспалительными заболеваниями, в том числе и сосудистыми патологиями.

Фермент 5-липоксигеназа активированных нейтрофилов преобразует 15R-НЕТЕ (рис. 1), образовавшуюся ранее при участии изоформы ЦОГ-2 под влиянием АСК, и превращается в 15-эпи-липоксин A₄ (AIL) [74]. AIL и PE1 могут препятствовать при стимуляции PDGF миграции гладкомышечных клеток большой подкожной вены человека и снижать фосфорилирование рецептора β PDGF. Рецептор ALX и рецептор ChemR23 были обнаружены в сосудистых гладкомышечных клетках человека. Эти результаты позволяют рассматривать периферическое заболевание сосудов как патологическое состояние, связанное с нарушением баланса в организме про- и противовоспалительных молекулярных механизмов, и предполагают возможность лечения и коррекции сосудистых поражений путем восстановления данного баланса.

Следует отметить, что ни одна другая проблема в исследованиях аспирина не обсуждалась так интенсивно, как вопрос об его *оптимальной антитромботической дозе* — часто, хотя и не обязательно правильно, считающейся равной антиагрегантной дозе.

Эффективность АСК для лечения и профилактики сердечно-сосудистых заболеваний установлена для достаточно широкого диапазона доз — от 30–50 до 1500 мг/сутки. Общепринято, что регулярные суточные дозы аспирина от 75 до 100 мг или однократный прием препарата в дозе 160 мг достаточны для ингибирования функции тромбоцитов и образования тромбоксана посредством ацетилирования ЦОГ-1 [75].

Следует обратить внимание, что в отличие от TXA₂, в синтезе которого основную роль играет ЦОГ-1, в образовании PGI₂ принимают участие обе изоформы ЦОГ [76, 77]. Именно поэтому в малых дозах АСК (30–100 мг) блокируется преимущественно ЦОГ-1, приводя к уменьшению синтеза TXA₂, тогда как активность ЦОГ-2 сохраняется, а, следовательно, уровень простациклина PGI₂ остается достаточно высоким [76].

Аспирин подвергается быстрому всасыванию в верхних отделах желудочно-кишечного тракта и нарушает функции тромбоцитов уже в течение одного часа, что связано с торможением TXA₂-зависимой агрегации тромбоцитов. Эти явления наблюдаются еще до того момента, когда АСК обнаруживается в периферической крови, поскольку АСК воздействует на тромбоциты еще в портальном кровотоке, поэтому антитромбоцитарный эффект препарата не зависит от его распределения в системном кровотоке. Именно с этим связана эффективность малых доз АСК,

поскольку больший ингибирующий эффект оказывается на тромбоциты, а не на сосудистую стенку, где происходит образование простациклина [10].

В плазме крови обычно время полураспада АСК занимает около 20 мин. Но из-за того, что тромбоциты не способны образовывать новую ЦОГ, эффект АСК длится значительно дольше — до 10 сут, что сопоставимо с длительностью полного жизненного цикла этих форменных элементов [3]. Для максимального ингибирования ЦОГ необходимо не менее суток, затем при ежедневном употреблении низких доз АСК наблюдается ее кумулятивный эффект. *In vivo* почти полное торможение образования тромбоксана и тромбоцитарных функций достигается всего через несколько минут при условии, что циркулирующие уровни неметаболизированного аспирина, способного к целевому ацетилированию, достаточно высоки. Почти полное ингибирование образования тромбоксана и агрегации тромбоцитов, вызванное арахидоновой кислотой, наблюдается в течение 5 мин после внутривенного введения 250 и 500 мг растворимого аспирина. После перорального приема 500 мг требуется 20 мин для достижения максимального эффекта и гораздо более продолжительное время для более низких доз [78]. Это и является основной причиной, по которой аспирин вводится внутривенно в случае необходимости немедленного ингибирования функции тромбоцитов, например, в качестве неотложной терапии первой линии при острых коронарных синдромах.

При этом существуют данные о том, что АСК не влияет непосредственно на коагуляцию в антиагрегантных дозах (300 мг) у здоровых людей [79]. Однако есть доказательства того, что аспирин может косвенно влиять на систему свертывания путем *ингибирования образования тромбина*. Является ли эта деятельность, главным образом, тромбоксан-зависимой или нет, еще предстоит определить. Напротив, эффект ингибирования коагуляции аспирином в высоких антиревматических дозах (3–4 г) известен давно. Это обусловлено угнетением печеночного синтеза витамин К-зависимых факторов свертывания крови.

Несмотря на неоспоримую пользу терапевтического применения АСК, данная кислота — условно оптимальный антитромбоцитарный препарат, так как у пациентов, регулярно принимающих АСК, могут возникать тромботические осложнения [80, 81]. Так, в ряде клинических исследований курсового применения АСК у пациентов с острым коронарным синдромом был обнаружен более высокий риск осложнений [81]. У больных с ишемическими осложнениями во время длительного приема АСК клинические признаки аспиринорезистентности могут достигать в разных группах от 5 до 40% [82].

Аспирин все чаще используется совместно с другими антитромботическими препаратами — двойная антитромбоцитарная терапия (ДАТ), в том числе и с более эффективными, чем АСК [83, 84]. Наиболее ярким и известным примером ДАТ является одновременное использование АСК и клопидогреля [63]. В исследовании CURE у пациентов с нестабильной стенокардией и инфарктом миокарда без элевации сегмента ST показано 20%-ное снижение относительного риска в группе лечения комбинацией клопидогреля с аспирином по сравнению с назначением плацебо с аспирином [72]. При этом главный принцип ДАТ основан на максимально раннем применении обоих указанных препаратов и их комбинаций [85].

В настоящее время, согласно данным обзора [86], ДАТ доказала свою эффективность и безопасность по сравнению с изолированной терапией АСК в случае развития острого коронарного синдрома, при профилактическом лечении тромбозов и т.д. Оптимальная продолжительность ДАТ определяется особенностями каждого отдельного клинического случая. В 2017 г. рабочая группа кардиологов по ДАТ EOK, ESC и EACTS издала обновленную версию клинических рекомендаций по использованию ДАТ [87]. Согласно этим рекомендациям, АСК остается основным препаратом в различных клинических протоколах ДАТ.

ВЛИЯНИЕ НА ФИБРИНОЛИЗ

АСК прямо и косвенно оказывает влияние и на процессы фибринолиза через разные механизмы. Двумя наиболее важными мишенями этого процесса являются тромбоциты и их медиаторы, способствующие выработке прокоагулянтных и антифибринолитических факторов, а также эндотелий сосудов, генерирующий антикоагулянтные и профибринолитические факторы. Итоговый эффект зависит от взаимодействия между этими процессами. При этом аспирин не изменяет уровни производного эндотелия — тканевого активатора плазминогена или ингибитора активатора плазминогена-1 (РАI-1) в плазме крови.

Показано, что АСК не влияет на усиление фибринолиза после физических упражнений. Тем не менее, несколько исследований на здоровых добровольцах продемонстрировали ингибирование аспирином индуцированного ишемией фибринолиза. Предполагаемый механизм действия заключался в ингибировании высвобождения эндотелиального tPA при неизменной активности РАI. Авторы делают вывод, что простаглицлин предотвращал ингибирование фибринолиза аспирином [88].

Таким образом, АСК оказывает выраженное влияние на процессы гемостаза, обладая, в первую очередь, антиагрегантным действием. Однако клинические испытания продемонстрировали, что положительные эффекты АСК нельзя полностью объяснить исключительно ее антиагрегантными свойствами, поскольку не было обнаружено, что другие агенты, ингибирующие тромбоцитарную функцию, являются такими же эффективными, как АСК.

Накопленные данные свидетельствуют о том, что окислительный стресс как результат увеличения выработки свободных радикалов и снижения уровня антиоксидантов в миокарде может играть важную роль в патогенезе и/или прогрессировании сердечно-сосудистых заболеваний, особенно при атеросклерозе и гипертонии.

АНТИОКСИДАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ

Отмечается [3, 6], что клиническая эффективность АСК и ее производных в отношении сердечно-сосудистых заболеваний часто связаны с антиоксидантными свойствами, которые основаны на мембранопротекторном и антиапоптотическом эффектах. Существует несколько гипотез молекулярного механизма антиоксидантных эффектов аспирина. В частности, было показано [44], что АСК и ее метаболиты могут тормозить цитокин-зависимую индукцию экспрессии гена NOS-II благодаря эффекту активации ядерного фактора NF-κB. Данный эффект направлен на снижение нитрозирующего стресса, сопровождающего выработку цитокинов. В модели гипоксии *in vitro* в экспериментальной работе на переживающих срезах головного мозга крыс было также показано [89], что АСК и ее основной метаболит салициловая кислота снижают окислительный стресс и активность iNOS. Поэтому в одной из основных гипотез антиоксидантного действия АСК его физиологический механизм связывают с препятствованием нитрозирующему стрессу, который часто наблюдается при выработке воспалительных цитокинов [3, 6].

В ходе экспериментального исследования Wu с соавт. было показано, что АСК при хроническом введении (перорально 12 и 56 дней по 100 мг/кг) оказывает антиоксидантный эффект, снижая уровень активных форм кислорода в аорте, а также снимая вызванную ангиотензином II гипертонию у крыс [44]. АСК уменьшает прогрессирование атеросклероза, защищая липопротеины низкой плотности от окислительной модификации, а также снижает эндотелиальную дисфункцию в атеросклеротических сосудах [3].

Аспирин может поглощать гидроксильные радикалы с образованием производных 2,3- и 2,5-дигидроксибензоата и может ацетилировать ε-аминогруппы остат-

ков лизина в белках, препятствуя их окислению. Такой механизм представляется особенно важным при предотвращении свободнорадикального окисления липопротеинов и фибриногена. Вполне вероятно, что подобные эффекты аспирина способны снижать патологические воспалительные реакции у больных с ишемической болезнью сердца [3].

В последние годы установлено, что комплексные соединения АСК с металлами, а именно цинксодержащие, зарекомендовали себя как клинически значимые антиоксиданты. Например, в экспериментах Korkmaz и соавт. на крысах показано, что аспиринат цинка (5 дней, 100 мг/кг) оказывает кардиопротективное действие в модели изопrenalинового инфаркта за счет предотвращения снижения уровня мРНК супероксиддисмутазы 1 (СОД 1) [90]. Последний эффект связан со строением СОД1, которая содержит в активном центре атом меди, и для стабилизации структуры белка ей необходим цинк [91]. Установлено, что не только СОД1, но и многие другие ферменты имеют в своей структуре атомы металлов и/или способны связываться с ними: никель (СОД, глиоксилаза I и др.) [92], марганец (СОД, каталаза, аргиназа и др.) [93], кобальт (карбоксипептидаза, карбоангидраза, алкогольдегидрогеназа и др.) [94], а цинк регулирует активность более 300 различных ферментов (оксидоредуктазы, лиазы, гидролазы, трансферазы и т.д.) [95]. Некоторые из указанных ферментов принимают важное участие в функционировании антиоксидантной и ССС систем организма, среди которых можно отметить аргиназу II как перспективную фармакологическую мишень в коррекции эндотелиальной дисфункции и целого ряда сердечно-сосудистых заболеваний. Возможность комплексообразования салициловой кислоты с переходными металлами позволяет предположить, что определенные биологические эффекты салицилатов могут быть связаны с взаимодействием с металлоферментами [96]. Было установлено, что салицилаты и АСК способны изменять активность ряда ферментов [97], в том числе и аргиназы [98].

Все эти сведения могут служить фундаментальной основой для дальнейших, более глубоких, и прикладных исследований терапевтического потенциала перспективных координативных солей АСК.

ИЗМЕНЕНИЯ ВЕГЕТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ, ПОКАЗАТЕЛЕЙ РАБОТЫ СЕРДЦА И ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ

Нарушение вегетативного баланса, характеризующееся повышенной симпатической активностью и сниженной вагусной активностью, является основным фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний. Кардиопротекторные свойства аспирина и его производных реализуются через множество различных физиологических процессов, в частности, посредством влияния на основные показатели деятельности сердца.

В ходе исследования на здоровых людях были установлены благоприятные изменения вегетативной активности после применения аспирина (7 капсул по 325 мг в течение 60 ч): наблюдалось повышение HF, снижение LF и отношения LF/HF по сравнению с группой плацебо [99]. Авторы исследования связывают эти эффекты со свойством АСК ингибировать простагландины. В то же время не было обнаружено влияния аспирина на частоту дыхания, сердечных сокращений (ЧСС) и артериальное давление. В другом плацебо-контролируемом двойном слепом исследовании хроническое ежедневное введение 500 мг АСК (7 дней) не повлияло на вариабельность сердечного ритма у 16 здоровых мужчин-добровольцев в возрасте 22–28 лет [100]. В эксперименте Furuno и соавт. на 11 здоровых мужчинах (23–39 лет) не было зарегистрировано действие аспирина (дозы от 81 до 660 мг, каждые 3 дня в течение

ние 13 дней) на ЧСС, однако доза в 162 и 660 мг АСК увеличивала вазодилатацию плечевой артерии [101].

Данные, полученные у здоровых людей в состоянии покоя, свидетельствуют о том, что АСК не влияет на сердечный ритм. При этом предварительный прием 81 мг аспирина при кардионагрузке (наклон головы на 60 градусов) улучшал показатели ВСР волонтеров [102].

В исследованиях, проведенных на крысах линии Вистар, внутрибрюшинное введение АСК в дозах 5 и 10 мг/кг привело к уменьшению ЧСС, причем данный эффект не зависел от дозы [90, 103]. В процессе комплексообразования АСК с металлами кобальта (ACCo^{2+}), цинка (ACZn^{2+}), марганца (ACMn^{2+}), никеля (ACNi^{2+}) отмечалось изменение эффекта, свойственного молекуле предшественнице – АСК: ACCo^{2+} и ACZn^{2+} в обеих тестируемых дозах снижали отрицательный хронотропный эффект, характерный для АСК; ACMn^{2+} вызывал противоположный эффект, связанный с увеличением ЧСС, а ACNi^{2+} не влиял на регистрируемый показатель.

В экспериментах на крысах в модели изопренилинового инфаркта показано, что аспиринат цинка (5 дней, 100 мг/кг) оказывал кардиопротективное действие: улучшалась сократительная функция сердца, значительно увеличились ударный объем и сердечный выброс, уменьшалась элевация сегмента ST на ЭКГ, снижалось количество воспалительного инфильтрата в тканях, а также происходило предотвращение снижения уровня мРНК супероксиддисмутазы 1 (СОД 1). В более позднем исследовании этих авторов показано, что АСТ цинка (100 мг/кг, перорально, 5 дней) не влияет на ЧСС, давление и ЭКГ, однако снижает системное сосудистое сопротивление по сравнению с контрольной группой. В следующем исследовании эта группа ученых, в целом, подтвердила свои предыдущие результаты, однако, выявила, что АСТ цинка удлиняет комплекс QRS ЭКГ на 2 мс по сравнению с контрольной группой [104]. Необходимо отметить, что указанные изменения в данном эксперименте могут быть связаны как с нарушением функционального состояния организма животных (инфаркт), так и с применением комплексного соединения АСК с цинком, что, как отмечалось выше, может значительно усиливать эффективность АСК.

Влияние АСК на артериальное давление (АД) у здоровых людей было изучено в нескольких исследованиях. Так, Boger и соавт. в исследовании на 13 здоровых женщинах (24.9 ± 0.5 г.), которые были рандомизированы для приема аспирина (100 мг/день) в течение одной недели, значимых влияний препарата на АД не было обнаружено [105].

Вместе с тем, Hermida с соавт. в первом исследовании на 55-ти здоровых людях (20.9 ± 1.8 лет, 35 мужчин и 20 женщин) после приема аспирина (500 мг/день) в течение одной недели при пробуждении, днем или перед сном зарегистрировали значимое снижение АД только при приеме аспирина днем, спустя 7–9 ч после пробуждения [106]. Во втором исследовании при использовании двух доз аспирина (100 и 500 мг/кг) и большей выборки (73 человека) предыдущие результаты были воспроизведены: дозы в 100 и 500 мг/кг приводили к небольшому, но статистически значимому снижению САД и ДАД на 2 мм рт. ст. Более выраженный эффект оказал аспирин в дозе 100 мг/кг перед сном [106]. Тем не менее, все эти эффекты были внутrigрупповыми, т.е. достоверные статистические отличия были зафиксированы между группами добровольцев, получавших разные дозы АСК и в разное время суток, однако отличий от группы плацебо не наблюдалось.

Аналогичные результаты получены и в экспериментальных исследованиях при кардионагрузке у здоровых волонтеров (наклон головы на 60 градусов): после применения аспирина изменения уровня АД не обнаружено [102]. АСК (0.01 мМ/кг, 14 дней, интрагастрально) не влиял на АД и ЧСС и у крыс линии Вистар [107]. На-

ши исследования на крысах линии Вистар (внутрибрюшинное введение АСК в дозах 5 и 10 мг/кг) также продемонстрировали отсутствие изменений со стороны АД [103].

Таким образом, на основании имеющихся данных можно заключить, что АСК не влияет на АД у здоровых людей и интактных животных.

При этом в экспериментальном исследовании Wu с соавт. показано, что АСК снимает вызванную ангиотензином II гипертонию у крыс — наблюдалось снижение систолического артериального давления в среднем на 15% (30–35 мм рт. ст.). Стоит отметить, что эти эффекты проявлялись только при хроническом введении аспирина (перорально, 12 и 56 дней по 100 мг/кг) [44].

Однако, в целом, большинство исследований, оценивающих влияние аспирина на АД при гипертонической болезни, показывают, что при использовании в низких дозах аспирин сам по себе не влияет на значения АД и не противодействует снижению АД антигипертензивными препаратами, однако улучшает их эффект [99, 102].

Комплексообразование АСК с металлами приводит к появлению новых свойств, отличных от АСК. Так, внутрибрюшинное введение крысам $АСMn^{2+}$, $АСNi^{2+}$ (10 мг/кг) в отличие от исходного соединения вызывает изменение АД, связанное прежде всего с увеличением диастолического АД, а $АСZn^{2+}$ в дозе 10 мг/кг — увеличение диастолического АД на фоне снижения систолического и пульсового [103].

Изменение АД под влиянием салицилатов может являться следствием изменения тонуса гладкой мускулатуры в стенках кровеносных сосудов.

В частности, Leithäuser с соавт. показали, что 7-дневное употребление аспирина здоровыми людьми (500 мг/день) увеличивает скорость движения эритроцитов (мм/с) по капиллярам безымянного пальца левой руки [108]. По результатам эксперимента Buchanec и соавт. установлено, что однократная доза АСК (10 мг/кг) спустя 1–2 ч улучшает кровоток в сосудах среднего пальца у детей [109]. В то же время, по данным Dahmus и соавт., аспирин (81 мг/кг, 7 дней, перорально) не влияет на микроциркуляцию в коже у взрослых здоровых людей (56 ± 1 г.) [110], однако другое исследование с применением аспирина в той же дозе (81 мг/кг, 7 дней, перорально) продемонстрировало ослабление рефлекторной вазодилатации в коже здоровых людей (53 ± 2 г.) [111], что, по мнению авторов исследования, предполагает участие тромбоцитов в рефлекторной вазодилатации за счет высвобождения вазодилатирующих факторов.

Исследования влияния АСК и ее производных на периферическую микрогемодинамику проводились и в экспериментах на животных. Было показано, что аспирин (3 дня, 100 мг/кг, перорально) улучшает показатели периферического кровотока у мышей в холодовой и тепловой пробах. В исследовании Bulckaen и соавт. установлено, что хроническое введение аспирина (перорально 90–120 мкг АСК/день, мыши, 8 или 16 недель) вызывало не только антиоксидантный эффект, но и улучшение функционирования эндотелия кровеносных сосудов, восстанавливая нормальный процесс их дилатации [112].

Методом лазерной доплеровской флоуметрии показано, что введение аспирина (5 мг/кг, внутримышечно) крысам спустя 30 мин увеличивает среднее квадратичное отклонение и значения амплитуд нейрогенного и мышечного генеза, снижает амплитуды эндотелиального генеза; спустя 60 мин наблюдается снижение скорости кровотока и амплитуд эндотелиального генеза. Интересно отметить, что такой эффект оказался статистически значимым только для участков кожи на правой стороне тела крыс, но не для симметричных участков слева [113].

Наши исследования подтвердили и дополнили эти данные. При внутрибрюшинном введении АСК в дозах 5, 10, 40, 80, 120 мг/кг крысам линии Вистар наблюда-

лось достоверное изменение активности практически всех компонентов регуляции микрососудистого тонуса, зарегистрированного методом лазерной доплеровской флоуметрии, что выражалось в увеличении эндотелий-зависимой вазодилатации, снижении периферического сопротивления, увеличении притока крови в нутритивное микрососудистое русло, улучшении веноулярного оттока. Указанные изменения максимально проявлялись при введении животным АСК в дозе 80 мг/кг [103]. Данные изменения в целом могут свидетельствовать о развитии гиперемии, которая является одним из видов проявления фармакологического действия АСК, связанного с его жаропонижающим действием. Причем результаты исследования показали, что действие АСК реализуется прежде всего на микроциркуляторном уровне и в меньшей степени на уровне центральной гемодинамики.

Введение металлов-комплексобразователей Co^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} и Ni^{2+} в структуру АСК изменило способность молекулы-предшественницы влиять на периферическую микроциркуляцию, что является существенным свойством для соединений, применяемых с целью профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний. При этом введение животным ACCo^{2+} и ACZn^{2+} привело к развитию вазодилатации и гиперемии, которая по некоторым параметрам превосходит таковую при АСК, а ACMn^{2+} и ACNi^{2+} , наоборот, к значительно менее выраженной вазодилатации, чем при введении АСК, что можно расценивать как предотвращение развития гиперемии, вызываемой АСК [114].

Вероятно, что данный эффект связан со способностью АСК блокировать ЦОГ тромбоцитов с последующим блокированием синтеза из арахидоновой кислоты простагландинов. Следствие ингибирования ЦОГ – угнетение функции тромбоксан-синтетазы и в результате уменьшение образования активного проагреганта тромбоксана A_2 , в то время как уровень простациклина, мощного естественного вазодилататора и антиагреганта, сохраняется достаточно высоким. Вероятно, что АСК в исследованном диапазоне доз вызывает подавление ЦОГ-1, что отражается в изменениях микрогемодинамики – развитии гиперемии кожи.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в современной литературе четко прослеживается возросший интерес к изучению биологических и терапевтических эффектов салицилатов. Одним из важнейших направлений остается расширение и усиление известной терапевтической активности на фоне снижения и/или ликвидации побочных эффектов. Приведенный обзор данных литературы позволяет оценить широту эффектов, оказываемых АСК на функционирование ССС. Однако применение этого препарата для лечения сердечно-сосудистых заболеваний ограничено, что связано как со множеством побочных нежелательных эффектов, так и с недостаточным количеством экспериментальных и клинических исследований, проводимых в данной области.

Учитывая большие синтетические возможности при модифицировании производных АСК, перспективным является синтез и биоскрининг ее новых производных, что поможет решить проблему снижения побочных эффектов и повышения терапевтического потенциала исходного соединения для получения эффективных лекарственных препаратов нового поколения, обладающих низкой токсичностью и высокой безопасностью для пациентов.

Очевидным также является незначительное количество исследований влияния АСК и ее производных на периферическую микрогемодинамику, что не дает полной информации о количественных и качественных изменениях микроциркуляторных процессов, не позволяет вскрыть механизмы биологического действия этих соединений на ССС. Вместе с тем, такие исследования капиллярного крово-

тока являются крайне актуальными особенно в условиях сложившейся эпидемиологической обстановки, поскольку установленным фактом является то, что основные нарушения при COVID-19 развиваются именно на уровне микрососудистого русла с развитием системной дисфункции эндотелия (вазомоторной и обменной) и активацией тромбоцитарно-сосудистого звена гемостаза, вовлекая в патологический процесс все органы и системы организма, что открывает новые перспективы экспериментальных исследований АСК и ее соединений.

ВКЛАД АВТОРОВ

Е.Н. Чуян — участие в написании всех разделов текста обзорной статьи определение ее цели и структуры, анализ данных литературы; формулировка основных идей, обобщений и выводов.

И.В. Черетаев — участие в написании текста раздела статьи “Влияние на систему гемостаза. Антиагрегантное (антитромботическое) действие”, поиск и анализ научной литературы по тематике обзорной статьи.

М.Ю. Раваева — участие в написании текста раздела статьи “Влияние на фибринолиз”, поиск и анализ научной литературы по тематике обзорной статьи.

И.С. Миронюк — участие в поиске и анализе научной литературы по тематике обзорной статьи; оформление текста статьи и списка литературы.

Т.В. Гришина — участие в поиске научной литературы по тематике обзорной статьи.

Все авторы участвовали в обсуждении обзорной статьи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Статья подготовлена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-33-70142 “Координационные соединения ацетилсалициловой кислоты: синтез, биоскрининг и целенаправленный поиск нейро- и психотропных свойств”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Григорьева А.С. Оптимизация фармакотерапевтической активности биометаллов при комплексообразовании с НПВП. Микроэлементы в медицине. 2(1): 17–22. 2000. [Grigorieva A.S. The optimization of pharmacotherapeutic activity upon the complex formation between biometals and non-steroid anti-inflammatory compounds. Trace Elements in Medicine. 2(1): 17–22. 2000. (In Russ)].
2. Bica K., Rijkse C., Nieuwenhuijsen M., Rogers R.D. In search of pure liquid salt forms of aspirin: ionic liquid approaches with acetylsalicylic acid and salicylic acid. Phys. Chem. 12: 2011–2017. 2010. <https://doi.org/10.1039/b923855g>
3. Awtry E.H., Loscalzo J. Aspirin. Circulation. 101(10): 1206–1218. 2000.
4. Rainsford K.D. Aspirin and related drugs. Sheffield. UK. CRC Press. 2004.
5. Guan X., Shao F., Xie X., Chen L., Wang W. Effects of aspirin on immobile behavior and endocrine and immune changes in the forced swimming test: comparison to fluoxetine and imipramine. Pharmacol. Biochem. Behav. 124: 361–366. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.07.002>
6. Bayram F., Reis R., Tunçer B., Sipahi H. The importance of the structural similarity of drugs used for depression and inflammation. Two comorbid diseases. Curr. Topics Med. Chem. 18(16): 1416–1421. 2018. <https://doi.org/10.2174/1568026618666180821144704>
7. Tauseef M., Sharma K.K., Fahim M. Aspirin restores normal baroreflex function in hypercholesterolemic rats by its antioxidative action. Eur. J. Pharmacol. 556(1–3): 136–143. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.11.029>
8. Brunello N., Alboni S., Capone G., Benatti C., Blom J.M., Tascedda F., Kriwin P., Mendlewicz J. Acetylsalicylic acid accelerates the antidepressant effect of fluoxetine in the chronic escape deficit model of depression. Internat. Clin. Psychopharmacol. 21(4): 219–225. 2006. <https://doi.org/10.1097/00004850-200607000-00004>
9. Almeida O.P., Flicker L., Yeap B.B., Alfonso H., McCaul K., Hankey G.J. Aspirin decreases the risk of depression in older men with high plasma homocysteine. Translat. Psychiatry. 2(8): 151. 2012. <https://doi.org/10.1038/tp.2012.79>

10. Черетаев И.В., Хусаинов Д.Р., Кореньюк И.И., Чуян Е.Н., Раваева М.Ю., Шульгин В.Ф., Гусев А.Н. Нейротропные эффекты салицилатов: физиологические механизмы. Ученые записки Крымского федер. универ. им В.И. Вернадского. Биология. Химия. 5(4): 201–213. 2019. [Cheretaev I.V., Khusainov D.R., Koreniuk I.I., Chuyan E.N., Ravaeva M.Yu., Shulgin V.F., Gusev A.N. Neurotropic effects of salicylates: physiological mechanism. Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National Univer. Series: Biology. Chemistry. 5(4): 201–213. 2019 (In Russ)].
11. Arkhipova O.V., Grishin S.N., Sitdikova G.F., Zefirov A.L. The presynaptic effects of arachidonic acid and prostaglandin E2 at the frog neuromuscular junction. *Neurosci. Behav. Physiol.* 36(3): 307–312. 2006.
<https://doi.org/10.1007/s11055-006-0017-9>
12. Angelova P., Müller W. Oxidative modulation of the transient potassium current IA by intracellular arachidonic acid in rat CA1 pyramidal neurons. *Eur. J. Neurosci.* 23(9): 2375–2384. 2006.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04767.x>
13. Rubner G., Bendsdorf K., Wellner A., Bergemann S., Gust R. Synthesis, Characterisation and Biological Evaluation of Copper and Silver Complexes based on Acetylsalicylic Acid. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 344: 684–688. 2010
14. Gilligan M.M., Gartung A., Sulciner M.L., Norris P.C., Huang S., Kieran M.W., Serhan C.N. Aspirin-triggered proresolving mediators stimulate resolution in cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116(13): 6292–6297. 2019.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1804000116>
15. Altinoz M.A., Elmaci I., Cengiz S., Emekli-Alturfan E., Ozpinar A. From epidemiology to treatment: Aspirin's prevention of brain and breast-cancer and cardioprotection may associate with its metabolite gentisic acid. *Chemico-Biol. Interact.* 291: 29–39. 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.05.016>
16. Rolka D.B., Fagot-Campagna A., Narayan K.M. Aspirin use among adults with diabetes: estimates from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes Care.* 24(2): 197–201. 2001.
<https://doi.org/10.1001/archinte.164.22.2492>
17. Terry M.B., Gammon M.D., Zhang F.F., Tawfik H., Teitelbaum S.L., Britton J.A., Subbaramaiah K., Dannenberg A.J., Neugut A.I. Association of frequency and duration of aspirin use and hormone receptor status with breast cancer risk. *J.A.M.A.* 291(20): 2433–2440. 2004.
<https://doi.org/10.1001/jama.291.20.2433>
18. Doutremepuich C., Aguejouf O., Desplat V., Eizayaga F.X. Aspirin therapy: an attempt to explain the events of prothrombotic complications after treatment discontinuation. *Thrombosis and Haemostasis.* 103(1): 171–180. 2010.
<https://doi.org/10.1160/TH09-07-0506>
19. Patrignani P., Patrono C. Aspirin and cancer. *J. Am. College Cardiol.* 68(9): 967–976. 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.05.083>
20. Jacobs E.J., Newton C.C., Gapstur S.M., Thun M.J. Daily aspirin use and cancer mortality in large US cohort. *J. Natl. Cancer Inst.* 104(16): 1208–1217. 2012.
<https://doi.org/10.1093/jnci/djs318>
21. McNeil J.J., Gibbs P., Orchard S.G., Lockery J.E., Bernstein W.B., Cao Y., Ford L., Haydon A., Kirpach B., Macrae F., McLean C., Millar J., Murray A.M., Nelson M.R., Polekhina G., Reid C.M., Richmond E., Rodriguez L.M., Shah R.C., Tie J., Umar A., van Londen G.J., Ronaldson K., Wolfe R., Woods R.L., Zalcberg J., Chan A.T., ASPREE Investigator Group. Effect of aspirin on cancer incidence and mortality in older adults. *J. Natl. Cancer Inst.* 1–24. 2020.
<https://doi.org/10.1093/jnci/djaa114>
22. Вельц Н.Ю., Журавлева Е.О., Букатина Т.М., Кутехова Г.В. Нестероидные противовоспалительные препараты: проблемы безопасности применения. Безопасность и риск фармакотерапии. 6(1): 11–18. 2018. [Velts N.Yu., Zhuravleva E.O., Bukatina T.M., Kutekhova G.V. Non steroidalanti-inflammatory drugs: problems of safe use. Safety and Risk Pharmacother. 6(1): 11–18. 2018. (In Russ)].
<https://doi.org/10.30895/2312-7821-2018-6-1-11-18>
23. Венгеровский А.И., Батурина Н.О., Саратиков А.С. Синдром Рейе – тяжелое осложнение терапии салицилатами. Экспер. и клин. фармакол. 63(2): 76–80. 2000. [Vengerovsky A.I., Baturina N.O., Saratikov A.C. Reye's Syndrome – a serious complication of treatment with salicylates. Exp. and Clin. Pharmacol. 63(2): 76–80. 2000. (In Russ)].
24. Mogilevskaya E., Demin O., Goryanin I. Kinetic model of mitochondrial krebs cycle: unraveling the mechanism of salicylate hepatotoxic effects. *J. Biol. Physics.* 32(3–4): 245–271. 2006.
<https://doi.org/10.1007/s10867-006-9015-y>
25. Sanderson S., Emery J., Baglin T., Kinmonth A.L. Narrative review: Aspirin resistance and its clinical implications. *Ann. Int. Med.* 142(5): 370–380. 2005.
26. Lanza F.L. A guide line for the treatment and prevention of NSAID–inducedulcers. *Am. J. Gastroent.* 93: 2037–2046. 1998.

27. Chan F.K., Chung S.C., Suen B.Y., Lee Y.T., Leung W.K., Leung V.K., Wu J.C., Lau J.Y., Hui Y., Lai M.S., Chan H.L., Sung J.J. Preventing recurrent upper gastrointestinal bleeding in patient with *Helicobacter pylori* infection who are taken low dose aspirin or naproxen. *N. Engl. J. Med.* 344(13): 967–973. 2001.
<https://doi.org/10.1056/nejm200103293441304>
28. Lai K.C., Lam S.K., Chu K.M., Wong B.C., Hui W.M., Hu W.H., Lau G.K., Wong W.M., Yuen M.F., Chan A.O., Lai C.L., Wong J. Lansoprazole for the prevention of recurrences of ulcer complications from long term low dose aspirin use. *N. Engl. J. Med.* 346(26): 2033–2038. 2002.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa012877>
29. Fadeyi O.O., Obafemi C.A., Adewunmi C.O., Iwalewa E.O. Antipyretic, analgesic, anti-inflammatory and cytotoxic effects of four derivatives of salicylic acid and anthranilic acid in mice and rats. *African J. Biotechnol.* 3(8): 426–431. 2004.
<https://doi.org/10.5897/AJB2004.000-2081>
30. Будрицкий А.М., Ивкин Д.Ю., Оковитый С.В., Ивкина А.С., Суханов Д.С., Дзюба А.С. Составление обзоров по доклиническим исследованиям лекарственных средств на примере висмута субсалицилата. *Вестник ВГМУ.* 18(3): 16–31. 2019. [Budrisky A.M., Ivkin D.Y., Okovity S.V., Ivkina A.S., Sukhanov D.S., Dzyuba A.S. Drawing up reviews on preclinical trials of medicines on the example of bismuth subsalicylate. *Vestnik VGMU.* 18(3): 16–31. 2019. (In Russ)].
<https://doi.org/10.22263/2312-4156.2019.3.16>
31. Lewis A.J., Cotney J., Sugrue M.F. The spontaneously contracting pregnant rat uterus as a model for anti-inflammatory drug activity. *J. Pharmacy and Pharmacol.* 27(5): 375–376. 1975.
<https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1975.tb09461.x>
32. Ignatyev I., Kondratenko Y., Fundamensky V., Kochina T. Synthesis and characterization of cobalt (II) complexes with triethanolamine and succinate and/or nitrate anions. *Transition Metal Chem.* 43(2): 127–136. 2018.
<https://doi.org/10.1007/s11243-017-0199-8>
33. Jiang Q.Y., Zhang Y.Z., Lei D.W., Zhong G.Q. Synthesis and application research situation of aspirin complexes. *Chem. Intermediates.* 8: 26–30. 2007.
34. Yun Y., Chen P., Zheng C.L., Yang Y., Duan W.G., Wang L., He B., Ma J.Q., Wang D.H., Shen Z.Q. Copper-aspirin complex inhibits cyclooxygenase-2 more selectively than aspirin. *Yakugaku Zasshi.* 127(11): 1869–1875. 2007.
<https://doi.org/10.1248/yakushi.127.1869>
35. Chohan Z.H., Iqbal M.S., Scozzafava A., Supuran C.T. Transition metal acetylsalicylates and their anti-inflammatory activity. *J. Enzyme Inhibition and Med. Chem.* 17(2): 87–91. 2002.
<https://doi.org/10.1080/14756360290030734>
36. Mohamed F.A., Aly S.A., Abdel-Rahman H.M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics evaluation of prepared zinc aspirin suppositories. *Bull. Pharm. Sci.* 26(2): 187–199. 2003.
<https://doi.org/10.21608/BFSA.2003.65483>
37. Xue S., Chen S., Wang M., Chen J. Antipyretic and analgesic effects of zinc acetylsalicylate. *J. Shenyang Pharmac. Univer.* 12(2): 133. 1995.
38. Korenyuk I.I., Husainov D.R., Shulgin V.F. Effects of Salicylic Acid and Its Salts on Electrical Activity of Neurons of *Helix albescentis*. *Neurophysiology.* 37: 127–134. 2005.
<https://doi.org/10.1007/s11062-005-0054-y>
39. Korenyuk I.I., Khusainov D.R., Shulgin V.F. Cobalt and Zinc Salicylates as Functional Analogs of an Initiating Factor in the Molluscan Nervous System. *Neurophysiology.* 38(1): 9–14. 2006.
<https://doi.org/10.1007/s11062-006-0020-3>
40. Черетаев И.В., Кореньюк И.И., Хусаинов Д.Р. Анализ АТФ-зависимых и кальциевых механизмов в реализации нейротропного действия аспирина и его производных. *Успехи совр. естествознания.* 4: 64–69. 2013. [Cheretaev I.V., Korenyuk I.I., Husainov D.R. Analysis of ATP dependent and calcium mechanisms in implementation neurotropic action of aspirin and its derivatives. *Usphehi Sovr. Estestvoznaniya.* 4: 64–69. 2013. (In Russ)].
41. Yakovchuk T.V., Katiushyna O.V., Koreniuk I.I., Khusainov D.R., Gamma T.V. Psychotropic effects of aspirin, acetylsalicylate cobalt and acetylsalicylate zinc at various doses. *Health.* 4(11): 1041–1045. 2012.
<https://doi.org/10.4236/health.2012.411159>
42. Cheretaev I.V., Korenyuk I.I., Khusainov D.R. ATP-Dependent and Calcium Mechanisms of the Effects of Salicylates on Electrical Potentials in Neurons in the Mollusk *Helix Albescentis*. *Neurosci. Behav. Physiol.* 46(6): 644–651. 2016.
<https://doi.org/10.1007/s11055-016-0291-0>
43. Чуйан Е.Н., Миронюк И.С., Раваева М.Ю., Черетаев И.В., Гришина Т.В. Показатели кардиореспираторной системы крыс при действии ацетилсалициловой кислоты и ее комплексных соединений с металлами. *Ученые записки Крымского федер. универ. им. В.И. Вернадского. Биология. Химия.* 6(2): 267–280. 2020. [Chuyan E.N., Mironyuk I.S., Ravaeva M.Yu., Cheretaev I.V., Grishina T.V. Indicators of the rat cardiorespiratory system un-

- der the action of acetylsalicylic acid and its complex compounds with metals. *Scient. notes of the Crimean Feder. Univer. after V.I. Vernadsky. Biology. Chemistry*. 6(2): 267–280. 2020. (In Russ)].
<https://doi.org/10.37279/2413-1725-2020-6-2-267-280>
44. Wu R., Lamontagne D., Champlain J. Antioxidative properties of acetylsalicylic acid on vascular tissues from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circulation*. 105(3): 387–392. 2002.
<https://doi.org/10.1161/hc0302.102609>
 45. ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group: Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17,187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2. *Lancet*. 2(8607): 349–360. 1988.
 46. Остроумова О.Д. Ацетилсалициловая кислота — препарат номер один для лечения сердечно-сосудистых заболеваний: основные показания к применению, клинические преимущества, эффективные дозы и пути повышения переносимости. *Рус. мед. журн.* 11(5): 275–281. 2003. [Ostroumova O.D. Acetylsalicylic acid—the number one drug for the treatment of cardiovascular diseases: the main indications for use, clinical benefits, effective doses and ways to increase tolerability. *Russ. Med. J.* 11(5): 275–281. 2003. (In Russ.)].
 47. Antithrombotic Trialists (ATT) Collaboration. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet*. 373(9678): 1849–1860. 2009.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60503-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60503-1)
 48. Jonathan H.C., Ashish K.K., Shravan K., Yamane D., Levine A., Jackson A.M., McCurdy M., Tabatabai A., Kumar G., Park P., Benjenk I., Menaker J., Ahmed N., Glidewell E., Presutto E., Cain S., Haridasa N., Field W., Fowler J.G., Trinh D., Johnson K.N., Kaur A., Lee A., Sebastian K.M., Ulrich A., Peña S., Carpenter R., Sudhakar S., Uppal P., Fedeles B.T., Sachs A., Dahbour L., Teeter W., Tanaka K., Galvagno S.M., Herr D.L., Scalea T.M., Mazzeffi M.A. Aspirin Use is Associated with Decreased Mechanical Ventilation, ICU Admission, and In Hospital Mortality in Hospitalized Patients with COVID-19. *Anesthesia & Analgesia*. J. Publ. Ahead of Print. 1–41. 2020.
<https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000005292>
 49. Schrör K. Acetylsalicylic acid. Second Edition. John Wiley & Sons. 459. 2016.
 50. Klabunde R. Cardiovascular physiology concept. Lippincott Williams & Wilkins. 243. 2011.
 51. Hybiak J., Broniarek I., Kirczyński G., Los L.D., Rosik J., Machaj F., Stawiński H., Jankowska K., Urasińska E. Aspirin and its pleiotropic application. *Eur. J. Pharmacol.* 866: 172–176. 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172762>
 52. Dudzinski D.M., Serhan C.N., Golan D.E., Armstrong E.J., Galanter J.M. Pharmacology of eicosanoids. Principles of pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins. 627–646. 2004.
 53. Hirashima Y., Nakamura S., Endo S., Kuwayama N., Naruse Y., Takaku A. Elevation of platelet activating factor, inflammatory cytokines, and coagulation factors in the internal jugular vein of patients with subarachnoid hemorrhage. *Neurochem. Res.* 22(10): 1249–1255. 1997.
<https://doi.org/10.1023/a:1021985030331>
 54. Nomura S., Kagawa H., Ozaki Y., Nagahama M., Yoshimura C., Fukuhara S. Relationship between platelet activation and cytokines in systemic inflammatory response syndrome patients with hematological malignancies. *Thrombosis Res.* 95(5): 205–213. 1999.
[https://doi.org/10.1016/s0049-3848\(99\)00024-9](https://doi.org/10.1016/s0049-3848(99)00024-9)
 55. Nguyen T.C., Liu A., Liu Li., Ball C., Choi H., May W.S., Aboulfatova K., Bergeron A.L., Dong J.F. Acquired ADAMTS-13 deficiency in pediatric patients with severe sepsis. *Haematologica*. 92 (1): 121–124. 2007.
<https://doi.org/10.3324/haematol.10262>
 56. Cao W.J., Niiya M., Zheng X.W., Shang D.Z., Zheng X.L. Inflammatory cytokines inhibit ADAMTS-13 synthesis in hepatic stellate cells and endothelial cells. *J. Thromb. Haemost.* 6(7): 1233–1235. 2008.
<https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.02989.x>
 57. Bernardo A., Ball C., Nolasco L., Moake J., Dong J. Effect of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultra large von Willebrand factor multimers under flow. *Blood*. 104(1): 100–106. 2004.
<https://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0107>
 58. Owen C.A., Campbell M.A., Boukedes S.S., Campbell E.G. Inducible binding of bioactive cathepsin G to the cell surface of neutrophils. *J. Immunol.* 155(12): 5803–5810. 1995.
 59. Gori A.M., Cesari F., Marcucci R., Giusti B., Paniccia R., Antonucci E., Gensini G.F., Abbate R. The balance between pro- and anti-inflammatory cytokines is associated with platelet aggregability in acute coronary syndrome patients. *Atherosclerosis*. 202(1): 255–262. 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.04.001>
 60. Кузник Б.И. Цитокины и система гемостаза I. Цитокины и сосудисто-тромбоцитарный гемостаз. *Тромбоз, гемостаз и реология*. 2: 12–23. 2012. [Kuznik B.I. Cytokines and haemostasis. *Thrombosis, hemostasis and rheology*. 2: 12–23. 2012.]

- mostasis and vascular platelet haemostasis. Thrombosis, hemostasis and rheology. 2: 12–23. 2012. (In Russ)].
61. Solheim S., Pettersen A.A., Arnesen H., Seljeflot I. No difference in the effects of clopidogrel and aspirin on inflammatory markers in patients with coronary heart disease. Thromb. Haemost. 96(5): 660–664. 2006.
 62. Генадинник А.Г., Нелаева А.А. Влияние аспирина на тромбоцитарное звено гемостаза у пациентов с метаболическим синдромом. Сахарный диабет. (4): 32–34. 2005. [Genadinnik A.G., Nelaeva A.A. Effect of aspirin on platelet hemostasis in patients with metabolic syndrome. Diabetes. (4): 32–34. 2005. (In Russ)].
<https://doi.org/10.14341/2072-0351-5963>
 63. Sternberg Z., Chichelli T., Sternberg D., Sawyer R., Ching M., Janicke D., Ambrus J.L., Yu J., Munschauer F. Relationship between inflammation and aspirin and clopidogrel antiplatelet responses in acute ischemic stroke. J. Stroke Cerebrovasc. Diseases. 25(2): 327–334. 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2015.10.001>
 64. Рождественский Д.А. Клиническая фармакология омега-3 полиненасыщенных жирных кислот. Междунар. обзоры: клин. практика и здоровье. 4: 121–134. 2014. [Rozhdestvensky D.A. Clinical pharmacology of omega-3 polyunsaturated fatty acids. Internat. Rev.: Clinical Practice and Health. 4: 121–134. 2014. (In Russ)].
 65. Serhan C.N., Hong S., Gronert K., Colgan S.P., Devchand P.R., Mirick G., Moussignac R.L. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. J. Exp. Med. 196(8): 1025–1037. 2002.
<https://doi.org/10.1084/jem.20020760>
 66. Arita M., Bianchini F., Aliberti J., Sher A., Chiang N., Hong S., Yang R., Petasis N.A., Serhan C.N. Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolving. J. Exp. Med. 201(5): 713–722. 2005.
<https://doi.org/10.1084/jem.20042031>
 67. Schwab J.M., Chiang N., Arita M., Serhan C.N. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation resolution programmes. Nature. 447(7146): 869–874. 2007.
<https://doi.org/10.1038/nature05877>
 68. Arita M., Ohira T., Sun Y.P., Elangovan S., Chiang N., Serhan C.N. Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation. J. Immunol. 178(6): 3912–3917. 2007.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.6.3912>
 69. Fredman G., Serhan C.N. Specialized proresolving mediator targets for RvE1 and RvD1 in peripheral blood and mechanisms of resolution. Biochemistry. 437(2): 185–197. 2011.
<https://doi.org/10.1042/BJ20110327>
 70. Tjonahen E., Oh S.F., Siegelman J., Elangovan S., Percarpio K.B., Hong S., Arita M., Serhan C.N. Resolvin E2: identification and anti-inflammatory actions: pivotal role of human 5-lipoxygenase in resolvin E series biosynthesis. J. Chem. Biol. 13(11): 1193–1202. 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.09.011>
 71. Cherhan C.N. Novel lipid mediators and resolution mechanism in acute inflammation. Am. J. Pathol. 177: 1576–1591. 2010.
<https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.100322>
 72. Куликов В.А., Гребенников И.Н. Резольвины, протектины и марезины— новые медиаторы воспаления. Вестник ВГМУ. 11(1): 25–30. 2012. [Kulikov V.A., Grebennikov I.N. Resolvins, protectins and maresins-new inflammatory mediators. Bull. VSMU. 11(1): 25–30. 2012. (In Russ)].
 73. Сорокин А.В., Лазаренко В.А., Прибылов С.А. Омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты и аспирин как источники нового класса биологически активных веществ: теория и практика. Курский научно-практ. вестник “Человек и его здоровье”. 3: 114–122. 2013. [Sorokin A.V., Lazarenko V.A., Pribylov S.A. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and aspirin as sources of a new class of biologically active substances: theory and practice. Kursk. Scient. and Pract. Bull. “Man and his health”. 3: 114–122. 2013. (In Russ)].
 74. Merched A.J., Ko K., Gotlinger K.H., Serhan C.N., Chan L. Atherosclerosis: evidence for impairment of resolution of vascular inflammation governed by specific lipid mediators. FASEB. 22(10): 3595–3606. 2008.
<https://doi.org/10.1096/fj.08-112201>
 75. Patrono C., Collier B., Dalen J.E., Hirsh J., Roth G. Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects. Chest. 119(1): 39–63. 2001.
https://doi.org/10.1378/chest.119.1_suppl.39s
 76. Clarke R.J., Mayo G., Price P., FitzGerald G.A. Suppression of thromboxane A2 but not systemic prostacyclin by controlled-release aspirin. N. Engl. J. Med. 325: 1137–1141. 1991.
<https://doi.org/10.1056/NEJM199110173251605>
 77. Mc Adam B.F., Catella-Lawson F., Mardini I.A., Kapoor S., Lawson J.A., FitzGerald G.A. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase-2: the human pharmacology of a selec-

- tive inhibitor of cyclooxygenase-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96(10): 272–277. 1999.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.1.272>
78. Nagelschmitz J., Blunck M., Kraetzschmar J., Ludwig M., Wensing G., Hohlfeld T. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of acetylsalicylic acid after intravenous and oral administration to healthy volunteers. *Clin. Pharmacol. Advances and Applications*. 6: 51–59. 2014.
<https://doi.org/10.2147/CPAA.S47895>
 79. Fiore L.D., Brophy M.T., Lopez A., Janson P., Deykin D. The bleeding time response to aspirin: identifying the hyperresponder. *Am. J. Clin. Pathol.* 94(3): 292–296. 1990.
<https://doi.org/10.1093/ajcp/94.3.292>
 80. Bhatt D.L., Topol E.J. Scientific and Therapeutic Advances in Antiplatelet Therapy. *Nature Rev. Drug Discovery*. 2: 15–28. 2003.
<https://doi.org/10.1038/nrd985>
 81. Alexander J.H., Harrington J.H., Harrington R.A., Tuttle R.H., Berdan L.G., Lincoff A.M., Deckers J.W., Simoons M.L., Guerci A., Hochman J.S., Wilcox R.G., Kitt M.M., Eisenberg P.R., Califf R.M., Topol E.J., Karsh K., Ruzyllo W., Stepinska J., Widimsky P., Boland J.B., Armstrong P.W. Prior aspirin use predicts worse outcomes in patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes. PURSUIT Investigators. Platelet IIb/IIIa in Unstable angina: Receptor Suppression Using Integrilin Therapy. *Am. J. Cardiol.* 83(8): 1147–1151. 1999.
[https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(99\)00049-1](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(99)00049-1)
 82. Gum P.A., Kotike-Marchant K., Poggio E.D., Gurm H., Welsh P.A., Brooks L., Sapp S.K., Topol E.J. Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *Am. J. Cardiol.* 88(3): 230–235. 2001.
[https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(01\)01631-9](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(01)01631-9)
 83. Moshfegh K., Redondo M., Julmy F., Willemin W.A., Gebauer M.U., Haerberli A., Meyer B.J. Antiplatelet effects of clopidogrel compared with aspirin after myocardial infarction: enhanced inhibitory effects of combination therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 36: 699–705. 2000.
[https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(00\)00817-2](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(00)00817-2)
 84. Yusuf S., Zhao F., Mehta S.R., Chrolavicius S., Tognoni G., Fox K.K. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N. Engl. J. Med.* 345(7): 494–502. 2001.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa010746>
 85. Steinhubl S.R., Berger P.B., Mann J.T., Fry E.T., DeLago A., Wilmer C., Topol E.J., CREDO Investigators. Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA*. 288(19): 2411–2420. 2002.
<https://doi.org/10.1001/jama.288.19.2411>
 86. Кулаков В.В., Хохлунов С.М. Двойная антитромбоцитарная терапия: современные представления по назначению, прерыванию и возобновлению. *Изв. Самарск. научн. центра Рос. акад. наук*. 17(2): 331–336. 2015. [Kulakov V.V., Khokhlunov S.M. Double antiplatelet therapy: current views on prescription, interruption and resumption. *Proc. Samara Scient. Center of the Rus. Acad. Sci.* 17(2): 331–336. 2015. (In Russ)].
 87. Valgimigli M., Bueno H., Byrne R.A., Collet J.P., Costa F., Jeppsson A., Jüni P., Kastrati A., Kolh P., Mauri L., Montalescot G., Neumann F.J., Petricevic M., Roffi M., Steg P.G., Windecker S., Zamorano J.L., Levine G.N., ESC Scientific Document Group, ESC Committee for Practice Guidelines (CPG), ESC National Cardiac Societies. 2017 ESC focused update on dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with EACTS. *Eur. Heart J.* 39(3): 213–254. 2018.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx419>
 88. Iacoviello L., Curtis A., D'Adamo M.C. Prostacyclin is required for t-PA release after venous occlusion. *Am. J. Physiol. Heart and Circul. Physiol.* 266(2): 429–434. 1994.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1994.266.2.H429>
 89. De La Cruz J.P., Guerrero A., Gonzalez-Correa J.A., Arrebola M.M., de la Cuesta S.F. Antioxidant Effect of Acetylsalicylic and Salicylic Acid in Rat Brain Slices Subjected to Hypoxia. *J. Neurosci. Res.* 75(2): 280–290. 2004.
<https://doi.org/10.1002/jnr.10851>
 90. Korkmaz S., Amanli A., Li S., Radovits T., Hegedüs P., Barnucz E., Hirschberg K., Loganathan S., Yoshikawa Y., Yasui H., Karck M., Szabó G. Superiority of zinc complex of acetylsalicylic acid to acetylsalicylic acid in preventing postischemic myocardial dysfunction. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 240(9): 1247–1255. 2015.
<https://doi.org/10.1177/1535370215570184>
 91. Sea K., Sohn S.H., Durazo A., Sheng Y., Shaw B.F., Cao X., Taylor A.B., Whitson L.J., Holloway S.P., Hart P.J., Cabelli D.E., Gralla E.B., Valentine J.S. Insights into the role of the unusual disulfide bond in copper-zinc superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 290(4): 2405–2418. 2015.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.588798>
 92. De Boer M.W., Le Blanc S.J., Dubuc J., Meier S., Heuwieser W., Arlt S., Gilbert R.O., McDougall S. Invited review: Systematic review of diagnostic tests for reproductive-tract infection and inflam-

- mation in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97(7): 3983–3999. 2014.
<https://doi.org/10.3168/jds.2013-7450>
93. *Christianson D.W.* Structural chemistry and biology of manganese metalloenzymes. *Progress Biophys. Mol. Biol.* 67(2–3): 217–252. 1997.
[https://doi.org/10.1016/s0079-6107\(97\)88477-5](https://doi.org/10.1016/s0079-6107(97)88477-5)
94. *Lindskog S.* Cobalt (II) in metalloenzymes. A reporter of structure-function relations. *Biochemistry*. Berlin, Heidelberg. Springer. 153–196. 1970.
95. *Mc Call K.A., Huang C., Fierke C.A.* Function and mechanism of zinc metalloenzymes. *J. Nutrition*. 130(5S): 1437–1446. 2000.
<https://doi.org/10.1093/jn/130.5.1437S>
96. *Foye W.O., Baum M.D., Williams D.A.* Stability of metal complexes of salicylic acid derivatives and analogs III. 3, 6-dialkyl derivatives and pyridine analogs. *J. Pharm. Sci.* 56(3): 332–336. 1967.
97. *Grisolia S., Mendelson J., Diederich D.* Inactivation of metalloenzymes by salicylate. *FEBS Letters*. 11(2): 140–143. 1970.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(70\)80512-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(70)80512-9)
98. *Belhassena I., Nouari W., Messaoud A., Nouar M., Brahimi M., Lamara S.C., Aribi M.* Aspirin enhances regulatory functional activities of monocytes and downregulates CD16 and CD40 expression in myocardial infarction autoimmune disease. *Internat. Immunopharmacol.* 83: 106349. 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106349>
99. *De Meersman R.E., Zion A.S., Lieberman J.S., Downey J.S.* Acetylsalicylic acid and autonomic modulation. *Clin. Autonomic Res.* 10(4): 197–201. 2000.
<https://doi.org/10.1007/BF02291356>
100. *Siepmann M., Rauh R., Spanos E., Dill O., Mueck H., Mueck-Weymann M.* The effects of acetylsalicylic acid on heart rate variability in healthy subjects. *Clin. Autonomic Res.* 17(2): 115–117. 2007.
<https://doi.org/10.1007/s10286-007-0408-1>
101. *Furuno T., Yamasaki F., Yokoyama T., Sato K., Sato T., Doi Y., Sugiura T.* Effects of various doses of aspirin on platelet activity and endothelial function. *Heart and Vessels*. 26(3): 267–273. 2011.
<https://doi.org/10.1007/s00380-010-0054-8>
102. *Yasumasu T., Takahara K., Otsuji Y.* Low-dose Aspirin Inhibits Cardiac Sympathetic Activation and Vagal Withdrawal Response to Morning Rising. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 70(4): 239–244. 2017.
<https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000509>
103. *Ravaeva M.Yu., Chuyan E.N., Cheretaev I.V.* Coordinating metal Co^{2+} and Zn^{2+} compounds with acetylsalicylic acid: the influence on the cardiorespiratory system. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 889(1): 012030. 2020.
<https://doi.org/10.1088/1757-899X/889/1/012030>
104. *Korkmaz-İcöz S., Atmanlı A., Radovits T., Li S., Hegedüs P., Ruppert M., Brlecic P., Yoshikawa Y., Yasui H., Karck M., Szabó G.* Administration of zinc complex of acetylsalicylic acid after the onset of myocardial injury protects the heart by upregulation of antioxidant enzymes. *J. Physiol. Sci.* 66(2): 113–125. 2016.
<https://doi.org/10.1007/s12576-015-0403-6>
105. *Böger R.H., Bode-Böger S.M., Kramme P., Tsikas D., Gutzki F.M., Frölich J.C.* Effect of captopril on prostacyclin and nitric oxide formation in healthy human subjects: interaction with low dose acetylsalicylic acid. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 42(6): 721–727. 1996.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.1996.00480.x>
106. *Hermida R.C., Fernández J.R., Ayala D.E., Mojón A., Iglesias M.* Influence of aspirin usage on blood pressure: dose and administration-time dependencies. *Chronobiol. Internat.* 14(6): 619–637. 1997.
<https://doi.org/10.3109/07420529709001452>
107. *Сонин Д.Л., Дементьева Д.Л., Чёфу С.Г.* Влияние препарата Нотромбел на системную гемодинамику и толерантность к тромбину в эксперименте. Регионарн. кровообращение и микроциркуляция. 16(4): 65–72. 2017. [*Sonin D.L., Dementieva D.L., Chifu S.G.* Effect of the drug Notrombel on systemic hemodynamics and thrombin tolerance in the experiment. *Regional Blood Circulation and Microcirculation*. 16(4): 65–72. 2017. (In Russ)].
<https://doi.org/10.24884/1682-6655-2017-16-4-65-72>
108. *Leithäuser B., Mrowietz C., Park J.W., Jung F.* Influence of acetylsalicylic acid (Aspirin) on cutaneous microcirculation. *Clin. Hemorheol. Microcirculat.* 50(1–2): 25–34. 2012.
<https://doi.org/10.3233/CH-2011-1440>
109. *Buchanec J., Vismovsky P., Buchancová J., Cervendková E.* The effect of acetylsalicylic acid on some parameters of peripheral circulation in children (author's transl). *Klin. Pediatrie*. 191(3): 301–304. 1979.

110. Dahmus J.D., Bruning R.S., Larry K.W., Alexander L.M. Oral clopidogrel improves cutaneous microvascular function through EDHF-dependent mechanisms in middle-aged humans. *Am. J. Physiol. Regulatory, Integrative and Compar. Physiol.* 305(4): 452–458. 2013.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00366.2012>
111. Holowatz L.A., Jennings J.D., Lang J.A., Kenney W.L. Systemic low-dose aspirin and clopidogrel independently attenuate reflex cutaneous vasodilation in middle-aged humans. *J. Appl. Physiol.* 108(6): 1575–1581. 2010.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01362.2009>
112. Bulckaen H., Prévost G., Boulanger E., Robitaille G., Roquet V., Gaxatte C., Garçon G., Corman B., Gosset P., Shirali P., Creusy C., Puisieux F. Low-dose aspirin prevents age-related endothelial dysfunction in a mouse model of physiological aging. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294(4): H1562–H1570. 2008.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00241.2007>
113. Mikhailichenko L.A., Tikhomirova I.A. Parameters of microcirculation in paired formations after single aspirin administration: laser Doppler flowmetry data. *Bull. Exp. Biol. Med.* 151(1): 16–21. 2011.
<https://doi.org/10.1007/s10517-011-1249-4>
114. Раваева М.Ю., Чуян Е.Н., Мироныук И.С., Черетаев И.В., Гришина Т.В. Показатели тканевой микрогемодинамики крыс при действии ацетилсалициловой кислоты и ее комплексных соединений с металлами. *Журн. эвол. биох. физиол.* 57(1): 71–82. 2021. [Ravaeva M.Yu., Chuyan E.N., Mironyuk I.S., Cheretaev I.V., Grishina T.V. Indicators of tissue microhemodynamics in rats exposed to acetylsalicylic acid and metal salicylates. *J. Evol. Biohim. Phys.* 57(1): 71–82. 2021. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0044452921010083>

Physiological Mechanisms of Salicilates Action on the Cardiovascular System

E. N. Chuyan^{a,*}, I. S. Mironyuk^a, I. V. Cheretaev^a, M. Yu. Ravaeva^a, and T. V. Grishina^a

^aVernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Crimea, Russia

*e-mail: elena-chuyan@rambler.ru

In modern literature, there is an increased interest in studying the biological and therapeutic effects of salicylates. Extensive clinical trials have demonstrated the effectiveness of acetylsalicylic acid (ASA) and its complex compounds in the treatment and prevention of ischemic heart disease, chronic heart failure, hypertension, and others, which makes it possible to assess the breadth of beneficial effects of ASA on the functioning of the cardiovascular system (CVS) and to state lack of other equivalent medicines in the coming years. The essential direction remains the expansion and enhancement of the known therapeutic activity (antipyretic, analgesic, anti-inflammatory, antioxidant, anti-depressant, anti-migraine, anxiolytic, etc.) against the background of reducing and/or eliminating side effects since ASA occupies a leading position among all non-steroidal anti-inflammatory drugs in terms of volumes and one of the first places for the number of side effects. A promising solution to this problem is the creation of complex compounds of salicylates, since the formation of new coordination compounds based on them may lead to the emergence of new useful biological properties, as well as the strengthening of physiological effects characteristic of ASA, which will help to solve the problem of reducing side effects, resistance to aspirin therapy and increasing the therapeutic potential of the initial compound to obtain effective new-generation drugs. The article summarizes extensive information about the physiological and molecular mechanisms of action of ASA and its derivatives on CVS in health and disease, including on various physiological and biochemical links of the body's homeostasis: vasoregulatory function of the vascular endothelium, vascular-platelet hemostasis; fibrinolysis; processes of free radical oxidation and antioxidant protection; cyclooxygenase and lipoxygenase pathways of arachidonic acid oxidation; molecular markers of inflammation processes (prostaglandins; pro- and anti-inflammatory cytokines; anti-inflammatory lipid mediators). We analyzed and described the literature data and our own experimental studies of salicylates' effects on central hemodynamics and tissue microcirculation. We concluded that it is promising to study quantitative and qualitative changes in microcirculatory pro-

cesses under the influence of ASA and its derivatives, which will clarify the mechanisms of these compounds' biological action on the CVS.

Keywords: acetylsalicylic acid, cardiotropic effects, central hemodynamics, microcirculation, vascular-platelet hemostasis, fibrinolysis

ЦИТИРОВАТЬ:

Чуян Е.Н., Миронюк И.С., Черетаев И.В., Раваева М.Ю., Гришина Т.В. Физиологические механизмы действия салицилатов на сердечно-сосудистую систему. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 107(3): 288–311. 2021.

DOI: 10.31857/S0869813921030055

TO CITE THIS ARTICLE:

Chuyan E.N., Mironyuk I.S., Cheretaev I.V., Ravaeva M.Yu., Grishina T.V. Physiological mechanisms of salicilates action on the cardiovascular system. Russian Journal of Physiology. 107(3): 288–311. 2021.

DOI: 10.31857/S0869813921030055

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЗВЕНЬЕВ СТРЕСС-РЕАЛИЗУЮЩЕЙ
И СТРЕСС-ЛИМИТИРУЮЩЕЙ СИСТЕМ В УСЛОВИЯХ
СВЕТОВОГО ДЕСИНХРОНОЗА**

© 2021 г. О. В. Злобина¹, А. О. Москвина^{1, *}, А. Н. Иванов¹, И. О. Бугаева¹

¹*Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского,
Саратов, Россия*

**E-mail: aleksa590@yandex.ru*

Поступила в редакцию 05.11.2020 г.

После доработки 02.12.2020 г.

Принята к публикации 18.12.2020 г.

Секреция большинства гормонов подчиняется биологической цикличности и при ее нарушении приближается к уровню, обуславливающему развитие патологических процессов. Для их предотвращения важно учитывать не только эффекты стресс-реализующей системы, но и состояние компонентов стресс-лимитирующей системы. Отсутствие конкретики по поводу эндокринных сдвигов в условиях светового десинхроноза определили целесообразность экспериментального исследования гормонального статуса стресс-систем. Эксперимент проведен на 48 белых крысах-самцах, разделенных на 4 равные группы: контрольную и три опытные. 1-я, 2-я и 3-я опытные группы животных находились под круглосуточным искусственным освещением на протяжении 1, 10 и 21 суток соответственно. Животные контрольной группы (4-й) содержались в условиях естественного освещения. Активность стресс-систем оценивали методом иммуноферментного анализа сыворотки крови, определяя концентрацию адренокортикотропного гормона (АКТГ), мелатонина и β -эндорфина. В мазках крови подсчитывали количество гранул катехоламинов на 100 эритроцитов в 10 полях зрения. На 1-е сутки эксперимента происходило увеличение катехоламинов и АКТГ, снижение бета-эндорфина по сравнению с контрольными значениями. Кортикотропин 2-й и 3-й опытных групп претерпевал лишь небольшие колебания. 10-е сутки характеризовались увеличением содержания катехоламинов по сравнению с особями контрольной группы. При оценке изменений после 21-дневной темновой депривации отмечено резкое увеличение концентрации катехоламинов, падение уровня мелатонина. В эксперименте наблюдается этапность развития гормональных изменений, соответствующая стадиям общего адаптационного синдрома, что обусловлено нарушением мелатониновых ритмов. Круглосуточное освещение оказывает выраженное негативное воздействие на состояние организма и ведет к срыву механизмов стресс-лимитирующей системы. Результаты экспериментов позволяют сделать вывод о том, что световой десинхроноз является фактором риска развития патологий нейроэндокринной системы, это обуславливает необходимость более подробного изучения данной темы с целью разработки мер профилактики развития стресса и связанных с ним болезней адаптации.

Ключевые слова: десинхроноз, гормональный фон, стресс, общий адаптационный синдром

DOI: 10.31857/S0869813921030109

Основными регуляторами всех процессов, происходящих в человеческом организме, являются нервная и эндокринная системы, взаимная работа которых направлена на регуляцию гомеостаза. Различные стрессорные факторы, воздействуя на живой организм, приводят к нарушению функциональной активности и морфологическим изменениям органных систем. Для приспособления к новым условиям включается механизм, известный как общий адаптационный синдром (стресс-реакция) [1], запускающий каскад реакций, в том числе гормонального характера, подробности которых до сих пор полностью не исследованы.

Секреция большинства гормонов подчиняется биологической цикличности и при ее нарушении не соответствует физиологической норме, нередко приближаясь к уровню, обуславливающему развитие патологических процессов. Для их предотвращения важно учитывать не только эффекты стресс-реализующей системы, но и состояние компонентов стресс-лимитирующей системы. Развитие десинхронизации биоритмов напрямую связывают с изменением синтеза мелатонина, однако анализ данных литературы приводит к выводу о более глобальных нейро-эндокринно-иммунных изменениях с участием оси эпифиз—гипоталамус—надпочечники [2].

Наличие множества неподтвержденных гипотез и отсутствие конкретики по поводу эндокринных сдвигов в условиях светового десинхроноза [3–6] определили целесообразность экспериментального исследования с лабораторным контролем концентраций катехоламинов, мелатонина, адренкортикотропного гормона (АКТГ) и β -эндорфина.

Цель работы: изучить гормональный статус стресс-систем в условиях светового десинхроноза в эксперименте.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Практическую часть исследования выполняли на базе научных лабораторий кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии и кафедры нормальной физиологии им. И.А. Чувского Саратовского ГМУ им. В.И. Разумовского в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной медицинской ассоциации о гуманном отношении к животным (редакция 2000 г.), Женевской конвенцией “International Guiding Principles for Biomedical Involving Animals” (Geneva, 1990), а также после одобрения работы этическим комитетом ФГБОУ ВО СГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России (протокол № 4 от 06.12.2016).

Для формирования десинхроноза использовалась модель Light/Light (L/L), световой режим которой подразумевает под собой постоянное, непрерывное искусственное освещение в лаборатории мощностью 300 лк в светлое и 500 лк — в темное время суток. Изучение биохимических изменений, вызванных созданными условиями, проводили на 48 нелинейных белых крысах-самцах массой около 250 г, разделенных случайным образом на 4 равные группы: 3 опытных и 1 контрольную. 1-я, 2-я и 3-я опытные группы животных находились под круглосуточным искусственным освещением лампами дневного света, эквивалентными по мощности лампе накаливания в 60 Вт, на протяжении 1-х, 10-ти и 21-х суток соответственно. Животные контрольной группы (4-я) весь эксперимент содержались в условиях естественного освещения. Питание каждой группы крыс осуществлялось стандартным рационом со свободным доступом к пище и воде.

Животных выводили из эксперимента в первой половине дня (с 9:00 до 13:00) в осенне-зимний период путем передозировки наркотических препаратов. При проведении манипуляций крыс вводили в наркоз комбинацией Телазола (Zoetis Inc, США) в дозе 8 мг/кг и Ксиланита (Нита-Фарм, Россия) в дозе 8 мг/кг, введенных

внутримышечно. Забор крови осуществляли из правых отделов сердца в пластиковые пробирки BD Vacutainer SST™ II Advance REF с желтой крышкой Brand Vacutainer объемом 5 мл. Для биохимического исследования активности стресс-лимитирующей, стресс-реализующей систем и изменений концентрации мелатонина, получали сыворотку крови путем центрифугирования при 3000 об./мин в течение 20 мин не позднее 3-х часов с момента получения образцов. Аликвоты сыворотки крови замораживали и хранили при температуре -20°C .

С помощью иммуноферментного анализа проводилось определение в сыворотке крови концентраций мелатонина (MT), АКТГ и β -эндорфина (bEP). Иммуноферментный анализ проводили с использованием наборов реактивов ELISA Kit For Melatonin (MT), ELISA Kit For Adrenocorticotrophic Hormone (ACTH), ELISA Kit For Beta-Endorphin (bEP) производства CLOUD-CLONE CORP. (США) на иммуноферментном анализаторе Lazurit Automated ELISA System (Dynex Technology Inc, США).

Помимо иммуноферментного анализа производился подсчет гранул катехоламинов, сорбированных на эритроцитах, в мазках крови, приготовленных с использованием цитохимического метода Мардарь и Кладиенко [7]. Анализ мазков крови проводили с помощью микровизора проходящего света (μ Vizo-103 (ООО ЛОМО ФОТОНИКА, РФ)), подсчитывали количество гранул на 100 эритроцитов в 10 полях зрения.

Для обработки полученных в ходе исследования данных использовали пакет прикладных статистических программ Statistica 10.0 (Stat Soft Inc, США). Для проверки нормальности распределения значений в выборке использовали критерий Пирсона. Так как полученные данные имели распределение, отличное от нормального при дальнейшей статистической обработке показатель достоверности различий (p) вычисляли с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Значимыми считали изменения при $p < 0.05$. Для каждой группы вычисляли медиану, нижний и верхний квартили.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе проведенного нами эксперимента демонстрируются различные изменения биохимических показателей функциональной активности системы гипоталамус–гипофиз–надпочечники, что позволяет установить стрессорный характер используемой модели непрерывного освещения. Этот вывод согласуется с результатами определения концентраций АКТГ, мелатонина, β -эндорфина и катехоламинов опытных животных (табл. 1). Благодаря полученным данным открылась возможность проанализировать изменение эффективности стресс-реализующей и стресс-лимитирующей систем в ответ на действие раздражителя на фоне искусственно созданного светового десинхроноза.

Развитие общего адаптационного синдрома начинается с выброса катехоламинов. В первые сутки эксперимента происходит достоверное увеличение количества сорбированных на эритроцитах гранул катехоламинов в 4 раза (по сравнению с контролем), спустя 10 дней содержание их уменьшается на 30% от 1-х суток и превышает контрольные показатели в 2.7 раза. 21-е сутки характеризуются увеличением катехоламинов на эритроцитах животных в 5.5 раз.

Наблюдается тенденция к общему снижению уровня мелатонина в крови опытных групп животных, однако достоверное уменьшение “водителя ритмов” вдвое относительно показателей контрольной группы было выявлено лишь на 21-е сутки, что говорит о развитии стресс-реакции, обусловленной десинхронизацией цирка-

Таблица 1. Трансформация гормональных показателей стресс-систем и мелатонина в зависимости от длительности нарушения циркадианного ритма при круглосуточном искусственном освещении

Table 1. Transformation of hormonal indicators of stress systems and melatonin, depending on the duration of circadian rhythm disturbance in round-the-clock artificial lighting

Концентрация гормонов Concentration of hormones	Группа животных Group of animals			
	контроль control	1	2	3
Мелатонин, пг/мл Melatonin, pg/mL	77 (64; 113)	72 (51; 94) $p_1 = 0,27$ –6.5%/сутки	47 (33; 58) $p_1 = 0,06$ –4%/сутки	36 (29; 39) $p_1 < 0,01^*$ –2.5%/сутки
АКТГ, пг/мл ACTH, pg/mL	20 (17; 22)	33 (31; 113) $p_1 = 0,01^*$ +65%/сутки	30 (27; 52) $p_1 < 0,01^*$ +5%/сутки	31 (28; 40) $p_1 < 0,01^*$ +2.6%/сутки
β-эндорфин, пг/мл β-endorfin, pg/mL	66 (61; 81)	25 (22; 31) $p_1 < 0,001^*$ –62%/сутки	86 (34; 158) $p_1 = 0,67$ +3%/сутки	49 (37; 91) $p_1 = 0,52$ Срыв механизмов стресс-лимитирующей системы Failure of the mechanisms of the stress-limiting system
Катехоламины, у.е. Catecholamines, c.u.	24 (18; 33)	93 (47; 131) $p_1 < 0,001^*$	65 (50; 75) $p_1 < 0,001^*$	132 (94; 153) $p_1 < 0,001^*$

В данной таблице в каждом случае приведены медиана, верхний и нижний квартили, p_1 — по сравнению с контрольной группой эксперимента, в процентах указана скорость трансформации гормональных показателей; каждая группа содержит 12 особей ($n = 12$). * — достоверные изменения, $p < 0,05$. The median, upper and lower quartiles are given in this table in each case, p_1 is compared with the control group of the experiment, the rate of transformation of hormonal parameters is indicated in percent; each group contains 12 individuals ($n = 12$). * — significant changes, $p < 0,05$.

дианнных ритмов (табл. 1). При этом снижение концентрации гормона на 1-е сутки является физиологической реакцией на воздействие света.

С помощью иммуноферментного анализа удалось отметить достоверное повышение показателя АКТГ в крови каждой опытной модели по отношению к контролю. После круглосуточного освещения животных 1-й группы значение кортикотропина повысилось на 65%, далее происходили лишь небольшие колебания установившегося уровня содержания данного гормона. Скорость изменения концентрации АКТГ в крови крыс 2-й опытной группы составляла 5% в сутки, 3-й группы — 2.6% в сутки (табл. 1).

На фоне повышения содержания кортикотропина 1-й группы особей было зарегистрировано достоверное резкое падение уровня β-эндорфина в крови, показатели стали меньше контрольных значений в 2.6 раза. При этом опиоидный гормон 2-й и 3-й групп имел тенденцию к увеличению с разной скоростью, но данные изменения не подтверждены статистической значимостью.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Адаптивный ответ на опасную ситуацию пропорционален интенсивности стимула и лежит в диапазоне от простой ограниченной реакции до генерализованного системного состояния, которое захватывает и вовлекает весь механизм [8]. При использовании модели L/L происходит постоянное, непрерывное воздействие светом на лабораторных животных, что должно вызывать максимальный ответ стресс-реакции, изменяющий гормональный баланс и состояние организма в целом.

В результате нахождения под источником света возбуждаются нейроны супрахиазматических ядер гипоталамуса, уровень мелатонина при этом падает пропорционально интенсивности светового стимула. Критическое снижение концентрации гормона сна ведет к развитию десинхроноза и запуску стресс-реакции.

По уровню мелатонина и гормонов стресс-систем открывается возможность определить сроки срыва регуляторных механизмов в условиях аномального светового воздействия. Нарушения мелатониновой регуляции в нашем эксперименте развиваются к 10-м суткам, их сохранение до 21-х суток ведет к срыву механизмов стресс-лимитирующей системы и неконтролируемой активации стресс-реализующих компонентов, что может приводить к органным нарушениям [3–5].

Гормональные изменения в организме крыс соответствуют стадийности развития общего адаптационного синдрома. Содержание катехоламинов в крови 1-й группы животных может говорить о вступлении организма в “стадию тревоги” и соответственно выраженной активации симпатoadреналовой системы. Это доказывается соответствующим снижением уровня β -эндорфина, который является одним из центральных компонентов стресс-лимитирующей системы [9], способной ограничивать эффекты стресс-реализующей системы, предупреждая повреждение тканей живого организма и выполняя защитную функцию. Опиатная система – одна из самых быстро реагирующих, моментальное увеличение секреции β -эндорфина объясняется тем, что стресс вызывает в гипофизе повышенную продукцию белка-предшественника – проопиомеланокортина [10].

Гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система при недостаточном действии симпатoadреналовой оси запускает адренокортикальный механизм, центром которого служит септально-гипоталамический комплекс. При раздражении нейронов данного комплекса нервные импульсы достигают срединного возвышения и стимулируют секрецию кортиколиберина, влияющего на гипофиз с последующим выделением АКТГ [11]. Содержание данного гормона повышается на 65% в 1-е сутки, при этом неблагоприятные последствия светового десинхроноза усугубляются.

Спустя 10 суток концентрация гормонов свидетельствует о наступлении “стадии сопротивления” – основной стадии общего адаптационного синдрома, которая имеет благоприятный и неблагоприятный исходы. На данном этапе количество β -эндорфина повышается, резистентность к стрессору является максимальной, уровень катехоламинов и АКТГ падает, так проявляется попытка организма адаптироваться.

3-я группа крыс находится на финальной стадии общего адаптационного синдрома, что выражается резко увеличенным выбросом катехоламинов и снижением эффективности опиатной системы. Наступление стадии истощения позволяет сделать вывод о том, что модель освещения Light/Light может повлечь необратимые морфофункциональные изменения в органах лабораторных крыс, действие стрессора в созданных условиях слишком сильное и длительное, что приводит к истощению ресурсов адаптивных механизмов и делает невозможным поддержание резистентности.

АКТГ и катехоламины – общепризнанные маркеры интенсивного воздействия стрессора, тормозом для них считают гормоны опиатной системы [10]. Резистентность нейронов гипофиза к эндорфину в эксперименте связана с нарушением циркадианных ритмов организма, индуцированных снижением продукции мелатонина. Следует также отметить неоднозначность работы стресс-реализующих систем: гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система увеличивает активность примерно в 1.5 раза, тогда как симпатoadреналовая в 3–5 раз.

Мелатониновые ритмы связаны с циклом свет/темнота, физиологическое действие сна оказывает минимальное влияние на уровни циркулирующего мелатонина [2]. Пик содержания мелатонина в плазме крови достигается в темное время суток и в течение дня снижается до минимальных значений [6, 13]. Это контрастирует с динамикой содержания АКТГ, поэтому при нахождении под непрерывным действием света уровень мелатонина постепенно снижается, провоцируя серьезные нарушения биоритмов, проявлением которых служит гормональный дисбаланс, отсутствие стрессоустойчивости.

Использование экспериментальной модели L/L приводит к выраженному гормональному отклику в живом организме. Световой раздражитель оказался достаточно сильным, чтобы способствовать наступлению последней стадии общего адаптационного синдрома у животных, неспособности стресс-лимитирующей системы ограничивать эффекты стресс-реализующей.

Ключевым маркером нарушения биоритмов является снижение уровня мелатонина, которое обратно пропорционально длительности светового воздействия.

В нашем эксперименте наблюдается этапность развития гормональных изменений стресс-реализующих систем (гипоталамо-гипофизарная-надпочечниковая: АКТГ; симпато-адреналовая система: катехоламины), стресс-лимитирующей системы (опиоидергическая система: β -эндорфин), которая соответствует стадиям общего адаптационного синдрома. При этом 1-е сутки являются стадией тревоги, происходит выраженная активация симпато-адреналовой системы и гипоталамо-гипофизарной оси, тормозятся стресс-лимитирующие системы. 10-е сутки — стадия сопротивления, возрастает активность опиатной системы, что приводит к подавлению симпатоадреналовой оси. 21-е сутки совпадают со стадией истощения, отмечается срыв механизмов стресс-лимитирующих систем, что обусловлено нарушением мелатониновых ритмов.

К сожалению, в литературе практически не встречается описание подобных исследований, что ограничивает возможность сопоставления полученных нами результатов с данными, имеющимися в мировой практике, по изменению уровней гормонов в условиях светового десинхроноза. Был найден лишь один литературный источник, в котором изучался уровень кортикостерона (как компонента стресс-реализующей системы) и серотонина (как компонента стресс-лимитирующей, серотонинергической системы) в сыворотке крови крыс в условиях 10-дневной круглосуточной темновой депривации с последующими физическими нагрузками. По результатам данного эксперимента не было выявлено изменений со стороны изучаемых стресс-систем, что говорило о нахождении животных в фазе резистентности общего адаптационного синдрома. При этом авторы подчеркивают, что выявленные адаптивные особенности могут быть характерными для весеннего периода, в который проводилось их исследование [14].

В связи с наблюдаемыми изменениями можно сделать вывод о том, что световой десинхроноз является одним из факторов риска патологий нейроэндокринной системы, способных вызывать нарушения в каждой органной системе, это обуславливает необходимость более подробного изучения данной темы с целью разработки мер профилактики развития стресса и связанных с ним болезней адаптации.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента — О.В. Злобина, А.Н. Иванов, А.О. Москвина, сбор данных — О.В. Злобина, А.О. Москвина, А.Н. Иванов, обработка данных — О.В. Злобина,

А.О. Москвина, А.Н. Иванов, написание и редактирование статьи – О.В. Злобина, А.О. Москвина, А.Н. Иванов, И.О. Бугаева.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках государственного задания ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» МЗ РФ по теме «Разработка математической модели для оценки скорости трансформации функциональных изменений в целостном организме при световом десинхронозе в необратимые морфологические изменения органов-мишеней в эксперименте».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Морозов В.Н., Хадарцев А.А. К современной трактовке механизмов стресса. Вестник новых мед. технологий. 17(1): 15–17. 2010. [Morozov V.N., Khadartsev A.A. To modern treatment of stress mechanisms. J. New Med. Technol. 17(1): 15–17. 2010. (In Russ)].
2. Matthew B., Rae S. Sex Differences in Circadian Timing Systems: Implications for Disease. Front. Neuroendocrinol. 35(1): 111–139. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2013.11.003>
3. Злобина О.В., Пахомий С.С., Бугаева И.О., Маслякова Г.Н., Иванов А.Н. Морфологические изменения в печени лабораторных животных при световом десинхронозе. Вестник новых мед. технологий. Электронное издание. № 5. 2018. [Zlobina O.V., Pakhomiy S.S., Bugaeva I.O. Maslyakova G.N., Ivanov A.N. The morphological changes of liver in laboratory animals at the light-induced desynchronosis. J. New Med. Technol. eEdition. No. 5. 2018. (In Russ)].
4. Злобина О.В., Иванов А.Н., Антонова В.М., Милашевская Т.В., Бугаева И.О. Изучение обратимости морфофункциональных изменений в почках белых крыс-самцов при экспериментальном световом десинхронозе. Саратовск. научно-мед. журн. 14(3): 363–367. 2018. [Zlobina O.V., Ivanov A.N., Antonova V.M., Milashevskaya T.V., Bugaeva I.O. The study on the refraction of morphofunctional changes in kidneys of white male rats with experimental light desynchronosis. Saratov J. Med. Scient. Res. 14(3): 363–367. 2018. (In Russ)].
5. Злобина О.В., Бугаева И.О., Пахомий С.С., Иванов А.Н., Слюсаренко Ю.А., Усольцева Е.Д. Морфологическая оценка функциональных изменений семенников под влиянием светового десинхроноза в эксперименте. Вестник новых мед. технологий. Электронное издание. № 5. 2018. [Zlobina O.V., I.O. Bugaeva I.O., Pakhomiy S.S., Ivanov A.N., Slyusarenko Yu.A., Usoltseva E.D. Morphological evaluation of functional changes of testicles under the light-induced desynchronosis in experiment. J. New Med. Technol. eEdition. No. 5. 2018. (In Russ)].
6. Осиков М.В., Гизингер О.А., Огнева О.И. Механизм влияния мелатонина на иммунный статус при экспериментальном десинхронозе в условиях светодиодного освещения. Мед. иммунология. 17(6): 517–524. 2015. [Osikov M.V., Gizinger O.A., Ogneva O.I. Mechanism of melatonin effects upon immune state in experimental desynchronosis produced under LED illumination conditions. Med. Immunology. 17(6): 517–524. 2015. (In Russ)]. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2015-6-517-524>
7. Мардарь А.И., Кладиенко Д.П. Цитохимический способ выявления катехоламинов в эритроцитах. Лаборат. дело. 10: 586–588. 1986. [Mardar A.I., Kladienko D.P. Cytochemical method for detecting catecholamines in erythrocytes. Laborat. Delo. 10: 586–588. 1986. (In Russ)].
8. Chrousos G.P. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. Ann. NY Acad. Sci. 851: 311–335. 1998. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09006.x>
9. Ласукова Т.В., Низкодубова С.В., Мухтобарова Е.Ю. Опиоидная система, ее возможная роль в механизме адаптации организма спортсменов к действию гипоксии. Вестник ТГПУ. 140(12): 215–221. 2013. [T.V. Lasukova, S.V. Nizkodubova, E.Y. Muchtobarova. The opioid system and its possible role in adaptation to hypoxia. TSPU Bulletin. 140(12): 215–221. 2013. (In Russ)].
10. Порядин Г.В., Зеличенко Л.И. Стресс и патология. Методическое пособие Рос. гос. мед. универ. 2009. [Poryadin G.V., Zelichenko L.I. Stress and pathology. Methodolog. Manual Russ. State Med. Univ. 2009. (In Russ)].
11. Бабичев В.Н. Организация и функционирование нейроэндокринной системы. Пробл. эндокринол. 1: 62–69. 2013. [Babichev V.N. Organization and functioning of the neuroendocrine system. Probl. Endocrinol. 1: 62–69. 2013. (In Russ)].

12. Солин А.В., Сериков В.С., Ляшев Ю.Д. Влияние опиоидных пептидов и мелатонина на липидный обмен при хроническом стрессе. Курский научно-практ. вестник "Человек и его здоровье". 4: 42–45. 2013. [Solín A.V., Serikov V.S., Lyashev Yu.D. Influence of opioid peptides and melatonin on lipid metabolism in chronic stress. Kursk. Sci. Pract. Bull. "Man and his health". 4: 42–45. 2013. (In Russ)].
13. Anisimov V.N., Vinogradova I.A., Panchenko A.V. Light-at-night-induced circadian disruption, cancer and aging. Curr. Aging Sci. 5(3): 170–77. 2017. <https://doi.org/10.2174/1874609811205030002>
14. Гостюхина А.А., Замощина Т.А., Зайцев К.В., Гутор С.С., Жукова О.Б., Светлик М.В., Абдулкина Н.Г., Зайцев А.А. Адаптивные реакции крыс после световых десинхронозов и физического переутомления. Бюлл. сибирск. мед. 17(3): 22–34. 2018. [Gostyukhina A.A., Zamoshchina T.A., Zaitsev K.V., Gutor S.S., Zhukova O.B., Svetlik M.V., Abdulkina N.G., Zaitsev A.A. Adaptive reactions of rats after light desynchronization and physical overwork. Bull. Siber. Med. 17(3): 22–34. 2018. (In Russ)]. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2018-3-22-34>

Functional Activity of Lines of Stress-Realizing and Stress-Limiting Systems under Light Desynchronosis

O. V. Zlobina^a, A. O. Moskvina^{a, *}, A. N. Ivanov^a, and I. O. Bugaeva^a

^aRazumovsky Saratov State Medical University, Saratov, Russia

*e-mail: aleksa590@yandex.ru

The secretion of most hormones obeys biological cyclicity and, if it is violated, approaches to the level, that determines the development of pathological processes. To prevent them, it is important to take into account not only the effects of the stress-implementing system, but also the state of the components of the stress-limiting system. The lack of specificity about endocrine shifts under conditions of light desynchronosis determined the expediency of an experimental study of the hormonal status of stress systems. *Research methods.* The experiment was carried out on 48 white male rats, which was divided into 4 equal groups: control and three experimental. The 1st, 2nd and 3rd experimental groups of animals were under round-the-clock artificial lighting during 1, 10 and 21 days respectively. Animals of the control group (4th) were kept in natural light conditions. The activity of stress-limiting and stress-realizing systems was assessed by blood serum ELISA for the concentration of ACTH, melatonin, and beta-endorphin. In blood smears, the number of catecholamine granules per 100 erythrocytes was counted in 10 fields of view. *Research results.* On the 1st day of the experiment, there was an increase of catecholamines and ACTH, a decrease of beta-endorphin in comparison with the control values. The corticotropin of the 2nd and 3rd experimental groups underwent only slight fluctuations. The 10th day is also characterized by a statistically significant increase in the content of catecholamines in comparison with individuals of the control group. When assessing changes after 21 days of dark deprivation, a significant sharp increase in the concentration of catecholamines and a drop in the level of melatonin were noted. *The discussion of the results.* In the experiment, a phased development of hormonal changes in stress systems is observed, which corresponds to the stages of OSA, which is due to a violation of melatonin rhythms. The use of the L/L lighting model has a pronounced negative effect on the state of the body as a whole and leads to a breakdown of the mechanisms of the stress-limiting system. The results of the experiment allow us to conclude that light desynchronosis is a risk factor for pathologies of the neuroendocrine system, which necessitates a more detailed study of this topic in order to develop measures to prevent the development of stress and associated diseases of adaptation.

Keywords: desynchronosis, hormonal background, stress, general adaptation syndrome

ЦИТИРОВАТЬ:

Злобина О.В., Москвина А.О., Иванов А.Н., Бугаева И.О. Функциональная активность звеньев стресс-реализующей и стресс-лимитирующей систем в условиях светового десинхроноза. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 107(3): 312–320. 2021.

DOI: 10.31857/S0869813921030109

TO CITE THIS ARTICLE:

Zlobina O.V., Moskvina A.O., Ivanov A.N., Bugaeva I.O. Functional activity of lines of stress-re-alizing and stress-limiting systems under light desynchronosis. Russian Journal of Physiology. 107(3): 312–320. 2021.

DOI: 10.31857/S0869813921030109

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ДИНАМИКА МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У КРЫС НА РАЗНЫХ
СТАДИЯХ ПОСТСТРЕССОРНОГО ПЕРИОДА В УСЛОВИЯХ АНТИГЕННОГО
ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРИ ВВЕДЕНИИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА**

© 2021 г. С. С. Перцов^{1, 2}, И. В. Алексеева^{1, *}, А. Ю. Абрамова^{1, 2}, Е. В. Никенина^{1, 3},
А. Ю. Козлов^{1, 2}, Е. В. Коплик¹, А. С. Мартюшева¹

¹Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина,
Москва, Россия

²Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова,
Москва, Россия

³Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова
("Сеченовский Университет"), Москва, Россия

*E-mail: kiv24irina@mail.ru

Поступила в редакцию 17.11.2020 г.

После доработки 14.12.2020 г.

Принята к публикации 12.01.2021 г.

Изучена динамика показателей, отражающих интенсивность обменных процессов у крыс после внутрибрюшинной инъекции липополисахарида (ЛПС, 100 мкг/кг) по окончании однократной длительной стрессорной нагрузки на модели 24-часовой иммобилизации. Объемы потребляемого кислорода и выдыхаемого углекислого газа, уровень тепловыделения определяли с помощью автоматизированной модульной установки Phenomaster (TSE Systems GmbH, Германия) через 3 ч, 1 и 8 сут после воздействия. Показано, что у животных с введением физиологического раствора изученные параметры метаболизма выражено возрастают через 1 сутки после иммобилизационного стресса. Выявленные колебания иллюстрируют интенсификацию обменных процессов у крыс в ранние сроки после экспериментального стресса. Данные изменения сохранялись даже в отдаленный период после стрессорной нагрузки – на 8-е сутки наблюдений. Обнаружено, что у особей, получавших ЛПС, в 1-е сутки постстрессорного периода наблюдается рост потребления кислорода и выделения углекислого газа, а также увеличение интенсивности теплообмена. На 8-е сутки после стрессорной нагрузки с последующей иммунной модуляцией метаболические показатели у крыс уменьшались и не отличались от таковых у интактных животных. Следовательно, антигенное воздействие путем системного введения ЛПС не оказывает влияния на вызванную стрессом активацию обменных процессов на ранних стадиях исследования, но предупреждает стойкое повышение интенсивности метаболизма в отдаленный постстрессорный период. Полученные результаты и опубликованные ранее данные позволяют предположить, что выявленный эффект ЛПС, обладающего иммуноактивными свойствами, связан с его модулирующим действием на нейро-эндокринные механизмы регуляции гомеостаза у млекопитающих, в частности, при стрессорных нагрузках.

Ключевые слова: показатели метаболизма, крысы, 24-часовой иммобилизационный стресс, липополисахарид

DOI: 10.31857/S0869813921030080

В настоящее время практически невозможно найти человека, который никогда в жизни не подвергался воздействию стрессовых факторов разной природы: социальных, экономических, физических, природных и других. Последствиями стрессорных нагрузок являются самые разнообразные патологические состояния: сердечно-сосудистые заболевания [1–3], нарушения работы печени [4, 5] и почек [6, 7], эндокринные расстройства [8–10]. Нарушение иммунного статуса является одной из наиболее серьезных дисфункций, возникающих при экстремальных внешних воздействиях [11–13]. Относительно недавно были детально проанализированы клеточно-молекулярные основы центральных механизмов, определяющих изменения нейроиммунных взаимодействий при стрессе [14].

Следует подчеркнуть, что иммунные расстройства во многом определяют системные нарушения физиологических функций в условиях стресса. Для изучения механизмов формирования и регуляции иммунных реакций в условиях физиологической нормы и при патологии широко применяются липополисахариды (ЛПС) — основные компоненты клеточной стенки грамотрицательных бактерий, обладающие широким спектром биологической активности. В настоящее время имеются убедительные доказательства того, что ЛПС оказывает модулирующее влияние как на иммунные процессы [15–17], так и на функциональную активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечникового комплекса [18, 19].

Метаболические расстройства, или болезни обмена веществ — это еще одно из распространенных патологических состояний у млекопитающих, наблюдающихся при экстремальных внешних воздействиях (например, в условиях стресса). Описаны стресс-индуцированные изменения параметров, характеризующих интенсивность обменных процессов у млекопитающих — нарушение циркадного ритма [20] и интенсивности тепловыделения [21, 22], повышение температуры тела [23, 24]. При этом колебания метаболических показателей у человека и животных являются одним из наиболее информативных критериев для оценки характера влияния внешних и внутренних факторов на состояние гомеостаза. Важными показателями для изучения процессов метаболизма являются объемы поглощаемого кислорода и выдыхаемого углекислого газа, а также уровень тепловыделения.

Существенно, что стресс-индуцированные изменения физиологических функций у млекопитающих, связанные, в том числе, с нарушением нейроиммунных взаимодействий, могут наблюдаться не только во время, но и в отдаленный период после окончания действия экстремальных факторов. В частности, в наших предыдущих исследованиях выявлены изменения некоторых показателей цитокинового профиля у крыс, подвергнутых 24-часовой иммобилизации без антигенного воздействия [25] или с последующим введением ЛПС [26], выраженность и направленность которых зависели от длительности постстрессорного периода.

Несмотря на значительный интерес к исследованию процессов метаболизма при стрессорных воздействиях, многие вопросы в этой области остаются нерешенными. Мало изучены особенности и направленность метаболических процессов на разных стадиях после стрессорных нагрузок. Отсутствуют сведения о характере влияния иммунной модуляции на метаболические параметры у млекопитающих на разных стадиях постстрессорного периода.

Целью нашей работы явилось изучение динамики показателей интенсивности метаболизма у крыс в условиях антигенного воздействия посредством системного введения ЛПС после однократной длительной стрессорной нагрузки.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на 56 крысах-самцах Вистар (масса тела — 330.4 ± 5.1 г, возраст — 3–3.5 мес.) в светлое время суток в весенне-летний период. Перед нача-

лом опытов животных содержали на карантине в течение 10 дней в клетках (по 8 особей в каждой) при температуре 20–22°C. Их ежедневно подвергали процедуре хэндлинга — неоднократному взятию в руки на протяжении 15 мин — для предотвращения стрессорных реакций на последующие экспериментальные процедуры исследователя. Крысы находились в виварии на стандартном пищевом рационе в условиях искусственного освещения (9:00–21:00 — свет, 21:00–9:00 — темнота). При проведении опытов руководствовались “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных”, утвержденными на заседании этической комиссии НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина (протокол № 1 от 3.09.2005), требованиями Всемирного общества защиты животных (WSPA) и Европейской конвенции по защите экспериментальных животных.

Были сформированы следующие экспериментальные группы. Интактные особи ($n = 8$) служили в качестве “пассивного контроля”: они проходили хэндлинг с последующим нахождением в домашних клетках до оценки метаболических показателей.

Другие животные ($n = 48$) были подвергнуты однократной длительной стрессорной нагрузке, вызванной иммобилизацией в индивидуальных пластиковых боксах размером $16.5 \times 5.5 \times 7$ см в течение 24 ч (9:00–9:00). Выбор этой модели стресса обусловлен тем, что данное воздействие приводит к ряду классических проявлений стрессорного ответа организма — язвообразованию в желудке [27], патологическим изменениям органов-маркеров стресса и росту уровня кортизола в крови [28–30].

Сразу после окончания экспериментального стресса одни крысы ($n = 24$) получали однократную внутрибрюшинную инъекцию физиологического раствора в объеме 1 мл, а другие ($n = 24$) — пирогенала (Медгамал, Россия; 100 мкг/кг ЛПС в 1 мл физиологического раствора). Ранее установлено, что инъекция ЛПС в дозировке, применяющейся в нашем исследовании (100 мкг/кг), оказывает системное действие и, в то же время, не вызывает токсического эффекта [31]. Животные с введением физиологического раствора после стрессорного воздействия, являлись “активным контролем” для особей, получавших ЛПС.

Определение числа крыс в группах “пассивного контроля” ($n = 8$), “активного контроля” ($n = 24$) и основной группе, получавшей ЛПС после стрессорной нагрузки ($n = 24$) продиктовано принципами формирования количества измерений в вариационных рядах при проведении исследований на животных. Это обусловлено, в том числе, правилами гуманного отношения к животным, а также необходимостью представленности в каждой группе достаточного числа особей для проведения корректного статистического анализа.

Метаболические показатели у крыс, подвергнутых экспериментальной стрессорной нагрузке с последующей инъекцией физиологического раствора или ЛПС, анализировали через 3 ч, 1 и 8 сут после воздействия. Выбор указанных сроков наблюдений основан на том, что наиболее выраженные нарушения физиологических функций у млекопитающих наблюдаются в конце стадии тревоги (39 ч после стрессорной нагрузки), а в начале стадии резистентности (4–е сутки) и через 7 сут после воздействия в организме проявляются компенсаторные процессы [32–35].

Показатели интенсивности метаболизма у крыс определяли с помощью автоматизированной модульной установки Phenomaster (TSE Systems GmbH, Германия) для мониторинга колебаний физиологических параметров. В состав программно-аппаратного комплекса входят метаболические клетки для индивидуального размещения животных, размеры которых соответствуют таковым домашних клеток ($45 \times 36 \times 16$ см). Непрямую калориметрию проводили с использованием модуля CaloSys (TSE Systems GmbH, Германия), позволяющего измерять расход энергии с помощью датчиков газов для метаболического фенотипирования. Перед посадкой в метаболические клетки у крыс измеряли массу тела. Животных помещали в ука-

занные клетки на 3 ч: первые 2 ч — период адаптации, 3-й час — регистрация анализируемых показателей. Данное оборудование позволяет проводить высокоточные измерения объемов потребляемого кислорода (VO_2 , мл/ч/кг) и выдыхаемого углекислого газа (VCO_2 , мл/ч/кг) в единицу времени с учетом массы тела животного. Калориметрический показатель — уровень выделения тепла в единицу времени — рассчитывали по количеству потребленного крысами кислорода и выделенного углекислого газа также с учетом массы тела животного (Н, ккал/ч/кг).

В периоды между тестированием в метаболических клетках крысы находились в домашних клетках, в условиях группового содержания и свободного доступа к пище и воде. Персональный состав клеток оставался постоянным в течение всего эксперимента.

Результаты опытов обрабатывали с помощью статистических и аналитических методов с использованием пакетов программ STATISTICA 10.0 и Microsoft Office Excel 2020. Проверку распределения числовых данных проводили тремя способами: с помощью описательной статистики, графически и с использованием статистических критериев. Статистическими критериями для определения нормальности распределения данных являлись тесты Шапиро–Уилка и Колмогорова–Смирнова. В связи с тем, что групповые выборки данных не подчинялись закону нормального распределения, для проведения статистического анализа применяли непараметрические методы. Множественное межгрупповое сравнение выборок проводили с использованием дисперсионного анализа повторных измерений: критерия Фридмана для зависимых переменных. В случае наличия статистически значимых различий по указанному критерию применяли апостериорный попарный анализ наличия межгрупповых различий с помощью *T*-критерия Вилкоксона. Проводили FDR-контроль групповой вероятности ошибки I рода. Минимальный принятый уровень значимости наблюдающихся отличий составлял 5%. Числовые данные в таблице приведены как медиана (Me), верхний и нижний квартили (Q1; Q3).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты изучения показателей интенсивности обменных процессов у крыс в разные временные периоды после введения ЛПС или физиологического раствора по окончании 24-часового иммобилизационного стресса представлены в табл. 1.

На первом этапе работы изучен характер изменений метаболических показателей у животных, получавших внутрибрюшинную инъекцию физиологического раствора после 24-часового иммобилизационного стресса. Через 3 ч после воздействия была выявлена тенденция к увеличению количества потребляемого крысами кислорода и интенсивности тепловыделения по сравнению с “пассивным контролем”. Объем выдыхаемого углекислого газа в этот период практически не отличался от такого у интактных особей.

Через 1 сутки после стрессорной нагрузки с последующим введением физиологического раствора обнаружено статистически значимое увеличение анализируемых параметров у крыс по сравнению с “пассивным контролем”: объемов потребления кислорода (на 14.4%, $p < 0.05$) и выделения углекислого газа (на 10.6%, $p < 0.05$), уровня теплообмена (на 14.2%, $p < 0.05$).

На 8-е сутки у животных, получавших физиологический раствор после стрессорного воздействия, объем потребления кислорода и интенсивность тепловыделения несколько снижались по сравнению с соответствующими показателями на предыдущей стадии наблюдений, но оставались достоверно больше значений у интактных особей (на 9.8 и 11.8% соответственно, $p < 0.05$). Выделение углекислого газа в данный период также превышало уровень в группе “пассивного контроля” (на 13.3%, $p < 0.05$).

Таблица 1. Расчетные показатели объема потребляемого кислорода (VO_2 , мл/ч/кг), выдыхаемого углекислого газа (VCO_2 , мл/ч/кг) и выделения тепла в единицу времени (H, ккал/ч/кг) с учетом массы тела крысы (Me (Q_1 ; Q_3))

Table 1. Calculated values for the volumes of consumed oxygen (VO_2 , ml/h/kg) and expired carbon dioxide (VCO_2 , ml/h/kg) and heat emission per time unit (H, kcal/h/kg) with respect to the rat body weight (Me (Q_1 ; Q_3))

Экспериментальные условия Experimental conditions	Период после воздействия Period after treatment	VO_2	VCO_2	H
Интактные крысы, $n = 8$ Intact rats, $n = 8$	—	1613.00 (1320.50; 1836.50)	1683.50 (1346.00; 1916.50)	8.20 (6.64; 9.40)
24-часовой иммобилиза- ционный стресс → физиологический раствор, $n = 24$ 24-h restraint stress → physiological saline, $n = 24$	3 ч 3 h	1820.00 (1330.00; 2008.50)	1653.00 (1276.00; 2017.50)	9.06 (6.69; 9.91)
	1 сутки 1 day	1845.50 (1516.50; 2113.50) *	1862.50 (1555.50; 2188.50) *	9.37 (7.69; 10.70) *
	8 суток 8 days	1772.00 (1440.50; 1995.50) *	1907.00 (1624.00; 2186.00) * ++	9.17 (7.50; 10.29) *
24-часовой иммобили- зационный стресс → ЛПС, $n = 24$ 24-h restraint stress → LPS, $n = 24$	3 ч 3 h	1689.00 (1361.00; 1989.00)	1622.00 (1273.00; 1908.50)	8.43 (6.81; 9.90)
	1 сутки 1 day	2054.00 (1787.50; 2460.00) *** + °	1979.50 (1762.50; 2486.50) *** +	10.39 (9.00; 12.41) ***
	8 суток 8 days	1563.00 (1289.50; 1897.00) ° x	1654.00 (1412.50; 2101.50) ° xx	7.95 (6.69; 9.79) °
Friedman ANOVA		$\chi_r^2 = 116.88$ $p = 0.00$	$\chi_r^2 = 140.02$ $p = 0.00$	$\chi_r^2 = 119.54$ $p = 0.00$

* $p < 0.05$ и *** $p < 0.001$ по сравнению с интактными крысами (“пассивный контроль”); + $p < 0.05$ и ++ $p < 0.01$ по сравнению с показателями через 3 ч; x $p < 0.05$ и xx $p < 0.01$ по сравнению с показателями через 1 сутки; ° $p < 0.05$ по сравнению с крысами, получавшими физиологический раствор (“активный контроль”). Жирный шрифт – статистически значимые различия.

* $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ compared to intact rats (“passive control”); + $p < 0.05$ and ++ $p < 0.01$ compared to parameters after 3 h; x $p < 0.05$ and xx $p < 0.01$ compared to parameters after 1 day; ° $p < 0.05$ compared to physiological saline-receiving rats (“active control”). Statistically significant differences are set in bold.

В ходе сравнения метаболических показателей на разных стадиях постстрессорного периода у крыс, получавших физиологический раствор, получены следующие результаты. Объем потребления кислорода в 1-е и 8-е сутки исследования практически не отличался от такового через 3 ч после экспериментального стресса. Количество выдыхаемого животными углекислого газа несколько возрастало в 1-е сутки наблюдений (на 12.7%), а к 8-м суткам после стресса значимо превышало показатель через 3 ч после воздействия (на 15.4%, $p < 0.01$). Интенсивность тепловыделения на 1-е и 8-е сутки практически не отличалась от значения, зарегистрированного через 3 ч после стрессорной нагрузки. Необходимо отметить, что статистически значимых отличий изученных показателей обмена веществ у крыс на 1-е и 8-е сутки постстрессорного периода не обнаружено.

В дальнейшем были проанализированы изменения метаболических показателей у животных, получавших ЛПС после однократной длительной стрессорной нагрузки. Через 3 ч после 24-часового иммобилизационного стресса изученные параметры практически не отличались от таковых у интактных особей. Статистически значимые изменения по сравнению с “пассивным контролем” обнаружены только в 1-е сутки постстрессорного периода. В этих условиях после введения ЛПС наблюдалось увеличение объемов потребляемого крысами кислорода (на 27.3%, $p < 0.001$), выдыхаемого углекислого газа (на 17.6%, $p < 0.001$) и интенсивности тепловыделения (на 26.7%, $p < 0.001$). На 8-е сутки после эмоциогенной нагрузки с последующей иммунной модуляцией метаболические показатели у крыс уменьшались и не отличались от таковых у интактных особей.

Анализ параметров метаболизма на разных стадиях постстрессорного периода у животных с введением ЛПС показал следующее. По сравнению с показателями, зарегистрированными через 3 ч после воздействия, в 1-е сутки наблюдений обнаружена тенденция к росту интенсивности тепловыделения (на 23.2%), а также статистически значимое увеличение объемов потребляемого крысами кислорода и выдыхаемого углекислого газа (на 21.6 и 22.0% соответственно, $p < 0.05$). В отдаленный период после стресса — на 8-е сутки — выявлено уменьшение изученных параметров по сравнению с таковыми, отмеченными через 1 сутки: потребления кислорода и выделения углекислого газа — на 23.9% ($p < 0.05$) и 16,4% ($p < 0.01$) соответственно, уровня теплообмена — на 23.5% (статистически незначимо). В результате этих изменений метаболические показатели у крыс, получавших ЛПС, к 8-м суткам постстрессорного периода практически не отличались от таковых через 3 ч после воздействия.

На заключительной стадии работы проведено сравнение показателей метаболизма у крыс в условиях введения ЛПС и физиологического раствора (“активный контроль”) после 24-часовой иммобилизации. Через 3 ч после воздействия значимых межгрупповых отличий анализируемых параметров не обнаружено. В 1-е сутки постстрессорного периода объем потребления кислорода после антигенного воздействия был на 11.3% больше по сравнению с таковым у крыс, которым вводили физиологический раствор ($p < 0.05$). На 8-е сутки после стрессорной нагрузки выявлено, что крысы, получавшие ЛПС, характеризуются значимо меньшими показателями потребления кислорода и выделения углекислого газа (на 11.8 и 13.3% соответственно, $p < 0.05$), более низким уровнем тепловыделения (на 13.3%, $p < 0.05$) по сравнению с животными с введением физиологического раствора.

Таким образом, у животных с введением физиологического раствора объемы потребления кислорода, выделения углекислого газа и уровень теплопродукции выражено возрастают через 1 сутки после отрицательного эмоциогенного воздействия и остаются повышенными на 8-е сутки постстрессорного периода. На фоне иммунной модуляции ЛПС анализируемые параметры метаболизма у крыс в 1-е сутки после стрессорной нагрузки превышают соответствующие значения у интактных особей (“пассивный контроль”). К окончанию наблюдений — 8-е сутки после экспериментального стресса — все изученные показатели интенсивности обменных процессов у особей, получавших ЛПС, были меньше по сравнению с таковыми у стрессированных крыс с введением физиологического раствора.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В современной жизни одними из наиболее распространенных последствий воздействия на млекопитающих отрицательных эмоциогенных факторов являются нарушения обмена веществ. Коррекции или предупреждению стресс-индуцированных метаболических расстройств может способствовать, в частности, восстановление иммунных функций организма, например, с использованием иммуноактивных веществ.

В проведенной работе исследовали характер влияния системного введения ЛПС на показатели интенсивности обменных процессов — объемов потребляемого кислорода, выдыхаемого углекислого газа и уровня тепловыделения — у крыс в разные временные периоды после острой стрессорной нагрузки на модели 24-часовой иммобилизации.

Установлено, что у животных с введением физиологического раствора изученные параметры метаболизма выражено возрастают через 1 сутки после 24-часового иммобилизационного стресса (по сравнению с интактными особями из группы “пассивного контроля”). Выявленные колебания иллюстрируют интенсификацию

обменных процессов у крыс в ранние сроки после отрицательного эмоциогенного воздействия. Существенно, что данные изменения сохранялись даже в отдаленный период после острой стрессорной нагрузки — на 8-е сутки наблюдений.

Обнаруженное нами усиление метаболических процессов у животных в разные временные сроки после продолжительной стрессорной нагрузки может отражать развитие адаптационно-компенсаторных процессов в условиях экстремальных внешних воздействий. При этом происходит активация структур гипоталамо-гипофизарно-надпочечникового комплекса [36], повышенное выделение глюкокортикоидных гормонов из коры надпочечников в кровь [37], увеличение секреции адреналина с сопутствующей стимуляцией симпатoadреналовых механизмов [38], а также множество других гуморально-гормональных реакций [39, 20].

Полученные нами данные дополняют результаты исследований на других моделях стресса. В частности, Перцовым с соавт. [21] изучена динамика параметров метаболизма крыс в разные периоды ежедневно повторяющегося 2-часового электромагнитного излучения сверхвысоких частот (СВЧ; 900 МГц). Установлено, что наиболее выраженные колебания показателей, отражающих интенсивность обменных процессов, наблюдаются ко 2-му и особенно к 3-му сеансу облучения. Это проявлялось в увеличении объема потребляемого животными кислорода и уровня тепловыделения.

Противоположные результаты были получены при многократном воздействии на крыс низкоинтенсивного СВЧ-излучения с модуляцией частотами, характерными для экспериментально вызванных отрицательных эмоциональных состояний у животных [22]. Наиболее выраженные изменения метаболических параметров — снижение потребления кислорода, выделения углекислого газа и уровня теплообмена — выявлены на 7-е сутки опыта, не только во время облучения, но и между воздействиями.

В других исследованиях изучена динамика двигательной активности и тепловыделения у крыс с разными типами поведения в различные периоды после стрессорной нагрузки на модели 12-часовой иммобилизации [20]. Наиболее значимые изменения поведения и теплопродукции, сопровождающиеся нарушением циркадных ритмов этих параметров, были обнаружены в течение первых 2-х суток после стресса. Это указывает на высокую “устойчивость” вызванных стрессом метаболических расстройств.

Кроме того, экспериментальные и клинические исследования показали, что отрицательные эмоциогенные воздействия сопровождаются повышением температуры тела [23, 24]. По мнению авторов этих работ, такое состояние может быть связано, в частности, с усилением метаболизма в указанных условиях.

При изучении метаболических процессов у крыс в динамике после стрессорного воздействия на фоне введения ЛПС установлено, что анализируемые параметры значимо изменяются только на 1-е сутки после 24-часовой иммобилизации. Было выявлено статистически достоверное увеличение потребления кислорода, выделения углекислого газа и уровня тепловыделения. Необходимо отметить, что на 8-е сутки эксперимента указанные показатели у животных с введением ЛПС не только не отличались от параметров в группе “пассивного контроля” (интактные особи), но становились даже меньше таковых у стрессированных крыс, получавших физиологический раствор (“активный контроль”).

Полученные данные не только согласуются, но и дополняют результаты наших предыдущих экспериментов [40]. Установлено, что внутрибрюшинное введение крысам ЛПС предупреждает инволюцию тимуса в поздние сроки — на 8-е сутки — после однократного длительного стресса на модели 24-часовой иммобилизации. Кроме того, гипертрофия надпочечников, являющаяся одной из типичных реак-

ций млекопитающих на отрицательные эмоциогенные факторы, не наблюдалась на разных стадиях постстрессорного периода на фоне антигенной стимуляции.

Результаты наших исследований указывают на то, что однократная длительная стрессорная нагрузка у крыс, вызванная 24-часовой иммобилизацией, оказывает выраженное влияние на физиологические показатели. Это проявляется, в частности, в повышении уровней потребления животными кислорода и выделения углекислого газа, а также в усилении тепловыделения. Необходимо отметить, что значимые изменения указанных параметров наблюдаются как в ранний, так и в поздний постстрессорный период.

Инициация иммунных реакций под действием ЛПС на фоне стрессорного воздействия не оказывает влияния на вызванную стрессом активацию обменных процессов на ранних стадиях наблюдений, но предупреждает стойкое повышение интенсивности метаболизма в отдаленный постстрессорный период. Можно предположить, что этот эффект ЛПС, обладающего иммуноактивными свойствами, связан с его модулирующим действием на нейроэндокринные механизмы регуляции гомеостаза у млекопитающих, в частности, при стрессорных нагрузках.

ВКЛАД АВТОРОВ

С.С. Перцов — планирование эксперимента, редактирование статьи; И.В. Алексеева — обработка данных, написание статьи; А.Ю. Абрамова — планирование эксперимента, обработка данных; Е.В. Никенина — сбор данных; А.Ю. Козлов — сбор данных; Е.В. Коплик — сбор данных; А.С. Мартюшева — обработка данных.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ РАБОТЫ

Исследование выполнено за счет средств федерального бюджета, выделяемых на выполнение Государственного задания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Юматов Е.А. Сердечно-сосудистые реакции при эмоциональных перенапряжениях. Физиология человека. 6(5): 893–906. 1980. [Yumatov E.A. Cardiovascular reactions during emotional strains. Human Physiol. 6(5): 893–906. 1980. (In Russ)].
2. Болдуева С.А., Рыжакова М.В., Швец Н.С., Леонова И.А., Титова И.Ю., Кочанов И.Н. Синдром такоцубо как острая форма микроваскулярной стенокардии. Описание клинического случая. Рациональная фармакотерапия в кардиологии. 13(4): 489–494. 2017. [Boldueva S.A., Ryzhakova M.V., Shvets N.S., Leonova I.A., Titova I.Yu., Kochanov I.N. Takotsubo syndrome as an acute form of microvascular stenocardia. Description of the clinical case. Rational Pharmacotherapy in Cardiology. 13(4): 489–494. 2017. (In Russ)].
3. Redina O.E., Markel A.L. Stress, genes, and hypertension. Contribution of the ISIAH rat strain study. Curr. Hypertens. Rep. 20(8): 66. 2018. <https://doi.org/10.1007/s11906-018-0870-2>
4. Amin S.N., El-Aidi A.A., Zickri M.B., Rashed L.A., Hassan S.S. Hepatoprotective effect of blocking N-methyl-D-aspartate receptors in male albino rats exposed to acute and repeated restraint stress. Can. J. Physiol. Pharmacol. 95(6): 721–731. 2017.
5. Joung J.Y., Cho J.H., Kim Y.H., Choi S.H., Son C.G. A literature review for the mechanisms of stress-induced liver injury. Brain Behav. 9(3): e01235. 2019. <https://doi.org/10.1002/brb3.1235>
6. Marchon R.G., Ribeiro C.T., Costa W.S., Sampaio F.J.B., Pereira-Sampaio M.A., de Souza D.B. Immediate and late effects of stress on kidneys of prepubertal and adult rats. Kidney Blood Press Res. 43(6): 1919–1926. 2018.
7. Mathur S., Pollock J.S., Mathur S., Harshfield G.A., Pollock D.M. Relation of urinary endothelin-1 to stress-induced pressure natriuresis in healthy adolescents. J. Am. Soc. Hypertens. 12(1): 34–41. 2018.
8. McCarty R. Learning about stress: neural, endocrine and behavioral adaptations. Stress. 19(5): 449–475. 2016.
9. Sharif K., Watad A., Coplan L., Amital H., Shoenfeld Y., Afek A. Psychological stress and type 1 diabetes mellitus: what is the link? Expert Rev. Clin. Immunol. 14(12): 1081–1088. 2018.

10. *Stefanaki C., Pervanidou P., Boschiero D., Chrousos G.* Chronic stress and body composition disorders: implications for health and disease. *Hormones (Athens)*. 17(1): 33–43. 2018.
11. *McEwen B.S.* Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *Eur. J. Pharmacol.* 583(2-3): 174–185. 2008.
12. *Chrousos G.P.* Stress and disorders of the stress system. *Nat. Rev. Endocrinol.* 5(7): 374–381. 2009.
13. *Engert V., Linz R., Grant J.A.* Embodied stress: The physiological resonance of psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology*. 105: 138–146. 2019.
14. *Корнева Е.А., Шанин С.Н., Новикова Н.С., Пугач В.А.* Клеточно-молекулярные основы изменения нейроиммунного взаимодействия при стрессе. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 103(3): 217–229. 2017. [*Korneva E.A., Shanin S.N., Novikova N.S., Pugach V.A.* Cellular-and-molecular bases of a change in the neuroimmune interaction during stress. *Russ. J. Physiol.* 103(3): 217–229. 2017. (In Russ)].
15. *Próciennikowska A., Hromada-Judycka A., Borzęcka K., Kwiatkowska K.* Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol. Life Sci.* 72(3): 557–581. 2015.
16. *Tang Y., Le W.* Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases. *Mol. Neurobiol.* 53(2): 1181–1194. 2016.
17. *Kwiatkowska K., Ciesielska A.* Lipid-mediated regulation of pro-inflammatory responses induced by lipopolysaccharide. *Postepy Biochem.* 64(3): 175–182. 2018.
18. *Tilders F.J., DeRijk S.H., Van Dam A.M., Vincent V.A., Schotanus K., Persoons J.H.* Activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by bacterial endotoxins: routes and intermediate signals. *Psychoneuroendocrinology*. 19(2): 209–232. 1994.
19. *Wan W., Wetmore L., Sorensen C.M., Greenberg A.H., Nance D.M.* Neural and biochemical mediators of endotoxin and stress-induced c-fos expression in the rat brain. *Brain Res. Bull.* 34(1): 7–14. 1994.
20. *Pertsov S.S., Alekseeva I.V., Koplik E.V., Sharanova N.E., Kirbaeva N.V., Gapparov M.M.G.* Dynamics of locomotor activity and heat production in rats after acute stress. *Bull. Exp. Biol. Med.* 157(1): 10–14. 2014.
21. *Перцов С.С., Абрамова А.Ю., Симаков А.Б., Водохлебов И.Н.* Динамика поведенческой активности и показателей метаболизма у крыс при многократном воздействии электромагнитным СВЧ-излучением. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 104(10): 1227–1237. 2018. [*Pertsov S.S., Abramova A.Yu., Simakov A.B., Vodokhlebov I.N.* Dynamics of behavioral activity and metabolic parameters in rats under repeated exposure to electromagnetic microwave radiation. *Russ. J. Physiol.* 104(10): 1227–1237. 2018. (In Russ)].
22. *Pertsov S.S., Gurkovskii B.V., Abramova A.Y., Trifonova N.Y., Simakov A.B., Zhuravlev B.V.* Dynamics of metabolic parameters in rats during repeated exposure to modulated low-intensity UHF radiation. *Bull. Exp. Biol. Med.* 165(4): 419–423. 2018.
23. *Nakamura K.* Neural circuit for psychological stress-induced hyperthermia. *Temperature (Austin)*. 2(3): 352–361. 2015.
24. *Oka T.* Psychogenic fever: how psychological stress affects body temperature in the clinical population. *Temperature (Austin)*. 2(3): 368–378. 2015.
25. *Pertsov S.S., Abramova A.Yu., Chekhlov V.V., Nikenina E.V.* Blood cytokine profile in rats with various behavioral characteristics after a single exposure to long-term stress. *Bull. Exp. Biol. Med.* 165(2): 200–204. 2018.
26. *Abramova A.Yu., Pertsov S.S., Alekseeva I.V., Nikenina E.V., Kozlov A.Yu., Chekhlov V.V., Chukhnina M.E.* Blood cytokine concentration in rats during antigenic treatment after a single long-term stress exposure. *Bull. Exp. Biol. Med.* 168(6): 713–717. 2020.
27. *Yigiter M., Albayrak Y., Polat B., Suleyman B., Salman A.B., Suleyman H.* Influence of adrenal hormones in the occurrence and prevention of stress ulcers. *J. Pediatr. Surg.* 45(11): 2154–2159. 2010.
28. *Иванова И.К., Шантанова Л.Н., Бальхаев И.М., Лоншакова К.С.* Влияние фитоадаптогена “Полифитотон” на структуру надпочечников белых крыс при иммобилизационном стрессе. *Бюлл. Восточно-Сибирск. научн. центра СО РАМН*. 1–2: 142–144. 2011. [*Ivanova I.K., Shantanova L.N., Bal'khaev I.M., Lonshakova K.S.* Effect of a plant adaptogen “Polifitoton” on the structure of the adrenal glands in albino rats during restraint stress. *Bull. East-Siberian Scient. Center of the Siberian Division of the Rus Acad. Med. Sci.* 1–2: 142–144. 2011. (In Russ)].
29. *Прокудина Е.С., Горбунов А.С., Казаков В.А., Саушкин В.В., Ма Н., Маслов Л.Н.* Морфофункциональные аспекты повреждения сердца при иммобилизационном стрессе у крыс. *Рос физиол журн им. И.М. Сеченова*. 105(2): 248–257. 2019. [*Prokudina E.S., Gorbunov A.S., Kazakov V.A., Saushkin V.V., Ma N., Maslov L.N.* Morphofunctional aspects of heart injury during restraint stress in rats. *Russ. J. Physiol.* 105(2): 248–257. 2019. (In Russ)].

30. Naryzhnaya N.V., Maslov L.N., Vychuzhanova E.A., Sementsov A.S., Podoksyonov Yu.K., Portnichenko A.G., Lishmanov Yu.B. Effect of hypoxic preconditioning on stress reaction in rats. *Bull. Exp. Biol. Med.* 159(8): 450–452. 2015.
31. Тюренков И.Н., Самотруева М.А., Цибизова А.А., Ясенявская А.Л. Фенотропил как модулятор уровня цитокинов в условиях экспериментальной иммунопатологии. *Эксперим. клин. фармакол.* 78(12): 15–17. 2015. [Tyurenkov I.N., Samotrueva M.A., Tsibizova A.A., Yasyavskaya A.L. Phenotropil as a modulator of cytokine level during experimental immunopathology. *Exp. Clin. Pharmacol.* 78(12): 15–17. 2015. (In Russ)].
32. Выборова И.С., Удвал Х., Васильева Л.С., Макарова Н.Г. Структура печени в динамике иммобилизационного стресса. *Сибирск. мед. журн.* 52(3): 30–33. 2005. [Vyborova I.S., Udval Kh., Vasil'eva L.S., Makarova N.G. Liver structure in the dynamics of restraint stress. *Siberian Med. J.* 52(3): 30–33. 2005. (In Russ)].
33. Сериков В.С., Ляшев Ю.Д. Влияние мелатонина на перекисное окисление липидов и активность антиоксидантных ферментов в крови и печени крыс при многократных стрессорных воздействиях. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 99(11): 1294–1299. 2013. [Serikov V.S., Lyashev Yu.D. Effect of melatonin on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in the blood and liver of rats during repeated stress exposures. *Russ. J. Physiol.* 99(11): 1294–1299. 2013. (In Russ)].
34. Перцов С.С., Беляева Е.В., Абрамова А.Ю. Динамика ноцицептивной чувствительности крыс после введения мелатонина в норме и при длительном стрессорном воздействии. *Патол. физиол. эксперим. терапия.* 61(3): 10–16. 2017. [Pertsov S.S., Belyaeva E.V., Abramova A.Yu. Dynamics of rat's nociceptive sensitivity after administration of melatonin under normal conditions and long-term stress. *Pathol. Physiol. Exp. Ther.* 61(3): 10–16. 2017. (In Russ)].
35. Pertsov S.S., Kalinichenko L.S., Koplik E.V., Alekseeva I.V., Kirbaeva N.V., Sharanova N.E., Vasil'ev A.V. Dynamics of cytokine concentration in the blood of rats with various behavioral characteristics after acute emotional stress. *Russ. J. Physiol.* 101(9): 1032–1041. 2015.
36. Frodl T., O'Keane V. How does the brain deal with cumulative stress? A review with focus on developmental stress, HPA axis function and hippocampal structure in humans. *Neurobiol. Dis.* 52: 24–37. 2013.
37. Herman J.P., McKlveen J.M., Solomon M.B., Carvalho-Netto E., Myers B. Neural regulation of the stress response: glucocorticoid feedback mechanisms. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 45(4): 292–298. 2012.
38. Lederbogen F., Ströhle A. Stress, mental disorders and coronary heart disease. *Nervenarzt.* 83(11): 1448–1457. 2012.
39. Судаков К.В. Избранные труды. Т. 3. Эмоции и эмоциональный стресс. М. НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАМН. 2012. [Sudakov K.V. Izbrannye Trudy. Tom 3. Emotsii i emotsional'nyi stress [Selected works. Vol. 3. Emotions and emotional stress]. Moscow. P.K. Anokhin Research Institute of Normal Physiology of the RAMS. 2012. (In Russ)].
40. Alekseeva I.V., Abramova A.Yu., Kozlov A.Yu., Koplik E.V., Pertsov A.S., Lyadov D.A., Nikenina E.V., Pertsov S.S. State of stress-marker organs in rats after a single exposure to long-term stress and treatment with lipopolysaccharide. *Bull. Exp. Biol. Med.* 167(5): 624–627. 2019.

Metabolic Parameters in Rats at Various Stages of the Post-Stress Period under Conditions of Antigenic Exposure by Administration of Lipopolysaccharide

S. S. Pertsov^{a, b}, I. V. Alekseeva^{a, *}, A. Yu. Abramova^{a, b}, E. V. Nikenina^{a, c},
A. Yu. Kozlov^{a, b}, E. V. Koplik^a, and A. S. Martyusheva^a

^aAnokhin Research Institute of Normal Physiology, Moscow, Russia

^bEvdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia

^cSechenov First Moscow State Medical University Federation (“Sechenov University”), Moscow, Russia

*e-mail: kiv24irina@mail.ru

The dynamics of parameters for the intensity of metabolic processes in rats was studied after intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS, 100 µg/kg) by the end of a single exposure to long-term stress on the model of 24-h immobilization. The volumes of consumed oxygen and expired carbon dioxide, as well as the level of heat emission, were evaluated on a Phenomaster automated module device (TSE Systems GmbH, Germany) 3 h and 1 or 8 days after the treatment. Study parameters of metabolism in animals of the physiological saline group were shown to increase significantly 1 day after restraint stress. The observed variations illustrate intensification of metabolic processes in

rats during the early period after experimental stress. These changes persisted even in the delayed stage after stress load (day 8 of observations). The specimens receiving LPS were characterized by a rise in oxygen consumption, carbon dioxide expiration, and level of heat exchange on day 1 of the post-stress period. On day 8 after stress load with the subsequent immune modulation, metabolic parameters in rats were revealed to decrease and did not differ from those in intact animals. Therefore, the antigenic treatment by systemic administration of LPS has no effect on a stress-induced activation of metabolic processes at the early stage of observations, but prevents a persistent increase in the intensity of metabolism during the delayed post-stress period. Our results and published data suggest that the influence of LPS, which possesses immunoactive properties, is related to the modulatory effect on neuroendocrine mechanisms for regulation of homeostasis in mammals, *e.g.*, under stress conditions.

Keywords: metabolic parameters, rats, 24-h restraint stress, lipopolysaccharide

ЦИТИРОВАТЬ:

Перцов С.С., Алексеева И.В., Абрамова А.Ю., Никенина Е.В., Козлов А.Ю., Коплик Е.В., Мартюшева А.С. Динамика метаболических показателей у крыс на разных стадиях постстрессорного периода в условиях антигенного воздействия при введении липополисахарида. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 107(3): 321–331. 2021.

DOI: 10.31857/S0869813921030080

TO CITE THIS ARTICLE:

Pertsov S.S., Alekseeva I.V., Abramova A.Yu., Nikenina E.V., Kozlov A.Yu., Koplik E.V., Martysheva A.S. Metabolic parameters in rats at various stages of the post-stress period under conditions of antigenic exposure by administration of lipopolysaccharide. *Russian Journal of Physiology*. 107(3): 321–331. 2021.

DOI: 10.31857/S0869813921030080

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ПИФИТРИН-АЛЬФА ТОРМОЗИТ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ
ВНОВЬ ОБРАЗОВАННЫХ КЛЕТОК СУБГРАНУЛЯРНОЙ ЗОНЫ ЗУБЧАТОЙ
ИЗВИЛИНЫ У КРЫС ЛИНИИ КРУШИНСКОГО–МОЛОДКИНОЙ
ПРИ АУДИОГЕННОМ КИНДЛИНГЕ**

© 2021 г. А. А. Куликов¹, *, Е. В. Наслузова¹, Н. А. Дорофеева¹, М. В. Глазова¹,
Е. А. Лаврова¹, Е. В. Черниговская¹

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

*E-mail: alexey.kulikov@iephb.ru

Поступила в редакцию 17.12.2020 г.

После доработки 13.01.2021 г.

Принята к публикации 16.01.2021 г.

Одной из задач современной нейробиологии является поиск подходов для предотвращения структурных нарушений мозга, возникающих в результате эпиплептиформной активности, в частности, гиппокампа. Известно, что эпилепсия приводит к увеличению пролиферативной активности в нейрогенной нише гиппокампа — в субгранулярном слое зубчатой извилины. В последние годы преобладает представление, что образование новых клеток в большей степени способствуют эпиплептогенезу, а не препятствуют развитию нейродегенеративных нарушений, связанных с усилением клеточной гибели. Мы предположили, что проапоптотический белок p53 является одной из возможных терапевтических мишеней при лечении эпилепсии и ее нейродегенеративных последствий. В работе использованы крысы инбредной линии Крушинского–Молодкиной (КМ) с наследственной аудиогенной рефлексорной эпилепсией. При многократных аудиогенных стимуляциях по протоколу киндлинга, являющемуся общепризнанной моделью эпиплептогенеза, эпиплептиформная активность захватывает лимбическую систему мозга и кору. У крыс линии КМ показано, что при четырехкратных аудиогенных судорожных припадках наблюдается усиление пролиферативной активности, абerrантная миграция вновь образованных клеток в хилус и ускорение их дифференцировки в нейроны. Мы не выявили нарушений в уровне апоптоза и аутофагии на начальной стадии формирования височной эпилепсии. Использование химического ингибитора белка p53 пифитрин-α не привело к изменениям в уровне апоптоза и аутофагии, но вызвало усиление пролиферации и миграции вновь образованных клеток в гранулярный слой зубчатой извилины и в хилус. Однако при инактивации p53 через неделю после судорог число дифференцированных клеток в хилусе снижалось по сравнению с таковым у крыс, которым вводили растворитель блокатора, несмотря на увеличение количества вновь образованных клеток. Эти данные свидетельствуют о снижении скорости дифференцировки вновь образованных клеток по нейрональному типу при инактивации белка p53. Уменьшение числа дифференцированных нейронов в хилусе позволяет рассматривать пифитрин-α как потенциальный терапевтический агент для ослабления нейродегенеративных нарушений при эпилепсии.

Ключевые слова: нейрогенез, апоптоз, аутофагия, p53, пифитрин-α, эпилепсия, линия крыс Крушинского–Молодкиной

DOI: 10.31857/S0869813921030079

Нейрогенез у взрослых животных является хорошо сбалансированным процессом, и его любые нарушения могут приводить к серьезным патологиям. Эпилепсия, в отличие от большинства неврологических заболеваний, приводит к увеличению пролиферативной активности в нейрогенной нише гиппокампа — в субгранулярном слое зубчатой извилины [1–6]. Известно, что на ранних стадиях формирования эпилептического статуса наблюдается усиление нейрогенеза в гиппокампе, однако при его длительном течении интенсивность пролиферации может снижаться [5, 7–9]. В последние годы преобладает представление, что образование новых клеток при эпилептическом статусе в большей степени способствует эпилептогенезу, а не препятствуют развитию нейродегенеративных нарушений, связанных с усилением клеточной гибели [10–12]. Это связано с миграцией новообразованных клеток не в гранулярный слой зубчатой извилины, как это происходит в норме, а в хилус, где они образуют эпилептические нейрональные связи. Однако процент новообразованных эктопических нейронов в хилусе относительно невелик. Также незначителен вклад этих нейронов в формирование aberrантных мшистых волокон [13]. Необходимо учитывать, что число нервных связей, образовавшихся за счет возникновения новых гранулярных клеток, зависит также от вызванной судорогами апоптотической гибели как зрелых, так и новообразованных нейронов гиппокампа, значительная часть которых в норме погибает путем апоптоза [14]. Нейрональная гибель, вызванная судорожной активностью, может приводить к когнитивным нарушениям [15], а также вызывать дальнейшее развитие эпилепсии [16, 17].

При эпилептическом статусе также наблюдается активация аутофагии и подавление митохондриального пути запуска апоптоза, что снижает степень дегенеративных процессов в мозге [18]. Активация аутофагии при незначительных повреждающих воздействиях способствует выживаемости клеток. При тяжелых повреждениях активация аутофагии приводит к клеточной гибели [19]. Снижение уровня аутофагии приводит к возникновению спонтанных судорог, что, возможно, связано с нарушением формирования нейрональных связей [20]. Введение ингибитора mTOR и активация аутофагии вызывает снижение спрутинга, нейродегенерации и нейрогенеза [21]. В целом вопрос о значении нейрогенеза, апоптоза и аутофагии в развитии эпилептических состояний остается открытым, так же как и механизмы регуляции этих процессов.

Одной из задач современной нейробиологии является поиск подходов для предотвращения нейродегенеративных последствий судорожной активности. Наиболее традиционный подход — это торможение судорожной активности с использованием антиконвульсантов. Другой подход — попытка воздействовать на сигнальные каскады, регулирующие клеточную гибель [22]. Белок p53 является одной из возможных терапевтических мишеней при лечении эпилепсии и ее нейродегенеративных последствий, так как является одним из ключевых сигнальных белков, активирующих апоптоз при эпилепсии. Судорожная активность, вызванная введением конвульсантов, приводит к значительному увеличению экспрессии p53 в гиппокампе, особенно в поле СА3 [23]. Известно, что фармакологическая или генетическая инактивация белка p53 уменьшает клеточную гибель в гиппокампе при судорогах, вызванных введением каината. При этом продолжительность спонтанных судорог увеличивается [24]. Эти данные указывают не только на важную роль p53 в развитии нейродегенеративных нарушений гиппокампа при эпилепсии, но также и на возможность участия этого белка в формировании эпилептических состояний.

Известно, что белок p53 участвует как в регуляции апоптоза, так и аутофагии [25]. Роль p53 в регуляции аутофагии зависит от его субклеточной локализации. В ядре p53 стимулирует аутофагию, а в цитоплазме ингибирует [26]. Несмотря на способ-

ность p53 как усиливать, так и подавлять аутофагию, показано, что нокаут p53 приводит к увеличению количества аутофагосом и к последующей клеточной смерти [27], что свидетельствует о его преимущественно ингибирующем действии на аутофагию. Кроме того, p53 участвует в регуляции пролиферации и дифференцировки нейрональных стволовых клеток [28, 29]. Снижение количества p53 ведет к увеличению пролиферативной активности нейронов [30, 31], что может вызывать истощение пула предшественников нейронов. Кроме того, p53 является транскрипционным фактором для ряда генов, отвечающих за нейрогенез [32].

Пифитрин- α является синтетическим ингибитором p53. Предполагают, что пифитрин- α непосредственно связывается с белком p53 [33] и блокирует транслокацию в ядро, но при этом не влияет на синтез белка и его активацию протеинкиназами. При этом уменьшается способность p53 связываться со специфическими сайтами ДНК [34, 35]. Луо и соавт. показали, что блокада p53 пифитрином- α при ишемии коры не только приводит к увеличению числа нейрональных предшественников в субвентрикулярной зоне, но и способствует их выживаемости, миграции в поврежденные участки коры, дифференцировке по нейрональному типу и встраиванию в нейрональные сети [36].

Целью настоящей работы было исследование нейрогенеза, апоптоза и аутофагии, а также выявление нарушений в механизмах регуляции этих процессов у крыс линии Крушинского—Молодкиной (КМ), подвергнутых кратковременному аудиогенному киндлингу, являющемуся общепризнанной моделью эпилептогенеза [37–39]. Для выяснения роли проапоптотического белка p53 в развитии структурных изменений гиппокампа на модели начальной стадии эпилептогенеза использовали пифитрин- α , химический ингибитор проапоптотического белка p53. Также целью исследования было оценить возможность использования подобных препаратов для снижения степени нейродегенеративных последствий судорожной активности у больных эпилепсией.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментах были использованы крысы инбредной линии КМ с наследственной аудиогенной эпилепсией, эти животные являются моделью рефлекторной аудиогенной эпилепсии человека [40]. Первые аудиогенные стимулы вызывают у этих крыс рефлекторные судороги, сходные по механизму их инициации с характерными для рефлекторной эпилепсии у человека. Аудиогенная судорожная активность при этом возникает в стволовых отделах мозга [41]. Однако при многократных стимуляциях по протоколу киндлинга (экспериментальная модель эпилептогенеза, основанная на усилении судорожного ответа после повторяющейся эпилептогенной стимуляции) эпилептиформная активность захватывает лимбическую систему мозга и кору, о чем свидетельствует изменение характера судорожного припадка и регистрация электрофизиологических показателей коры, гиппокампа и амигдалы [41]. Аудиогенный киндлинг является моделью височной эпилепсии [37, 42]. Были отобраны крысы КМ, отвечающие на звуковой стимул полным и стабильным клонико-тоническим судорожным припадком. Крыс содержали по пять животных в индивидуальных клетках вивария при 12-часовом световом дне и свободном доступе к пище и воде. Все процедуры с использованием животных проводились согласно этическим принципам, изложенным в Европейской конвенции по защите позвоночных животных (№ 123 01/01/1991), используемых для экспериментальных и других научных целей, и были одобрены этической комиссией Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН.

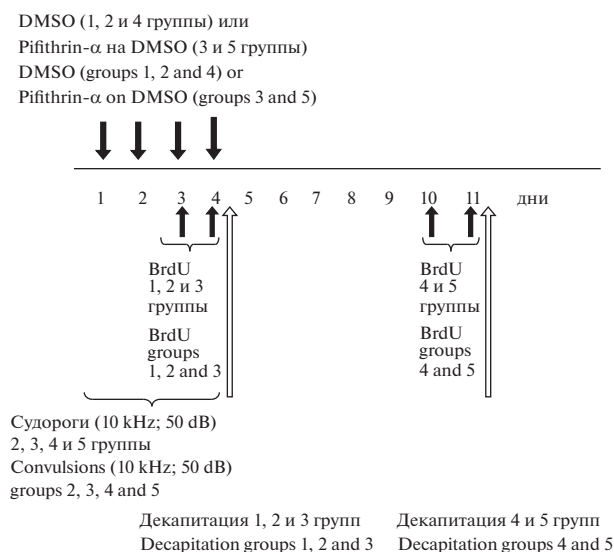


Рис. 1. Схема экспериментов.

Fig. 1. Experiment design.

В опытах были использованы 5 групп крыс, схема экспериментов представлена на рис. 1.

Контролем служили крысы линии КМ, которые не подвергались звуковой стимуляции и получали в течение 4-х дней инъекции DMSO, эти животные были декапитированы через 5 ч после последней инъекции (1-я группа). Также дополнительным контролем служили крысы, которые подвергались звуковой стимуляции (10 kHz, 50 dB) в течение 4-х дней и получали инъекции DMSO за 1 ч до каждого предъявления звуковой стимуляции. Крысы этих экспериментальных групп также были декапитированы через 5 ч (2-я группа) или через 7 дней (4-я группа) после последней инъекции.

Для выяснения роли белка p53 крысы подвергались звуковой стимуляции (10 kHz, 50 dB) в течение 4-х дней и получали инъекции пифитрин-α (pifithrin-α hydrobromide (R&D Systems #1267)), растворенного в DMSO (2 мг/кг массы тела) за 1 ч до каждого предъявления звуковой стимуляции. Крысы этих экспериментальных групп были декапитированы через 5 ч (3-я группа) или через 7 дней (5-я группа) после последней инъекции. Все животные дважды получали инъекции BrdU i.p. (BrdU, Sigma) (100 мг/кг) в последние 2 дня перед декапитацией.

Мозг разделяли на две половины в сагитальной плоскости. Далее из одной половины иссекали дорсальный гиппокамп для приготовления проб для Вестерн-блот анализа. Вторую половину мозга фиксировали в 4%-ном параформальдегиде на фосфатном буфере для последующего иммуногистохимического анализа.

Иммуногистохимический метод

Чередующиеся серии срезов толщиной 10 мкм изготавливали на криостате. Во всех экспериментальных группах был проведен сравнительный морфометрический анализ зубчатой извилины и хилуса гиппокама крыс исследуемых экспериментальных групп с помощью подсчета числа ядер клеток, меченных DAPI, на еди-

ницу площади, что позволило охарактеризовать нарушения клеточного состава этих отделов гиппокампа. Уровень пролиферации и локализация новообразованных клеток были оценены при подсчете иммунопозитивных клеток, выявленных флуоресцентным иммуногистохимическим методом с помощью антител к BrdU (1 : 100, #11170376001, Roche Molecular Biochemicals), или маркера пролиферации белка Ki67 (1 : 300, #AB9260, Millipore). Направленность дифференцировки новообразованных клеток была определена методом двойного иммунофлуоресцентного выявления клеток, прошедших клеточный цикл (выявление BrdU), и коэкспрессии в этих клетках белка-маркера нейронов NeuN (1 : 500, #12943, Cell Signaling Technology) и GFAP (1 : 500, #1117514A, Invitrogen), которые выявляли с помощью вторичных антител, конъюгированных с Alexa Fluor 488 (1 : 1000, #913909, Invitrogen) и Alexa Fluor 568 (1 : 1000, #762708, Invitrogen). Ядра клеток выявляли DAPI (1 : 2000, #D9542, Sigma-Aldrich).

Уровень апоптоза нейронов и их локализация в гиппокампе были определены методом TUNEL с помощью ApopTag® Plus In Situ Apoptosis Fluorescein Detection Kit (Merck Millipore, #S7110) согласно инструкции производителя. В качестве метки в этом наборе использовался диоксигенин. Ядра клеток выявляли DAPI в концентрации 1 : 2000. Иммуногистохимические реакции проводились одновременно на всех срезах экспериментальных крыс в стандартных условиях. Для оценки специфичности иммунного окрашивания в каждом случае делали отрицательный контроль (выполнение иммуногистохимической реакции без первичных антител), результатом чего было отсутствие иммунного окрашивания. Анализ производили с помощью светового микроскопа Zeiss Axio Imager A1 и на флуоресцентном микроскопе Leica DMI 6000B.

Вестерн-блот

Для приготовления проб из мозга иссекали гиппокамп. Образцы гомогенизировали в лизирующем буфере, содержащем ингибиторы протеаз и фосфатаз. Лизаты центрифугировали 15 мин при 12000 g при комнатной температуре, затем отбирали супернатант, после чего к двум частям отобранного супернатанта добавляли 1 часть 3× SDS буфера (0.2 М Tris-HCl, pH 6.7; 6% SDS; 15% глицерина; 0.003% Bromphenolblue и 10% В-меркаптоэтанола) и инкубировали 10 мин при температуре 96°C. Белки в пробах разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле по Лэммли (SDS-PAGE). Далее белковые фракции переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Amersham Biosciences, Freiburg, Германия). Мембраны инкубировали в 5%-ном обезжиренном молоке или в 3%-ном растворе BSA в течение 40 мин. После этого мембраны инкубировали в растворе первых антител к исследуемым белкам β -Tubulin (1:1000; #2148, Cell Signaling), actin (1 : 1000, #ab3280, Abcam), p53 (1 : 1000; #2524, Cell Signaling), p(Ser15)-p53 (1 : 1000; #12571, Cell Signaling), cCasp3 (1 : 1000; #9661, Cell Signaling); CytC (1 : 1000, Abcam, #ab133504); LC3B (1 : 1000; #NB100-2220, Novus Biologicals); Beclin-1 (1 : 1000; #PD017, MBL), p62 (1 : 1000; #PM045, MBL); Bcl-2 (1 : 500; #610538, Transduction laboratory), p(Ser70)-Bcl2 (1 : 1000; #05-843R, Millipore) в течение ночи при 4°C. Мембраны промывали TBS-T и помещали в раствор вторых антител на 1 ч: antiRabbit (1 : 10000, #A5420, Sigma-Aldrich) или antiMouse (1 : 50000, #A9044, Sigma-Aldrich). Для визуализации результатов использовали SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate (#34075, ThermoFisher Scientific). Количество белка оценивалось с помощью BioRad ChemiDoc Touch и на фотопленках в программе ImageJ денситометрическим методом. Уровень специфического сигнала был нормирован по оптической плотности тубулина, что необходимо для осуществления загрузочного контроля. Денситометриче-

ский анализ проводили с помощью программы ImageJ. Данные были выражены в условных единицах оптической плотности.

Статистический анализ результатов

В исследовании использовалась малая выборка животных, из-за чего все полученные данные обрабатывались статистически с помощью непараметрического теста Краскела–Уолиса и post-hoc критерия Данна с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, США). При оценке достоверности отличий между группами число животных в каждой группе было одинаковым. В каждой экспериментальной группе крыс было исследовано по 5 животных. Данные представлены в виде среднего значения по каждой группе животных $\pm$ стандартная ошибка для среднего значения. Достоверными считались отличия при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С помощью выявления маркера пролиферирующих клеток BrdU показано, что киндлинг приводит к увеличению числа меченых клеток в гранулярном слое зубчатой извилины через 4 ч и через 7 дней после окончания последнего судорожного припадка, а в хилусе только через 7 дней (рис. 2*A, B*). Увеличения числа меченных BrdU клеток не наблюдалось в субвентрикулярной зоне (рис. 2*E*). Число вновь образованных клеток, дифференцированных по нейрональному типу в гранулярном слое увеличивается только через 7 дней после завершения судорожной активности, о чем свидетельствует колокализация в них BrdU и NeuN (рис. 3*A*). Показано, что киндлинг приводит также к усилению миграции вновь образованных нейронов из субгранулярной зоны зубчатой извилины в хилус, причем не только через 7 дней, но и непосредственно сразу после завершения последнего судорожного припадка (рис. 3*B, E*). То есть процесс усиления пролиферации, дифференцировки и эктопической миграции вновь образованных нейронов, очевидно, запускается в результате первых судорожных припадков и продолжается как минимум неделю после их окончания.

Методом двойного иммуногистохимического мечения на BrdU и GFAP было показано, что под действием киндлинга только незначительный процент вновь образованных клеток в гранулярном слое зубчатой извилины гиппокампа и в хилусе крыс линии КМ коэкспрессирует GFAP (рис. 3*C, D*). Следовательно, краткосрочный киндлинг не влияет на образование глиальных клеток в гиппокампе крыс линии КМ.

Несмотря на усиление пролиферации в результате киндлинга число клеток, выявленных с помощью подсчета количества ядер, меченных DAPI, на единицу площади гранулярного слоя зубчатой извилины и хилуса не изменялось по сравнению с контролем (рис. 4*A, B*). С помощью метода TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick- End Labeling) был проведен анализ уровня апоптотической гибели клеток, который также не показал различий между контрольными крысами и животными, подвергавшимися звуковой стимуляции (рис. 4*C, D*). Также с помощью Вестерн-блот анализа не было выявлено значимых различий в уровне экспрессии и активности сигнальных белков апоптоза (рис. 5). Через 4 ч после завершения последнего судорожного припадка было выявлено увеличение содержания белка-маркера аутофагии LC3B1 и LC3BII, что позволяет предположить некоторую активацию этого процесса, очевидно, направленную на защиту клеток гиппокампа в условиях гиперактивации (рис. 6*A, B, D*). Через 7 дней после завер-

шения судорожных припадков различий в уровне экспрессии белков-регуляторов аутофагии уже не было обнаружено.

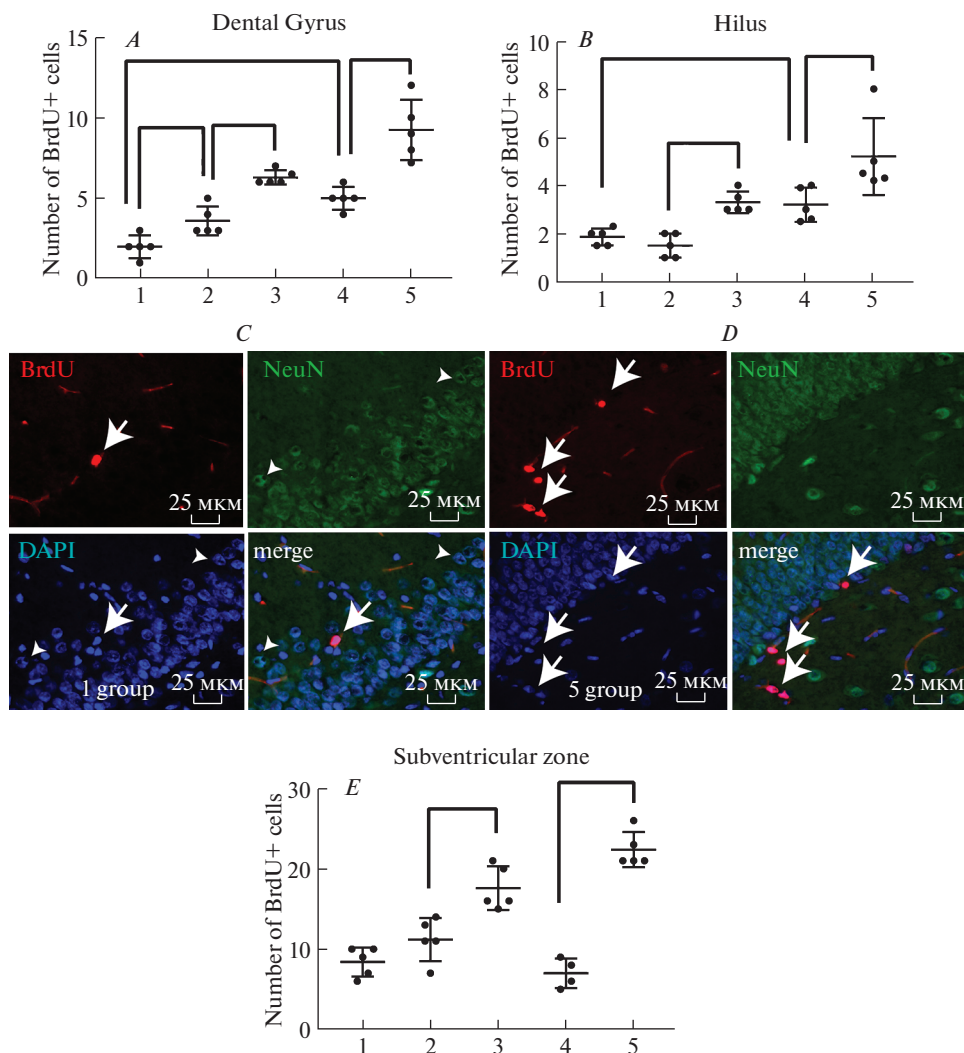
Введение химического ингибитора проапоптозного белка р53 пифитрин- α привело к значительному увеличению числа пролиферирующих клеток в гранулярном слое зубчатой извилины и в хилусе как через 4 ч, так и через 7 дней после окончания последнего судорожного припадка (рис. 3*A–D*). Также было показано увеличение количества вновь образованных клеток в субвентрикулярной зоне (рис. 3*E*). Однако число клеток дифференцированных по нейрональному типу при введении пифитрин- α не отличалось от характерного для контрольных животных во всех изученных отделах гиппокампа и в субвентрикулярной зоне — в отличие от показанного увеличения у животных под воздействием киндлинга (рис. 3*C, E*). Более того, число дифференцированных клеток в хилусе через неделю после судорог снижалось под действием пифитрин- α по сравнению с таковым у крыс, которым вводили растворитель блокатора. Также не было выявлено влияния пифитрин- α на дифференцировку вновь образованных клеток по глиальному типу (рис. 3*C, D, F*).

Общее число клеток в гранулярном слое зубчатой извилины и в хилусе крыс, которым на фоне многократных судорожных припадков вводили пифитрин- α , также не отличалось от контрольного уровня через как 4 ч, так и через 7 дней после окончания последнего судорожного припадка (рис. 4*A, B*). Уровень апоптотической гибели клеток под действием пифитрин- α не изменялся (рис. 4*C, D*). Однако через 4 ч после судорог было показано снижение экспрессии проапоптозного белка р53 (рис. 5*A, E*). При этом показано отсутствие нарушений в содержании активной расщепленной каспазы 9 и эффекторной каспазы 3, что свидетельствует об отсутствии активации митохондриального пути запуска апоптоза (рис. 5*C–E*). Через 7 дней после судорог нарушений в экспрессии и активности про- и антиапоптотических белков уже не наблюдалось (рис. 5*A–D*).

Под действием ингибитора р53 нарушался баланс белков-регуляторов аутофагии. Через 4 ч после последних судорог наблюдалось значительное снижение содержания белка р62 при неизменяющейся экспрессии и активности других белков — беклин, LC3B1 и LC3BII (рис. 6*A, B, D*). Через 7 сут после судорог также наблюда-

Рис. 2. Иммунофлуоресцентный анализ пролиферирующих клеток в гранулярном слое зубчатой извилины (*A*), в хилусе (*B*) и в субвентрикулярной области (*E*) intactных крыс линии КМ (группа 1), крыс линии КМ, подвергнутых четырем аудиогенным судорожным припадкам и выведенным из эксперимента через 4 ч (группа 2) и через 7 дней (группа 4) после последних судорог и крыс, получавших инъекции пифитрин- α за 1 ч до предъявления звукового стимула и выведенных из эксперимента через 4 ч (группа 3) и через 7 дней (группа 5) после последних судорог. По оси ординат — число BrdU позитивных клеток. По оси абсцисс — номера экспериментальных групп. Данные представлены в виде средней $\pm$ SEM. Скобкой обозначены достоверные различия $p < 0.05$. На микрофотографиях BrdU иммунопозитивные клетки (красный), NeuN (зеленый) и DAPI (синий) и наложение у контрольных крыс (1-я группа) (*C*) и крыс, получавших инъекции пифитрин- α за 1 ч до предъявления звукового стимула и выведенных из эксперимента через 7 дней (группа 5) (*D*). Стрелки указывают на BrdU позитивные клетки. Наконечниками стрелок указаны NeuN позитивные ядра.

Fig. 2. Immunofluorescence analysis of proliferating cells in the granular layer of the dentate gyrus (*A*), in the hilus (*B*) and in the subventricular region (*E*). The 1st group — intact KM strain rats, the 2nd and the 4th groups — KM rats with 4 audiogenic seizures were sacrificed 4 h or 7 days following the last seizure, the 3rd groups and the 5th — KM rats with 4 audiogenic seizures that were administered pifitrin- α injection 1 h prior to acoustic stimulus and were sacrificed 4 h or 7 days following the last seizure. The y-axis of this graph represents a number of BrdU positive cells. The x-axis of this graph — number of experimental groups. Data are presented as mean $\pm$ SEM. Hooks mark a significant difference $p < 0.05$. Representative micrographs show BrdU (red), NeuN (green) positive cells and merge image in the group 1 (*C*) and 5 (*D*). Cells nuclei are stained by DAPI (blue). Arrows point BrdU positive cells. Arrows heads point NeuN positive cells.



лось снижение содержания белка p62, но при этом также уменьшалось количество LC3BII. Полученные данные не позволяют сделать заключение об усилении или снижении уровня аутофагии, но свидетельствуют о влиянии пифитрин- α на экспрессию белков, отвечающих за регуляцию аутофагии.

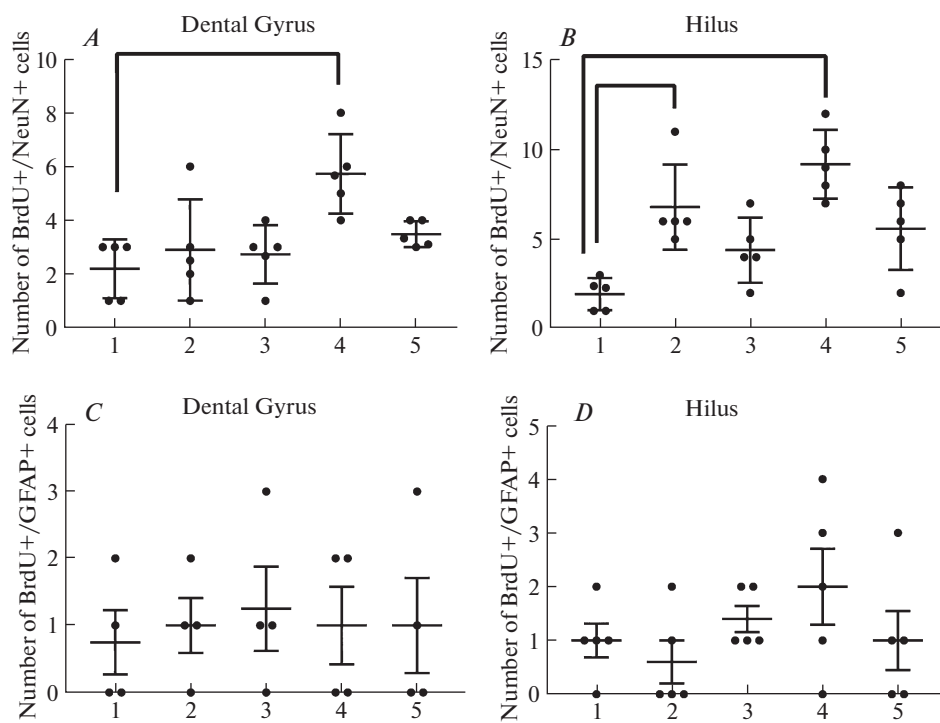
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Интенсивность пролиферации в субгранулярной зоне гиппокама зависит от силы и длительности судорог [9]. Мы показали, что уже четыре судорожных припадков вызывают значительное усиление пролиферативной активности в гиппокампе, при этом в субвентрикулярной зоне усиления нейрогенеза не происходит. Это указывает на то, что гиппокамп более чувствителен к судорожной активности. Повышение пролиферативной активности наблюдается уже непосредственно после за-

вершения последнего четвертого судорожного припадка. Однако после латентного периода в течение 7 дней число пролиферирующих клеток в гранулярном слое еще возрастает. Это указывает на пролонгированное действие даже достаточно краткосрочной судорожной активности на нейрогенез в гиппокампе, что было показано и на других моделях эпилепсии [43–45]. В нормальных условиях вновь образованные нейроны встраиваются в уже существующую нейрональную сеть гранулярного слоя зубчатой извилины [46]. Однако известно, что судорожные припадки приводят к возникновению aberrантного нейрогенеза, происходящего в результате миграции вновь образованных гранулярных клеток в хилус зубчатой извилины, а не в гранулярный клеточный слой [11, 47–49]. Эти эктопические клетки встраиваются в нейрональную сеть зубчатой извилины и получают возбуждающую иннервацию от других гранулярных клеток. Показано, что коллатерали их аксонов образуют проекции в область СА3, где образуют синаптические контакты с мшистыми волокнами гранулярных клеток и ГАМК-ергическими интернейронами, иннервирующими пирамидные клетки СА3 [49, 50]. Таким образом, формируются циклические связи, приводящие к гипервозбуждению гиппокампа и усилению эпилептиформной активности. Кроме того, показано, что эктопические гранулярные клетки хилуса характеризуются постоянно повышенной активностью по сравнению с гранулярными клетками зубчатой извилины [51–53], что также приводит к усилению эпилептиформной активности. Мы показали, что уже на ранней стадии эпилептогенеза у крыс линии КМ происходит усиление миграции вновь образованных клеток не только в гранулярный слой зубчатой извилины, но и в большей степени в хилус, где они дифференцируются в нейроны. Причем, повышенное число вновь образованных нейронов в хилусе наблюдается как непосредственно после завершения последнего четвертого судорожного припадка, так и после латентного периода в течение 7 дней. Надо отметить, что в хилусе число дифференцированных нейронов относительно всех вновь образованных клеток выше, чем в гранулярном слое (77 и 76% в хилусе и 50% в гранулярном слое), то есть судорожная активность приводит к усилению процесса дифференцировки клеток по нейрональному пути в хилусе. При этом краткосрочный киндлинг не повлиял на образование глиальных клеток в гиппокампе крыс линии КМ. Таким образом, на на-

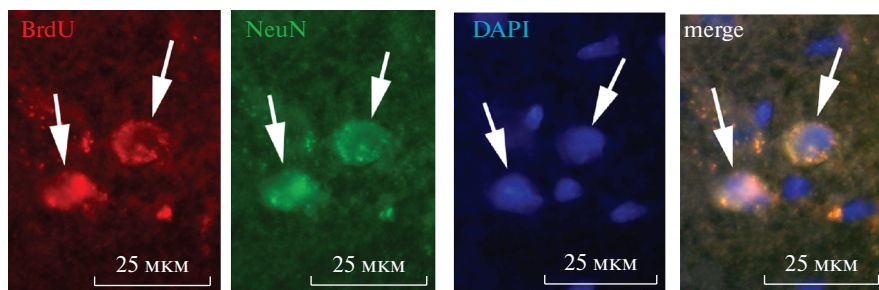
Рис. 3. Иммунофлуоресцентный анализ дифференцированных по нейрональному (A, B) и глиальному (C, D) пути клеток в гранулярном слое зубчатой извилины (A) и в хилусе (B) intactных крыс линии КМ (группа 1), крыс линии КМ, подвергнутых четырем аудиогенным судорожным припадкам и выведенным из эксперимента через 4 ч (группа 2) и через 7 дней (группа 4) после последних судорог и крыс, получавших инъекции пифитрин- α за 1 ч до предъявления звукового стимула и выведенных из эксперимента через 4 ч (группа 3) и через 7 дней (группа 5) после последних судорог. По оси ординат — число BrdU позитивных клеток. По оси абсцисс — номера экспериментальных групп. Данные представлены в виде средней $\pm$ SEM. Скобкой обозначены достоверные различия $p < 0.05$. На микрофотографиях BrdU иммунопозитивные клетки (красный), NeuN (зеленый) (E) или GFAP (зеленый) и DAPI (синий) (F) и наложение у крыс, получавших инъекции DMSO за 1 ч до предъявления звукового стимула и выведенных из эксперимента через 7 дней (группа 4). Стрелки указывают на BrdU позитивные клетки.

Fig. 3. Immunofluorescence analysis of neuronal (A, B) or glial (C, D) differentiation in the granular layer of the dentate gyrus (A) and in the hilus (B). The 1st group — intact KM strain rats, the 2nd and the 4th groups — KM rats with 4 audiogenic seizures were sacrificed 4 h or 7 days following the last seizure, the 3rd groups and the 5th — KM rats with 4 audiogenic seizures that were administered piflutrin- α injection 1 h prior to acoustic stimulus and were sacrificed 4 h or 7 days following the last seizure. The y-axis of this graph represents a number of double labeled BrdU/GFAP or BrdU/NeuN cells. The x-axis of this graph — number of experimental groups. Data are presented as mean $\pm$ SEM. Hooks mark a significant difference $p < 0.05$. Representative micrographs show BrdU (red), NeuN (green) (E) or GFAP (green) (F) positive cells and merge images in the group 4. Cell nuclei are stained by DAPI (blue). Arrows point BrdU positive cells.



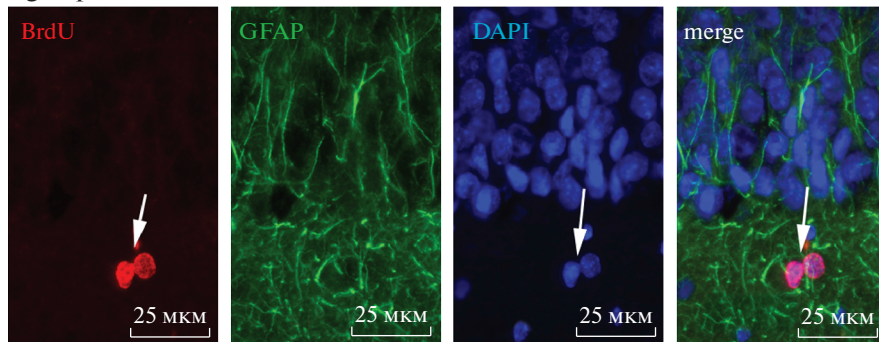
4 group

E



4 group

F



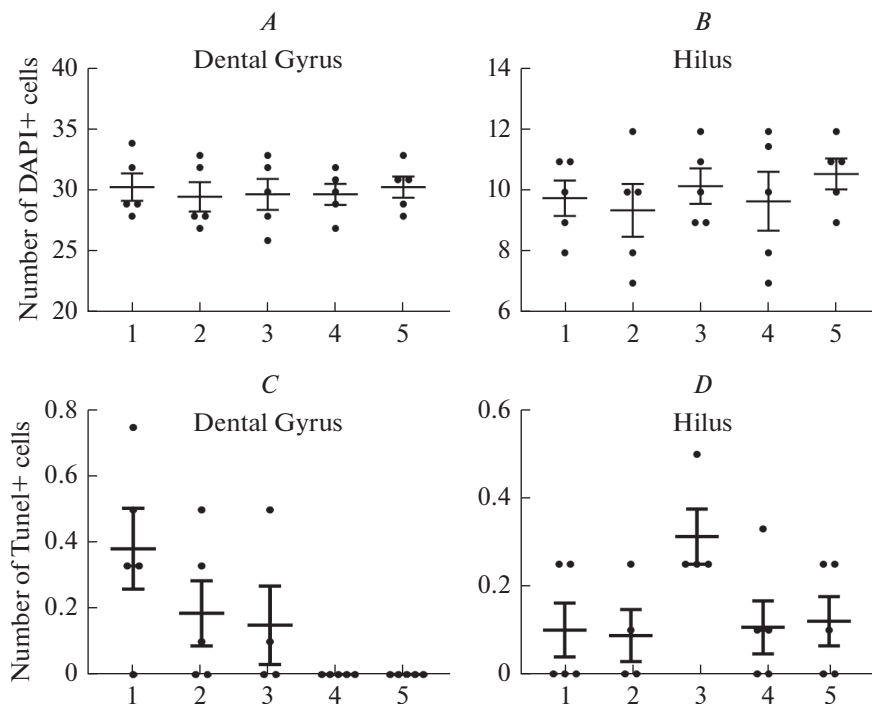


Рис. 4. Анализ числа ядер клеток, окрашенных ядерным красителем DAPI (A, B) и клеток, выявленных методом TUNEL с помощью дигоксигенина (C, D) в гранулярном слое зубчатой извилины (A, C) и в хилусе (B, D) интактных крыс линии КМ (группа 1), крыс линии КМ, подвергнутых четырем аудиогенным судорожным припадкам и выведенным из эксперимента через 4 ч (группа 2) и через 7 дней (группа 4) после последних судорог и крыс, получавших инъекции пифитрин- α за 1 ч до предъявления звукового стимула и выведенных из эксперимента через 4 ч (группа 3) и через 7 дней (группа 5) после последних судорог. По оси ординат — число DAPI и дигоксигенин-позитивных клеток. По оси абсцисс — номера экспериментальных групп. Данные представлены в виде средней $\pm$ SEM. Достоверных изменений нет, $p > 0.05$.

Fig. 4. Analysis of DAPI-stained nuclei (A, B) and the number of TUNEL-positive apoptotic cells (C, D) in the granular layer of the dentate gyrus (A, C) and in the hilus (B, D). The 1st group — intact KM strain rats, the 2nd and the 4th groups — KM rats with 4 audiogenic seizures were sacrificed 4 hours or 7 days following the last seizure, the 3rd groups and the 5th — KM rats with 4 audiogenic seizures that were administered pifitrin- α injection 1 hour prior to acoustic stimulus and were sacrificed 4 hours or 7 days following the last seizure. The y-axis of this graph represents a number of DAPI-stained nuclei and a number TUNEL positive cells. The x-axis of this graph — number of experimental groups. Data are presented as mean $\pm$ SEM. Difference are not significant, $p > 0.05$.

чальной стадии эпилептогенеза у крыс линии КМ уже наблюдается усиление aberrантного нейрогенеза в гиппокампе.

Показано, что в норме значительная часть вновь образованных клеток гиппокампа погибает путем апоптоза [54]. Эпилептиформная активность приводит к усилению апоптотической гибели [55, 56]. Причем, апоптотической гибели при эпилепсии подвержены не только вновь образованные, но и зрелые нейроны, сформировавшиеся при развитии гиппокампа [57, 58]. Продолжительность жизни новообразованных клеток и уровень клеточной гибели, как и интенсивность пролиферации, зависят от степени формирования эпилептиформной активности [9, 59].

В фармакологических моделях височной эпилепсии при формировании эпилептического статуса наблюдается значительная апоптотическая гибель клеток. Под

действием каиновой кислоты методом TUNEL показана локализация гибнущих клеток в хилусе и поле гиппокампа CA3, причем, максимальное число клеток гибнущих путем апоптоза было обнаружено через неделю после эпилептического статуса [55, 60]. В пилокарпиновой модели в гиппокампе наибольшее количество апоптотических клеток выявлялось на 3-й день после эпилептического статуса [61]. Однако у крыс линии WAR после 14–16-дневного аудиогенного киндлинга нейродегенерации в гиппокампе обнаружено не было. Существенная потеря клеток была выявлена только в амигдале [42].

В наших экспериментах аудиогенно-чувствительные крысы линии КМ были подвергнуты четырем судорожным припадкам, что можно рассматривать как начальную стадию формирования эпилептического статуса. Мы не выявили значительных нарушений в уровне апоптотической гибели клеток в гиппокампе этих крыс. Также не было обнаружено нарушений в содержании и активности белков, отвечающих за запуск и подавление апоптоза и аутофагии. В том числе не изменялся и уровень экспрессии и фосфорилирования белка p53 по Ser15, отвечающего за запуск апоптоза [24, 62, 63] и регулирующего также и аутофагию [25–27, 64].

Известно, что p53 участвует не только в регуляции клеточной гибели, но и отвечает за пролиферацию и дифференцировку нейрональных стволовых клеток [28–30, 65]. Белок p53 является транскрипционным фактором для ряда генов, отвечающих за дифференцировку клеток по нейрональному типу [30, 66]. В опытах *in vitro* было показано значительное снижение уровня дифференцировки нейронов при ингибировании p53 пифитрином- α или siRNA p53 [67]. В экспериментах на первичной культуре клеток эмбриональной коры [68] и на клетках линии PC12 было выявлено усиление роста и регенерации аксонов [69, 70] при повышенной экспрессии p53. Однако в опытах *in vivo* было показано, что блокада p53 пифитрином- α при ишемии коры не только приводит к увеличению числа нейрональных предшественников в субвентрикулярной зоне, но и способствует их выживаемости, миграции в поврежденные участки коры, дифференцировке по нейрональному типу и встраиванию в нейрональные сети [36].

Эти противоречивые данные являлись предпосылкой к нашему исследованию роли ингибирования p53 в формировании нарушений в структуре гиппокампа на модели формирования височной эпилепсии. Мы показали, что ингибирование p53 привело к значительному увеличению числа пролиферирующих клеток в гранулярном слое зубчатой извилины и в хилусе как непосредственно, так и через 7 дней после окончания четырехкратных судорожных припадков. Это подтверждает данные литературы об активирующем влиянии снижения уровня p53 на пролиферацию [29]. Аберрантный нейрогенез, описанный при эпилептиформных состояниях различной этиологии, по современным представлениям является одним из факторов, приводящих к усилению болезни [10–12]. Уже при краткосрочном киндлинге мы показали увеличение числа клеток, дифференцированных по нейрональному типу у крыс, которые не получали инъекций пифитрин- α , что может являться одним из факторов развития заболевания. Однако под действием пифитрин- α через неделю после судорог, несмотря на увеличение количества вновь образованных клеток в хилусе, число дифференцированных клеток снижалось по сравнению с таковым у крыс, которым вводили растворитель блокатора. Эти данные свидетельствуют о подавлении дифференцировки вновь образованных клеток по нейрональному типу при инактивации белка p53.

Можно предположить, что увеличение выявляемых пролиферирующих клеток связано со снижением апоптоза вновь образованных клеток при ингибировании одного из основных путей запуска апоптотической гибели. Однако количество

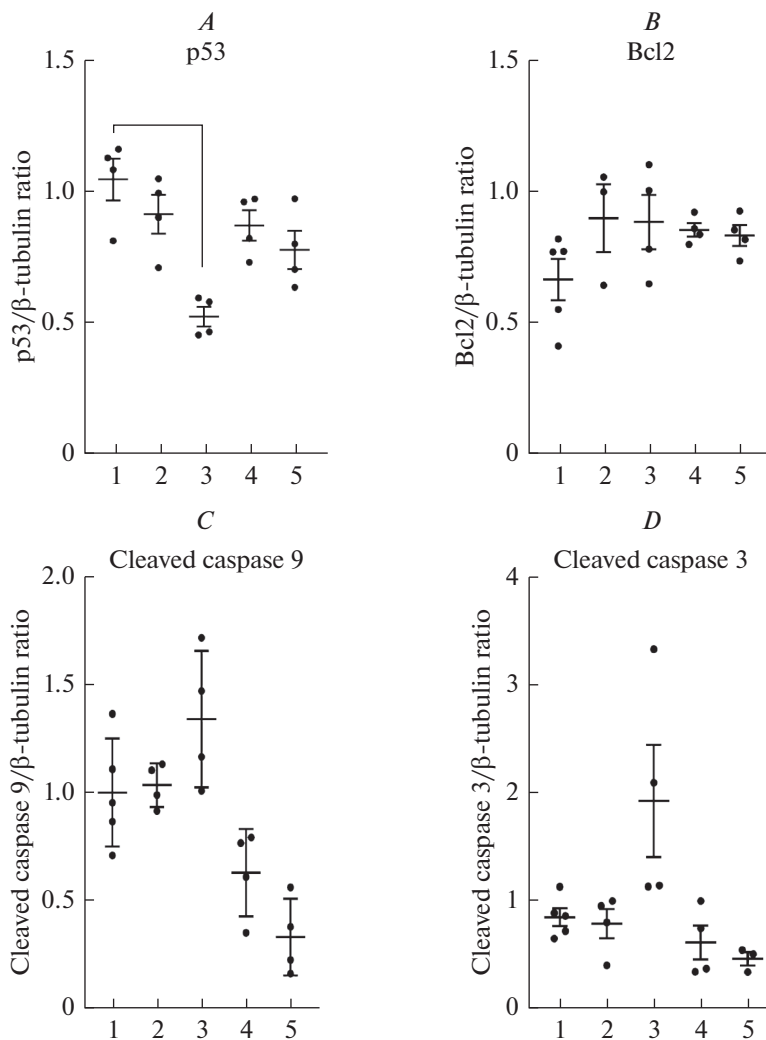
клеток под влиянием пифитрин- α не изменялось, и не было выявлено нарушений в уровне апоптоза, оцененного с помощью TUNEL. Анализ уровня экспрессии и активности сигнальных белков апоптоза, отвечающих за его инициацию и подавление, не выявил значимых отличий от характерных для контрольных животных и крыс, подвергавшихся судорожным припадкам. Исключение составлял только проапоптотический белок p53, содержание которого в гиппокампе значительно снизилось под действием пифитрин- α .

Пониженное содержания в гиппокампе p53 также может быть одной из причин усиления аутофагии, так как известно, что, несмотря на способность p53 как усиливать, так и подавлять аутофагию, нокаут p53 приводит к увеличению количества аутофагосом и к последующей клеточной смерти [27], это свидетельствует о преимущественно его ингибирующем действии на аутофагию за счет подавления синтеза белка LC3B. Однако мы не выявили достоверного увеличения активной формы LC3B при химическом ингибировании p53. Напротив, наблюдалось снижение содержания LC3BII — активной формы этого белка, и при этом уменьшалось содержание белка p62. p62 связывается с мембраной аутофагосом, и снижение его количества свидетельствует о деградации аутофагосом и об активации аутофагии. Однако об уровне аутофагии нельзя судить на основании изменений в экспрессии одного белка [71], а значимых отличий по другим белкам-регуляторам аутофагии под действием ингибитора p53 нами обнаружено не было.

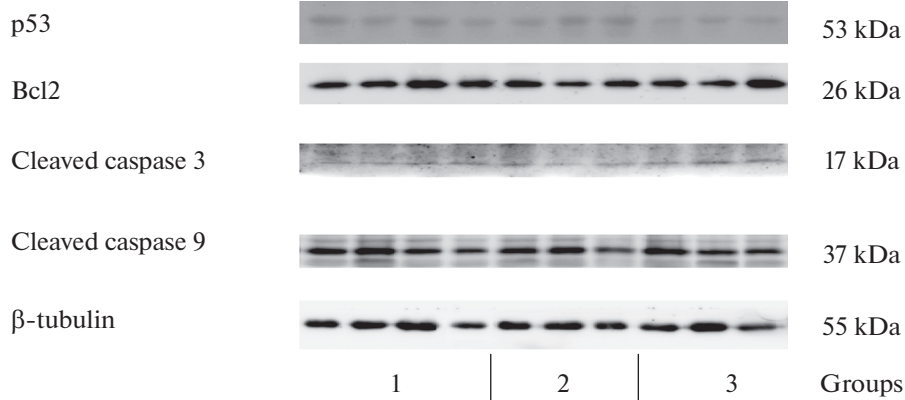
Таким образом, на модели формирования височной эпилепсии у крыс линии КМ уже после четырех аудиогенных судорожных припадков наблюдается усиление пролиферативной активности, аберрантная миграция вновь образованных клеток в хилус и ускорение их дифференцировки в нейроны. При этом мы не выявили нарушений в уровне апоптоза и аутофагии. Блокада активности проапоптотического белка p53 при введении его химического ингибитора пифитрин- α также не повлияла на апоптоз и аутофагию. Однако введение пифитрин- α привело к усилению пролиферации и миграции вновь образованных клеток в гранулярный слой зубчатой извилины и в хилус, при этом действие ингибитора негативно отразилось на скорости и характере дифференцировки вновь образованных клеток. Снижение числа дифференцированных нейронов в хилусе позволяет рассматривать пифитрин- α как потенциальный терапевтический подход для уменьшения нейродегенеративных нарушений при эпилепсии, так как его использование может уменьшить уровень гибели зрелых нейронов и при этом предотвратить усиление аберрантного нейрогенеза.

Рис. 5. Содержание про- и антиапоптотических белков в гиппокампе крыс линии КМ, подвергнутых аудиогенной стимуляции и при химическом ингибировании белка p53, определенное с помощью Вестерн-блота. Показано достоверное снижение содержания p53 при введении пифитрин- α через 4 ч после последнего судорожного припадка (A, E). Содержание расщепленной каспазы 9 (C) и 3 (D), а также антиапоптотического белка Bcl2 (B) во всех изученных группах крыс не изменялось. По оси абсцисс на графике расположены номера экспериментальных групп. По оси ординат — оптическая плотность, измеренная в условных единицах. Данные представлены в виде средней $\pm$ SEM. Скобкой обозначены достоверные различия $p < 0.05$.

Fig. 5. Western blot analysis of pro- and antiapoptotic protein expression in the hippocampi of KM rats that were administered pifitrin- α injection and were exposed to acoustic stimuli. Expression of p53 decreased after pifitrin- α administration in the group 3 (were sacrificed 4 h after the last seizure) (A, E). Expression of cleaved caspase 9 (C), 3 (D) and antiapoptotic protein Bcl2 (B) did not change. The y-axis of this graph represents relative optical density. The x-axis of this graph — number of experimental groups. Data are presented as mean $\pm$ SEM. Hooks mark a significant difference $p < 0.05$.



E



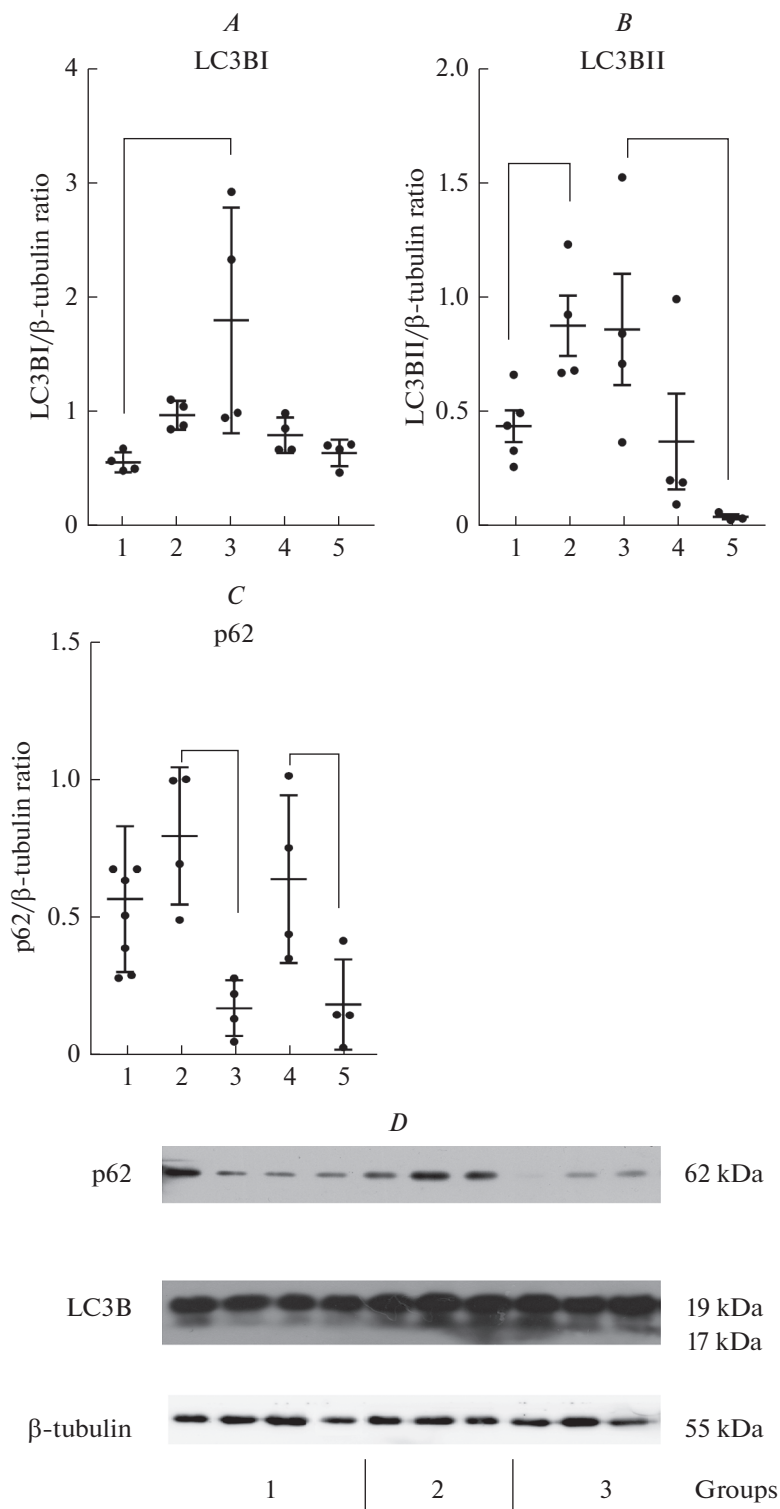


Рис. 6. Содержание белков (определенное с помощью Вестерн-блота) — регуляторов аутофагии в гиппокампе крыс линии КМ, подвергнутых аудиогенной стимуляции и при химическом ингибировании белка p53. Содержание LC3BI (A, D) и LC3BII (B, D) увеличивалось через 4 ч после последних судорог, а количество LC3BII через 7 дней снижалось (B). Показано достоверное снижение содержания p62 при введении пифитрин-α через 4 ч и через 7 дней после последнего судорожного припадка (C, D). По оси абсцисс — номера экспериментальных групп. По оси ординат — оптическая плотность, измеренная в условных единицах. Данные представлены в виде средней ± SEM. Скобкой обозначены достоверные различия $p < 0.05$.

Fig. 6. Western-blot analysis of autophagy regulator proteins in the hippocampus of KM rats that were administered pifitrin-α injection and were exposed to acoustic stimuli. Expression of LC3BI (A, D) and LC3BII (B, D) increased after 4 h from the last seizure but after 7 days expression of LC3BII decreased (B). We showed that p62 decreased after after pifitrin-α administration the 3rd and 5th groups (C, D). The y-axis of this graph represents relative optical density. The x-axis of this graph — number of experimental groups. Data are presented as mean ± SEM. Hooks marks a significant difference $p < 0.05$.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа была профинансирована за счет гранта № РФФИ 19-015-00070.

ВКЛАД АВТОРОВ

А.А. Куликов — планирование экспериментов, проведение анализа Вестерн-блот, окрашивание срезов методом TUNEL, обсуждение результатов. Е.В. Наслузова — иммуногистохимическое окрашивание срезов. Н.А. Дорофеева — работа с животными, подготовка проб. М.В. Глазова — интерпретация данных. Е.А. Лаврова — статистическая обработка результатов. Е.В. Черниговская — постановка задачи, планирование экспериментов, написание статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Blümcke I., Schewe J.-C., Normann S., Brüstle O., Schramm J., Elger C.E., Wiestler O.D. Increase of nestin-immunoreactive neural precursor cells in the dentate gyrus of pediatric patients with early-onset temporal lobe epilepsy. *Hippocampus*. 11(3): 311–321. 2001.
2. Crespel A., Rigau V., Coubes P., Rousset M.C., De Bock F., Okano H., Baldy-Moulinier M., Boc-kaert J., Lerner-Natoli M. Increased number of neural progenitors in human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol. Disease*. 19(3): 436–450. 2005.
3. Jessberger S., Parent J.M. Epilepsy and Adult Neurogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 7(12): a020677. 2015.
4. Kokaia M. Seizure-induced neurogenesis in the adult brain. *Eur. J. Neurosci*. 33(6): 1133–1138. 2011.
5. Scharfman H.E., Gray W.P. Relevance of seizure-induced neurogenesis in animal models of epilepsy to the etiology of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 48. Suppl 2: 33–41. 2007.
6. Thom M., Martinian L. Fau-Williams G., Williams G. Fau-toeber K., Stoeber K. Fau-Sisodiya S.M., Si-sodiya S.M. Cell proliferation and granule cell dispersion in human hippocampal sclerosis. (0022-3069 (Print)). 2005.
7. Romcy-Pereira R.N., Garcia-Cairasco N. Hippocampal cell proliferation and epileptogenesis after audiogenic kindling are not accompanied by mossy fiber sprouting or fluoro-jade staining. *Neuroscience*. 119(2): 533–546. 2003.
8. Bengzon J., Kokaia Z., Elmer E., Nanobashvili A., Kokaia M., Lindvall O. Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94(19): 10432–10437. 1997.
9. Mohapel P., Ekdahl C.T., Lindvall O. Status epilepticus severity influences the long-term outcome of neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Neurobiol. Disease*. 15(2): 196–205. 2004.
10. Cho K.O., Lybrand Z.R., Ito N., Brulet R., Tafacory F., Zhang L., Good L., Ure K., Kerner S.G., Birnbaum S.G., Scharfman H.E., Eisch A.J., Hsieh J. Aberrant hippocampal neurogenesis contributes to epilepsy and associated cognitive decline. *Nat. Commun*. 6: 6606. 2015.
11. Danzer S.C. Contributions of Adult-Generated Granule Cells to Hippocampal Pathology in Temporal Lobe Epilepsy: A Neuronal Bestiary. *Brain Plast*. 3(2): 169–181. 2018.
12. Santos V.R., Melo I.S., Pacheco A.L.D., Castro O.W. Life and death in the hippocampus: What's bad? *Epilepsy Behav*. 106595. 2019.

13. Liu J.X., Hu M., Zhu K., Chen X.L., Zhang J.S., Yuan B., Liu Y. Residual neurogenesis in chronically epileptic hippocampus of mice. *Epilepsy Res.* 127: 40–49. 2016.
14. Mohapel P., Ekdahl C.T., Lindvall O. Status epilepticus severity influences the long-term outcome of neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Neurobiol. Dis.* 15(2): 196–205. 2004.
15. Kotloski R., Lynch M., Lauersdorf S., Sutula T. Repeated brief seizures induce progressive hippocampal neuron loss and memory deficits. *Prog. Brain Res.* 135: 95–110. 2002.
16. Walker M. Neuroprotection in epilepsy. *Epilepsia.* 48. Suppl 8: 66–68. 2007.
17. Zhang X., Cui S.S., Wallace A.E., Hannesson D.K., Schmued L.C., Saucier D.M., Honer W.G., Corcoran M.E. Relations between brain pathology and temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.* 22(14): 6052–6061. 2002.
18. Wang B.H., Hou Q., Lu Y.Q., Jia M.M., Qiu T., Wang X.H., Zhang Z.X., Jiang Y. Ketogenic diet attenuates neuronal injury via autophagy and mitochondrial pathways in pentylenetetrazol-kindled seizures. *Brain Res.* 1678: 106–115. 2018.
19. Rodriguez-Vargas J.M., Ruiz-Magana M.J., Ruiz-Ruiz C., Majuelos-Melguizo J., Peralta-Leal A., Rodriguez M.I., Munoz-Gamez J.A., De Almodovar M.R., Siles E., Rivas A.L., Jaattela M., Oliver F.J. ROS-induced DNA damage and PARP-1 are required for optimal induction of starvation-induced autophagy. *Cell Res.* 22(7): 1181–1198. 2012.
20. McMahon J., Huang X., Yang J., Komatsu M., Yue Z., Qian J., Zhu X., Huang Y. Impaired autophagy in neurons after disinhibition of mammalian target of rapamycin and its contribution to epileptogenesis. *J. Neurosci.* 32(45): 15704–15714. 2012.
21. Giorgi F.S., Biagioni F., Lenzi P., Frati A., Fornai F. The role of autophagy in epileptogenesis and in epilepsy-induced neuronal alterations. *J. Neural Transm. (Vienna).* 122(6): 849–862. 2015.
22. Meldrum B.S. Implications for neuroprotective treatments. *Prog. Brain Res.* 135: 487–495. 2002.
23. Ding D.-X., Tian F.-F., Guo J.-L., Li K.a.I., He J.-X., Song M.-Y., Li L.I., Huang X.I.A. Dynamic expression patterns of ATF3 and p53 in the hippocampus of a pentylenetetrazole-induced kindling model. *Mol. Med. Reports.* 10(2): 645–651. 2014.
24. Engel T., Tanaka K., Jimenez-Mateos E.M., Caballero-Caballero A., Prehn J.H., Henshall D.C. Loss of p53 results in protracted electrographic seizures and development of an aggravated epileptic phenotype following status epilepticus. *Cell. Death. Dis.* 1: e79. 2010.
25. White E. Autophagy and p53. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6(4): a026120. 2016.
26. Tasdemir E., Chiara M. M., Morselli E., Criollo A., D'amelio M., Djavaheri-Mergny M., Cecconi F., Tavernarakis N., Kroemer G. A dual role of p53 in the control of autophagy. *Autophagy.* 4(6): 810–814. 2008.
27. Scherz-Shouval R., Weidberg H., Gonen C., Wilder S., Elazar Z., Oren M. p53-dependent regulation of autophagy protein LC3 supports cancer cell survival under prolonged starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107(43): 18511–18516. 2010.
28. Meletis K., Wirta V., Hede S.-M., Nistér M., Lundeberg J., Frisén J. p53 suppresses the self-renewal of adult neural stem cells. *Development.* 133(2): 363–369. 2006.
29. Grigor'eva Y.S., Glazova M. The role of p53 in the proliferation and differentiation of neural stem cells in organotypic cultures of mouse hippocampus. *J. Neurosci. Behav. Physiol.* 45(6): 627–636. 2015.
30. Glazova M. The role of p53 protein in the regulation of neuronal differentiation. *J. Neurosci. Behav. Physiol.* 46(9): 984–991. 2016.
31. Luo Y., Kuo C.C., Shen H., Chou J., Greig N.H., Hoffer B.J., Wang Y. Delayed treatment with a p53 inhibitor enhances recovery in stroke brain. *Ann. Neurol.* 65(5): 520–530. 2009.
32. Zhou D., Zhang Q., He L.M., Du J., Zhang F., Sun C.K., Zhou Y., Wang X.W., Lin G., Song K.M., Wu L.G., Yang Q. Conversion of fibroblasts to neural cells by p53 depletion. *Cell Rep.* 9(6): 2034–2042. 2014.
33. Culmsee C., Zhu X., Yu Q.S., Chan S.L., Camandola S., Guo Z., Greig N.H., Mattson M.P. A synthetic inhibitor of p53 protects neurons against death induced by ischemic and excitotoxic insults, and amyloid beta-peptide. *J. Neurochem.* 77(1): 220–228. 2001.
34. Pietrancosta N., Moumen A., Dono R., Lingor P., Planchamp V., Lamballe F., Bähr M., Kraus J.-L., Maina F. Imino-tetrahydro-benzothiazole Derivatives as p53 Inhibitors: Discovery of a Highly Potent in Vivo Inhibitor and Its Action Mechanism. *J. Med. Chem.* 49(12): 3645–3652. 2006.
35. Sohn D., Graupner V., Neise D., Essmann F., Schulze-Osthoff K., Janicke R.U. Pifithrin-[alpha] protects against DNA damage-induced apoptosis downstream of mitochondria independent of p53. *Cell. Death Differ.* 16(6): 869–878. 2009.
36. Luo Y., Kuo C.-C., Shen H., Chou J., Greig N.H., Hoffer B.J., Wang Y. Delayed treatment with a p53 inhibitor enhances recovery in stroke brain. *Ann. Neurol.* 65(5): 520–530. 2009.

37. *Garcia-Cairasco N., Umeoka E.H., De Oliveira J.C.* The Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain and its contributions to epileptology and related comorbidities: history and perspectives. *J. Epilepsy Behav.* 71: 250–273. 2017.
38. *Vinogradova L.V.* Audiogenic kindling in Wistar and WAG/Rij rats: Kindling-prone and kindling-resistant subpopulations. *J. Epilepsia.* 49(10): 1665–1674. 2008.
39. *Vinogradova L.V.* Audiogenic kindling and secondary subcortico-cortical epileptogenesis: Behavioral correlates and electrographic features. *J. Epilepsy Behav.* 71: 142–153. 2017.
40. *Poletaeva I., Surina N., Kostina Z., Perepelkina O., Fedotova I.* The Krushinsky-Molodkina rat strain: The study of audiogenic epilepsy for 65 years. *Epilepsy & Behavior.* 71: 130–141. 2017.
41. *Faingold C.L.* Neuronal networks in the genetically epilepsy-prone rat. *Adv. Neurol.* 79: 311–321. 1999.
42. *Galvis-Alonso O.Y., Cortes De Oliveira J.A., Garcia-Cairasco N.* Limbic epileptogenicity, cell loss and axonal reorganization induced by audiogenic and amygdala kindling in wistar audiogenic rats (WAR strain). *Neuroscience.* 125(3): 787–802. 2004.
43. *Parent J.M., Yu T.W., Leibowitz R.T., Geschwind D.H., Sloviter R.S., Lowenstein D.H.* Dentate Granule Cell Neurogenesis Is Increased by Seizures and Contributes to Aberrant Network Reorganization in the Adult Rat Hippocampus. *J. Neurosci.* 17(10): 3727–3738. 1997.
44. *Gray W.P., Sundstrom L.E.* Kainic acid increases the proliferation of granule cell progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. *Brain Res.* 790(1–2): 52–59. 1998.
45. *Jessberger S., Römer B., Babu H., Kempermann G.* Seizures induce proliferation and dispersion of doublecortin-positive hippocampal progenitor cells. *Exp. Neurol.* 196(2): 342–351. 2005.
46. *Kempermann G.* Adult Neurogenesis, in *Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical.* New York: Springer. 161–178. 2013.
47. *Danzer S.C.* Depression, stress, epilepsy and adult neurogenesis. *Exp. Neurol.* 233(1): 22–32. 2012.
48. *Parent J.M.* Adult neurogenesis in the intact and epileptic dentate gyrus. In: *Progress in Brain Research.* Elsevier. 529–817. 2007.
49. *Scharfman H.E., Pierce J.P.* New insights into the role of hilar ectopic granule cells in the dentate gyrus based on quantitative anatomic analysis and three-dimensional reconstruction. *Epilepsia.* 53. Suppl. 1: 109–115. 2012.
50. *Buckmaster P.S., Zhang G.F., Yamawaki R.* Axon sprouting in a model of temporal lobe epilepsy creates a predominantly excitatory feedback circuit. *J. Neurosci.* 22(15): 6650–6658. 2002.
51. *Dashtipour K., Tran P.H., Okazaki M.M., Nadler J.V., Ribak C.E.* Ultrastructural features and synaptic connections of hilar ectopic granule cells in the rat dentate gyrus are different from those of granule cells in the granule cell layer. *Brain Res.* 890(2): 261–271. 2001.
52. *Murphy B.L., Pun R.Y., Yin H., Faulkner C.R., Loepke A.W., Danzer S.C.* Heterogeneous integration of adult-generated granule cells into the epileptic brain. *J. Neurosci.* 31(1): 105–117. 2011.
53. *Scharfman H.E., Goodman J.H., Sollas A.L.* Granule-Like Neurons at the Hilar/CA3 Border after Status Epilepticus and Their Synchrony with Area CA3 Pyramidal Cells: Functional Implications of Seizure-Induced Neurogenesis. *J. Neurosci.* 20(16): 6144–6158. 2000.
54. *Ryu J.R., Hong C.J., Kim J.Y., Kim E.K., Sun W., Yu S.W.* Control of adult neurogenesis by programmed cell death in the mammalian brain. *Mol. Brain.* 9: 43. 2016.
55. *Liang S., Zhang L., Yu X., Zhang S., Zhang G., Ding P.* Neuroprotective Effect of Electric Conduction Treatment on Hippocampus Cell Apoptosis in KA Induced Acute Temporal Lobe Epileptic Rats. *Brain Stimul.* 9(6): 933–939. 2016.
56. *Henshall D.C., Simon R.P.* Epilepsy and apoptosis pathways. *J. Cerebr. Blood Flow Metab.* 25(12): 1557–1572. 2005.
57. *Zhu H., Dahlstrom A., Hansson H.A.* Characterization of cell proliferation in the adult dentate under normal conditions and after kainate induced seizures using ribonucleotide reductase and BrdU. *Brain Res.* 1036(1–2): 7–17. 2005.
58. *Ekdahl C.T., Zhu C., Bonde S., Bahr B.A., Blomgren K., Lindvall O.* Death mechanisms in status epilepticus-generated neurons and effects of additional seizures on their survival. *Neurobiol. Dis.* 14(3): 513–523. 2003.
59. *Cardoso A., Lukyanova E.A., Madeira M.D., Lukyanov N.V.* Seizure-induced structural and functional changes in the rat hippocampal formation: comparison between brief seizures and status epilepticus. *Behav. Brain Res.* 225(2): 538–546. 2011.
60. *Pollard H., Charriaud-Marlangue C., Cantagrel S., Represa A., Robain O., Moreau J., Ben-Ari Y.* Kainate-induced apoptotic cell death in hippocampal neurons. *Neuroscience.* 63(1): 7–18. 1994.
61. *Roux P.P., Colicos M.A., Barker P.A., Kennedy T.E.* p75 neurotrophin receptor expression is induced in apoptotic neurons after seizure. *J. Neurosci.* 19(16): 6887–6896. 1999.

62. Ding D.X., Tian F.F., Guo J.L., Li K., He J.X., Song M.Y., Li L., Huang X. Dynamic expression patterns of ATF3 and p53 in the hippocampus of a pentylenetetrazole-induced kindling model. *Mol. Med. Rep.* 10(2): 645–651. 2014.
63. Fujikawa D.G. Prolonged seizures and cellular injury: understanding the connection. *Epilepsy Behav.* 7. Suppl. 3: S3–S11. 2005.
64. Nikolettou V., Markaki M., Palikaras K., Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1833(12): 3448–3459. 2013.
65. Van Lookeren Campagne M., Gill R. Tumor-suppressor p53 is expressed in proliferating and newly formed neurons of the embryonic and postnatal rat brain: comparison with expression of the cell cycle regulators p21Waf1/Cip1, p27Kip1, p57Kip2, p16Ink4a, cyclin G1, and the proto-oncogene Bax. *J. Comp. Neurol.* 397(2): 181–198. 1998.
66. Zhou D., Zhang Z., He L.-M., Du J., Zhang F., Sun C.-K., Zhou Y., Wang X.-W., Lin G., Song K.-M., Wu L.-G., Yang Q. Conversion of Fibroblasts to Neural Cells by p53 Depletion. *Cell Reports.* 9(6): 2034–2042. 2014.
67. Eom H.S., Park H.R., Jo S.K., Kim Y.S., Moon C., Jung U. Ionizing radiation induces neuronal differentiation of Neuro-2a cells via PI3-kinase and p53-dependent pathways. *Int. J. Radiat. Biol.* 91(7): 585–595. 2015.
68. Di Giovanni S., Knights C.D., Rao M., Yakovlev A., Beers J., Catania J., Avantaggiati M.L., Faden A.I. The tumor suppressor protein p53 is required for neurite outgrowth and axon regeneration. *The EMBO J.* 25(17): 4084–4096. 2006.
69. Hughes A.L., Gollapudi L., Sladek T.L., Neet K.E. Mediation of nerve growth factor-driven cell cycle arrest in PC12 cells by p53. Simultaneous differentiation and proliferation subsequent to p53 functional inactivation. *J. Biol. Chem.* 275(48): 37829–37837. 2000.
70. Montano X. P53 associates with trk tyrosine kinase. *Oncogene.* 15(3): 245–256. 1997.
71. Klionsky D.J., Abdelmohsen K., Abe A., Abedin M.J. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *J. Autophagy.* 12(1): 1–222. 2016.

Pifitrin- α Decreases Neuronal Differentiation of Newborn Cells in Subgranular Zone of Dental Gyrus at Initial Stages of Audiogenic Kindling in the Krushinsky–Molodkina Rats

**A. A. Kulikov^{a,*}, E. V. Nasluzova^a, N. A. Dorofeeva^a, M. V. Glazova^a,
E. A. Lavrova^a, and E. V. Chernigovskaya^a**

^a*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences,
Saint Petersburg, Russia*

**e-mail: alexey.kulikov@iephb.ru*

One of the main goal of modern neurobiology is search for approaches to prevent structural violations in the brain. In particular, damage to the hippocampus after epileptic activity. Epilepsy leads to an increase in proliferation in the hippocampal neurogenic niche – subgranular cells layer of dental gyrus. In recent years, there is a prevalent idea that new-born cells contribute to epileptogenesis to a greater extent than prevent neurodegenerative damage. We suggested that proapoptotic protein p53 can be one of possible therapeutic targets for epilepsy and neurodegenerative consequences of this disease. In present work, we used The Krushinsky–Molodkina (KM) inbred rat strain. This strain is genetically prone to audiogenic seizures (AGS). Audiogenic kindling induced epileptiform activity in the limbic system and the cortex. It has been shown that in initial stages of epileptogenesis 4 AGS lead to increase in proliferation, aberrant migration in hilus and acceleration of differentiation of newborn cells. We did not show any disturbance in apoptosis nor autophagy in early development of limbic epilepsy. Pifitrin- α (chemical inhibitor of p53) did not lead to changes in apoptosis and autophagy but caused increase in proliferation and migration of newborn cells in granular cell layer and hilus of dental gyrus. However, in a week after the last seizure the number of differentiated cells decreased despite a significant increase in the number of newborn cells in the group with inactivation of p53 compared to the vehicle control group. Decreased number of differentiated cells tells that pifitrin- α may be used as a potential therapeutic agent for reduction in neurodegeneration which is associated with epilepsy.

Keywords: neurogenesis, apoptosis, autophagy, p53, pifitrin- α , limbic epilepsy, Krushinsky–Molodkina rat strain

ЦИТИРОВАТЬ:

Куликов А.А., Наслузова Е.В., Дорофеева Н.А., Глазова М.В., Лаврова Е.А., Черниговская Е.В. Пифитрин-альфа тормозит дифференцировку вновь образованных клеток субгранулярной зоны зубчатой извилины у крыс линии Крушинского—Молодкиной при аудиогенном киндинге. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 107(3): 332–351. 2021.

DOI: 10.31857/S0869813921030079

TO CITE THIS ARTICLE:

Kulikov A.A., Nasluzova E.V., Dorofeeva N.A., Glazova M.V., Lavrova E.A., Chernigovskaya E.V. Pifitrin- α decreases neuronal differentiation of newborn cells in subgranular zone of dental gyrus at initial stages of audiogenic kindling in the Krushinsky—Molodkina rats. Russian Journal of Physiology. 107(3): 332–351. 2021.

DOI: 10.31857/S0869813921030079

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ МАЛЫХ ДОЗ L-ТИРОКСИНА НА УСТОЙЧИВОСТЬ К СТРЕССУ
ЖИВОТНЫХ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ВЫЗВАННЫМ ДЕФИЦИТОМ
СИМПАТИЧЕСКИХ НЕРВНЫХ ВЛИЯНИЙ**

© 2021 г. Е. А. Гусакова^{1, *}, И. В. Городецкая¹

¹*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
Витебск, Беларусь*

**E-mail: elena-gusakova83@mail.ru*

Поступила в редакцию 30.10.2020 г.

После доработки 11.01.2021 г.

Принята к публикации 17.01.2021 г.

Умеренное повышение уровня катехоламинов оказывает адаптивный эффект при стрессе. Доказана и роль тиреоидной оси в адаптации к стрессу. Однако остается неясным, является ли защитное действие йодсодержащих тиреоидных гормонов (ЙТГ) при стрессе опосредованным катехоламинами или прямым. Цель работы — исследовать выраженность антистрессорного эффекта малых доз L-тироксина у животных с вызванным в эксперименте дефицитом симпатических нервных влияний. Работа выполнена на 270 белых беспородных крысах-самцах массой 220–240 г. Стресс моделировали по методике “дефицита времени”. L-тироксин вводили в малых, близких к физиологическим, дозах (внутрижелудочно от 1.5 до 3 мкг/кг в течение 28 дней). Гуанетидин вводили внутрибрюшинно (30 мг/кг в течение 28 дней). Интенсивность стресс-реакции исследовали по изменениям: 1) относительной массы надпочечников, тимуса и селезенки; 2) уровня кортикостерона и инсулина в крови, величины кортикостерон-инсулинового коэффициента; 3) состояния слизистой оболочки желудка. Двигательную активность крыс оценивали в тесте “открытое поле”. Физическую выносливость животных изучали по времени их нахождения на вращающемся валике. Полученные результаты обработаны непараметрическими методами с использованием программы Statistica 10.0 (StatSoftinc., STA999K347156-W). Химическая десимпатизация предупреждает стимуляцию тиреоидной функции при стрессе и, вместе с тем, определяет большее снижение устойчивости организма в этих условиях. Сочетанное введение L-тироксина и гуанетидина оказывает защитное действие при стрессе, как это имеет место и у крыс с интактной нервной системой. Однако по сравнению с ними данный эффект выражен в меньшей степени, это указывает на то, что катехоламинами играют роль в его реализации, но определяющее значение имеют ЙТГ. Таким образом, защитный эффект L-тироксина в малых дозах при стрессе частично опосредован катехоламинами, но в большей степени — самими ЙТГ.

Ключевые слова: йодсодержащие тиреоидные гормоны, стресс, химическая десимпатизация

DOI: 10.31857/S0869813921030067

Известно значение активации симпатoadреналовой системы в формировании стресс-реакции [1]. Долговременное повышение уровня катехоламинов оказывает значительный повреждающий эффект [2] за счет активации перекисного окисле-

ния липидов [3] и снижения активности антиоксидантной системы [4], нарушения динамического равновесия в системе протеолитических ферменты и их ингибиторы [5], ухудшения митохондриального дыхания [6], дисбаланса механизмов гуморального [7] и клеточного [8] иммунитета. Однако умеренные количества катехоламинов оказывают адаптивный эффект, поскольку: 1) повышают уровень глюкозы в крови (непосредственно — за счет стимуляции гликогенолиза и глюконеогенеза [9] и опосредованно — через усиление секреции глюкагона α -клетками [10] и ингибирования секреции инсулина β -клетками [11] островков Лангерганса поджелудочной железы). Это 1) обеспечивает процессы адаптации легкодоступным источником энергии; 2) стимулируют гликолиз [12], а гликолитический механизм синтеза АТФ более устойчив [13], чем окислительное фосфорилирование, что позволяет клеткам поддерживать функции, требующие значительных энергетических затрат в условиях стресса; 3) активируют липолиз [14], что приводит к увеличению уровня свободных жирных кислот в плазме, которые используются мышцами в качестве источника энергии; 4) увеличивают концентрацию ионов кальция в миокарде [15], которые оказывают стабилизирующее действие на белки и липиды мембраны, активируют фосфолипазы; 5) стимулируют функцию сердца, оказывая положительные ино-, батмо-, дромо- и хромотропные эффекты [16, 17].

Установлено и значение тиреоидной оси в стресс-реакции: введение малых доз тироксина оказывает стресс-протекторное действие, связанное со стимуляцией локальных стресс-лимитирующих систем — адениннуклеотидов [18], простагландинов [19], белков теплового шока [20], антиоксидантных ферментов [21]. Йодсодержащие тиреоидные гормоны (ЙТГ) повышают активность ингибиторов протеиназ в крови и печени [22], экспрессию ранних генов *c-fos* и *c-jun* в миокарде [23]. Защитное действие ЙТГ было установлено, в том числе, и при стрессе “дефицита времени” [24]. Однако до сих пор остается неисследованным, участвуют ли катехоламины в осуществлении стресс-протекторного действия ЙТГ или главенствующее значение имеют сами ЙТГ.

Цель исследования: выяснить выраженность антистрессорного эффекта малых доз L-тироксина у животных с вызванным в эксперименте дефицитом симпатических нервных влияний.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 270 белых половозрелых беспородных крысах-самцах. В опыт брали 3-месячных животных, масса тела которых составляла 220–240 г. Эксперименты проводили в одно и то же время суток с соблюдением требований гуманного обращения с экспериментальными животными, изложенных в методических указаниях “Положение о порядке использования лабораторных животных в научно-исследовательских работах и педагогическом процессе учреждения образования “Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет” и мерах по реализации требований биомедицинской этики”.

Было сформировано 9 групп животных: “Интактные”, “Контроль”, “Стресс”, “Тироксин”, “Тироксин + стресс”, “Десимпатизация”, “Десимпатизация + стресс”, “Тироксин + десимпатизация”, “Тироксин + десимпатизация + стресс”.

Для воспроизведения эмоционального стресса использовали моделирование ситуации “дефицита времени” [24]. Для этого крыс помещали в нижнюю часть спиралевидного тоннеля, который быстро заполняли холодной водой. Животное, стремясь избежать контакта с ней, вынуждено было быстро перемещаться вверх по установке и не могло избежать ситуации, в которой оказалось. Крыс тестировали по одной особи, после окончания теста помещали в индивидуальные клетки.

Л-тироксин (Berlin-Chemie AG, Менарини Групп, Германия) вводили в малых, близких к физиологическим дозах, внутрижелудочно в 1%-ном крахмальном клейстере, еженедельно наращивая дозу от 1.5 до 3 мкг/кг в течение 28 дней.

Для моделирования дефицита симпатических нервных влияний использовали химическую десимпатизацию с помощью введения гуанетидина, который оказывает периферическое действие, подавляя выделение норадреналина в адренергических синапсах путем экзоцитоза, не влияя при этом на входящий ток ионов кальция через потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы пресинаптической мембраны [25]. Гуанетидин (Guanethidine monosulfate, Sigma) вводили внутривентально в физиологическом растворе в дозе 30 мг/кг массы в течение 28 дней. Стресс в группах животных, получавших указанные препараты, воспроизводили на следующие сутки после окончания их введения. Всем крысам за исключением интактных, внутрижелудочно вводили 1%-ный крахмальный клейстер в течение 28 дней.

Забой животных осуществляли под уретановым наркозом (внутривентально 1 г/кг) через 1 ч после стресса (группы “Стресс”, “Тироксин + стресс”, “Десимпатизация + стресс”, “Тироксин + десимпатизация + стресс”) или на следующие сутки после окончания введения крахмального клейстера (группа “Контроль”) или препаратов (группы “Тироксин”, “Десимпатизация”).

Интенсивность общего адаптационного синдрома исследовали по изменениям: 1) относительной массы надпочечников, тимуса и селезенки (отношение их абсолютной массы к массе тела); 2) уровня кортикостерона и инсулина в крови (иммуноферментным методом, используя наборы Rat corticosterone (ELISA kit, Shanghai, Китай) и Insulin Test System (Monobind Inc. Accu-Bind, California, США) и величины кортикостерон-инсулинового (К/И) коэффициента, который рассчитывали по соотношению медиан концентраций указанных гормонов в каждой группе: чем он выше, тем интенсивнее напряженность компенсаторных механизмов и меньше резервные возможности организма [26]; 3) состояния слизистой оболочки желудка (СОЖ).

Для исследования СОЖ крыс подвергали суточной пищевой депривации при свободном доступе к воде. После извлечения желудок вскрывали вдоль большой кривизны и промывали 0.9%-ным раствором NaCl. В отраженном свете под малым увеличением изучали частоту поражения СОЖ (отношение числа животных, имевших кровоизлияния в слизистую, к общему количеству крыс в группе, выраженное в %), тяжесть (в баллах: 0 – отсутствие кровоизлияний; 0.5 – гиперемия; 1 – единичные (1 или 2) точечные кровоизлияния; 2 – множественные (более 3) незначительные (площадью около 1 мм²) кровоизлияния; 3 – множественные значительные (площадью более 1 мм²) кровоизлияния; 4 – массивные кровоизлияния, охватывающие практически всю поверхность слизистой) [27, в нашей модификации]. Рассчитывали индекс поражения СОЖ как произведение частоты и средней тяжести поражения (общее число баллов в группе, деленное на количество животных в ней), деленное на 100. Частоту поражения СОЖ исследовали у 30 крыс, тяжесть – у 10, остальные показатели стресс-реакции – у 6 животных, выбранных случайным образом из каждой экспериментальной группы.

Двигательную активность крыс оценивали в затененной комнате с помощью теста “открытое поле” в течение 3 мин. Использовали видеосистему SMART и программное обеспечение SMART 3.0. Для характеристики горизонтальной двигательной активности изучали общую дистанцию перемещения животных, расстояние перемещения на периферии и в центре “открытого поля”, максимальную скорость движения. Вертикальную локомоторную активность, характеризующую также исследовательское поведение, определяли по количеству стоек. Исследовательскую активность оценивали по соотношению продолжительности пребывания

и замирания крыс в центральной и периферической зонах, общей длительности замирания, числу входов и латентному периоду входа в центр, параллельному индексу (по изменению угла пути между текущим и предыдущим направлениями движения животного: чем ближе данный параметр к 1, тем больше перемещений по прямой; чем ближе к -1, тем больше изменений в направлении смещений). После проведения теста “открытое поле” с целью оценки физической выносливости животное помещали на валик ротарода (LE 8300), который вращался со скоростью 30–35 оборотов/мин.

Уровень ЙТГ – трийодтиронина (T_3) и тироксина (T_4) (нмоль/л), их свободных фракций ($T_{3св}$ и $T_{4св}$) (пмоль/л), тиреотропного гормона (ТТГ) (мкМЕ/мл) в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом. Применяли наборы реактивов ДС-ИФА-Тироид-Т3общий, ДС-ИФА-Тироид-Т4общий, ДС-ИФА-Тироид-Т3свободный, ДС-ИФА-Тироид-Т4свободный, ДС-ИФА-ТИРОИД-ТТГ. Измерение оптической плотности проб проводили на фотометре универсальном Ф 300 ТП (Беларусь).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 10.0 (StatSoftinc., STA999K347156-W). Для проверки соответствия данных закону распределения случайных величин применяли W-критерий Шапиро–Уилка. Полученные нами данные отличались от нормального распределения, поэтому для их статистического анализа использовали непараметрические критерии. При межгрупповом сравнении для анализа различий по количественным параметрам применяли U-критерий Манна–Уитни. Данные по частоте поражения СОЖ, являющиеся качественными бинарными признаками, обрабатывали с использованием модулей “Непараметрические статистики”, “Таблицы 2×2 ” (точный критерий Фишера). Критическим уровнем значимости был принят $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У интактных крыс сывороточный уровень T_3 составил 1.69 (1.39; 1.82) нмоль/л, T_4 – 48.39 (41.96; 52.12) нмоль/л, $T_{3св}$ – 3.29 (2.99; 3.57) пмоль/л, $T_{4св}$ – 11.95 (10.25; 14.15) пмоль/л, ТТГ – 0.18 (0.09; 0.23) мкМЕ/мл. Величина относительной массы надпочечников была равна 0.20 (0.16; 0.27) мг/г, тимуса – 2.09 (1.98; 2.31) мг/г, селезенки – 4.10 (3.85; 4.18) мг/г. Содержание кортикостерона в крови составило 3.86 (3.42; 4.16) нг/мл, инсулина – 1.33 (1.16; 1.48) мкМЕ/мл. Поражение СОЖ отсутствовало.

У контрольных животных, которым вводили 1%-ный крахмальный клейстер, все изученные показатели не отличались от таковых у интактных, за исключением незначительного повреждения СОЖ (при этом ни один из параметров, характеризующих состояние СОЖ, достоверно не отличался от их величины у интактных животных). С нашей точки зрения, это связано с самой процедурой введения крахмального клейстера.

Введение гуанетидина снизило сывороточную концентрацию ЙТГ: T_3 на 21%, T_4 на 15%, $T_{3св}$ на 28%, $T_{4св}$ на 33%. В ответ на это содержание ТТГ в крови возросло – на 33% (рис. 1).

Относительная масса надпочечников у животных, подвергнутых химической десимпатизации, повысилась на 36%, а таковая тимуса и селезенки упала на 22 и 17% (рис. 2).

Сывороточная концентрация кортикостерона увеличилась на 49%, инсулина – снизилась на 14% (рис. 3).

Вследствие описанных изменений содержание кортикостерона и инсулина, а также значение К/И коэффициента возросло в 1.74 раза. Параметры, характеризующие состояние СОЖ, не отличались от таковых в группе “Контроль” (табл. 1).

Физическая выносливость животных с дефицитом симпатических нервных влияний существенно уменьшилась, в связи с чем время их удержания на вращающемся валике ротарода упало на 53% (табл. 2). Общая дистанция перемещения имела тенденцию к снижению. Общая длительность замирания и параллельный индекс, напротив, имели тенденцию к увеличению (табл. 3). Остальные параметры, характеризующие локомоторную активность и исследовательское поведение животных, не изменялись (табл. 2 и 3).

Стресс у десимпатизированных животных, в отличие от аналогичного воздействия у крыс, не получавших гуанетидин, не вызвал повышения концентрации ЙТГ и снижения содержания ТТГ в крови (по отношению к их значениям в группе “Десимпатизация”). В результате, по сравнению с ее величиной в группе “Контроль”, концентрация ЙТГ в крови была ниже: T_3 на 21%, T_3 св на 31%, T_4 св на 37%. Сывороточный уровень T_4 имел тенденцию к уменьшению ($0.05 < p < 0.1$). Содержание ТТГ в крови, напротив, было выше на 21%. По отношению к значению аналогичных параметров в группе “Стресс” концентрация всех форм ЙТГ в крови была меньше: T_3 на 39%, T_4 на 41%, T_3 св на 61%, T_4 св на 69%, а ТТГ — больше на 57%.

После стресса у крыс, которым вводили гуанетидин, относительная масса тимуса снижалась менее значительно — на 13%, тогда как масса надпочечников и селезенки изменялась в такой же степени, как и у животных с интактной симпатической нервной системой в аналогичных условиях: по сравнению с их величиной в группе “Десимпатизация” относительная масса надпочечников повышалась на 28%, селезенки падала на 16%. Однако содержание кортикостерона в крови симпатэктомированных крыс, подвергнутых стрессу, возрастало более существенно, чем после

Рис. 1. Влияние введения L-тироксина или (и) гуанетидина на изменение сывороточного уровня общего трийодтиронина (A), общего тироксина (B), свободного трийодтиронина (C), свободного тироксина (D) и тиреотропного гормонов (E) при стрессе.

Здесь и на рис. 2, 3:

1) каждая экспериментальная группа состояла из 6 животных;

2) □ — медиана; □ — верхняя граница нижнего квартиля и нижняя граница верхнего квартиля (LQ; UQ); ⊔ — минимальное и максимальное значения показателя;

3) группы животных: C — “Контроль”; S — “Стресс”; T — “Тироксин”; TS — “Тироксин + стресс”; D — “Десимпатизация”; DS — “Десимпатизация + стресс”; TD — “Тироксин + десимпатизация”; TDS — “Тироксин + десимпатизация + стресс”;

4) $p < 0.05$ по отношению: * — к группе “Контроль”; # — к группе “Стресс”; + — к группам “Контроль” и “Стресс”; ° — к группе “Тироксин”; ^ — к группе “Десимпатизация”; ∇ — к группе “Тироксин + десимпатизация”; Δ — к группе “Тироксин + стресс”; X — к группе “Десимпатизация + стресс”.

Fig. 1. Effect of injection of L-thyroxine or (and) guanetidine on changes in serum levels of total triiodothyronine (A), total thyroxine (B), free triiodothyronine (C), free thyroxine (D) and thyroid stimulating hormones (E) under stress

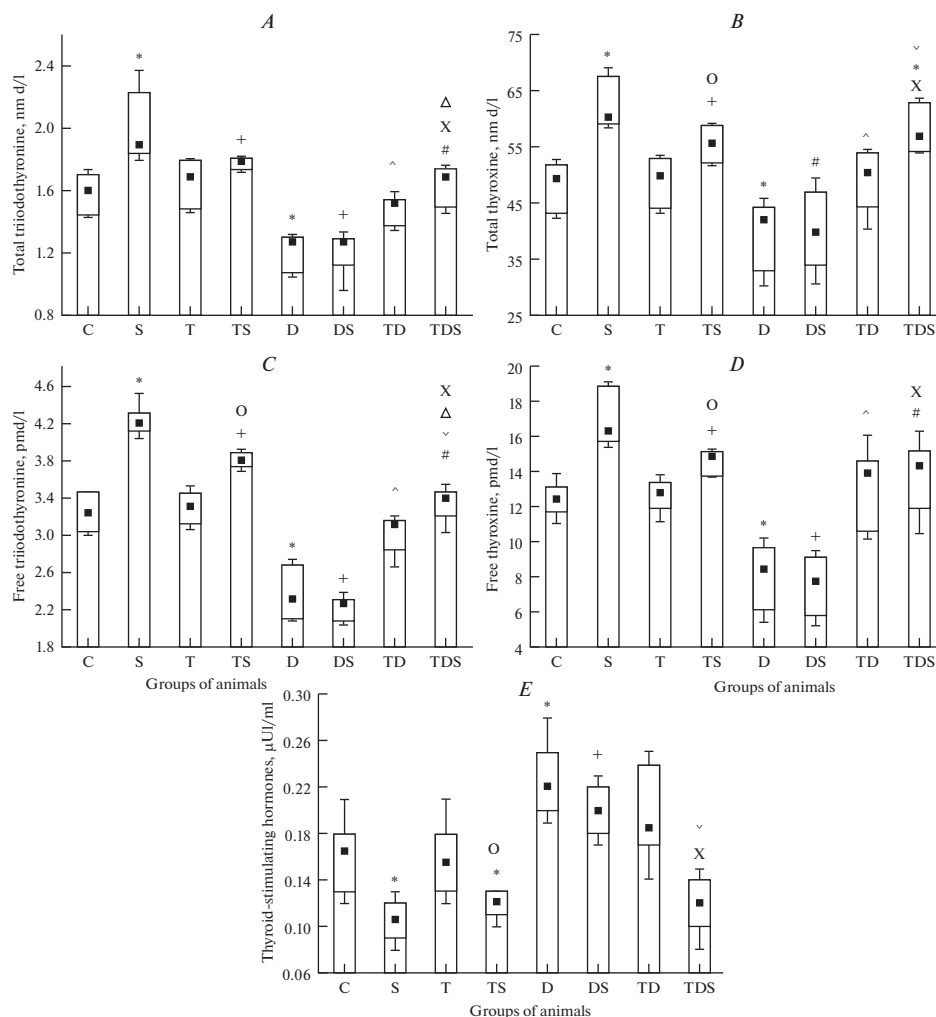
Here and in the figures 2, 3:

1) each experimental group consisted of 6 animals;

2) □ — median; □ — lower quartile and upper quartile (LQ; UQ); ⊔ — minimum and maximum values;

3) groups of animals: C — “Control”; S — “Stress”; T — “Thyroxine”; TS — “Thyroxine + stress”; D — “Desympatisation”; DS — “Desympatisation + stress”; TD — “Thyroxine + desympatisation”; TDS — “Thyroxine + desympatisation + stress”;

4) $p < 0.05$ comparison with: * — “Control”; # — “Stress”; + — “Control” and “Stress”; ° — “Thyroxine”; ^ — “Desympatisation”; ∇ — “Thyroxine + desympatisation”; Δ — “Thyroxine + stress”; X — “Desympatisation + stress”.



стресса у животных, не получавших гуанетидин, — на 52%, тогда как концентрация инсулина снижалась практически в такой же степени — на 16%. В результате величина К/И коэффициента существенно увеличилась — до 2.87 (в 1.67 раза). Повреждение СОЖ хотя и наблюдалось у такого же количества животных, но имело больший индекс поражения, величина которого составила 1.98.

Вследствие указанных изменений по отношению к их значениям у контрольных животных относительная масса надпочечников была выше на 64%, таковая тимуса и селезенки — ниже на 35 и 33%. Уровень кортикостерона в крови был больше на 101%, инсулина — меньше на 30%, поэтому значение К/И коэффициента было существенно выше — в 2.87 раза. Частота поражения СОЖ была больше на 80%, как и тяжесть и индекс поражения.

По сравнению с аналогичными показателями у крыс группы “Стресс” относительная масса надпочечников была выше на 33%, селезенки — ниже на 19%, тимуса — такой же. Сывороточное содержание кортикостерона было больше на 61%, инсу-

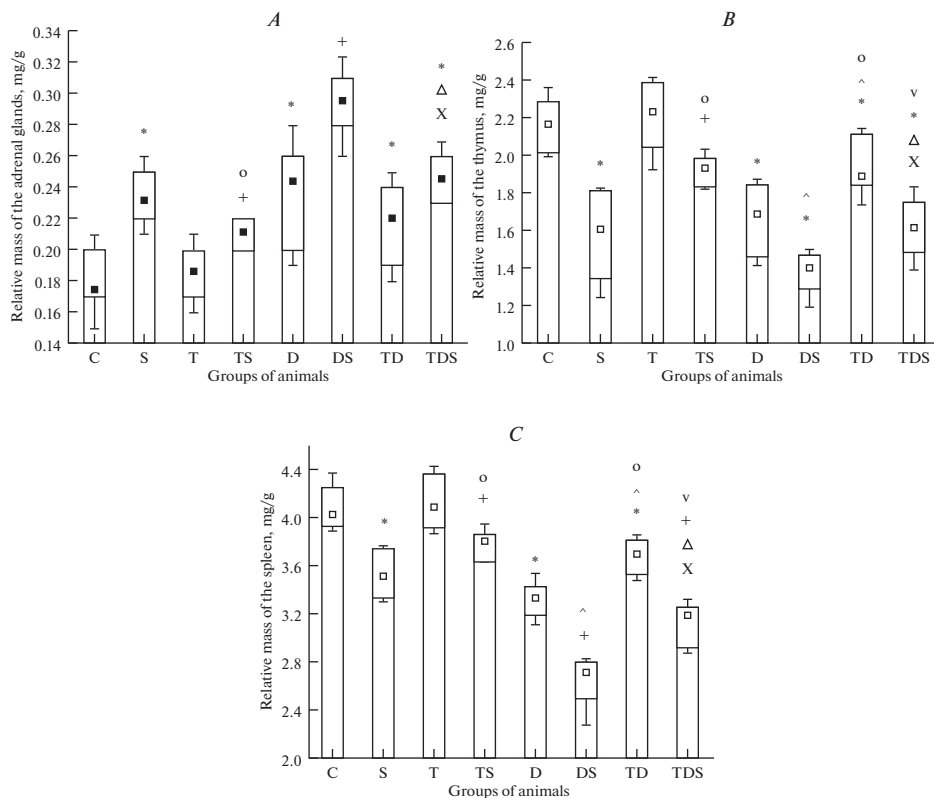


Рис. 2. Изменения относительной массы надпочечников (A), тимуса (B) и селезенки (C) при стрессе у крыс, получавших гуанетидин и(или) L-тироксин. Обозначения те же, что на рис. 1.

Fig. 2. Changes of relative mass of the adrenal glands (A), thymus (B) and spleen (C) under stress in rats injected with guanethidine and (or) L-thyroxine. The designations are the same as in Fig. 1.

лина — меньше на 11%. Вследствие этого величина К/И коэффициента была выше в 1.67 раза. Тяжесть и частота поражения СОЖ были такими же, однако индекс поражения был больше — в 1.46 раза.

Физическая выносливость животных группы “Десимпатизация + стресс” не повышалась, как в группе “Стресс” (по отношению к группе “Десимпатизация”). Горизонтальная двигательная активность в отличие от крыс, перенесших стресс без введения гуанетидина, также не возрастала, а, напротив, падала: общая дистанция перемещения в тесте “открытое поле” снижалась на 36% (по отношению к группе “Десимпатизация”). Вертикальная локомоторная активность, в отличие от животных группы “Стресс” не уменьшалась, а имела лишь тенденцию к снижению. Как и в указанной группе сравнения, не наблюдалось изменения структуры поведения: соотношение дистанций перемещения крыс и продолжительности их пребывания в разных зонах “открытого поля” не изменялось.

Максимальная скорость движения животных была такой же, как в группе “Десимпатизация”, т.е. не имела тенденции к увеличению, как у крыс группы “Стресс”.

Исследовательская активность симпатэктомированных животных после стресса снижалась, как это имело место и в группе “Стресс”, однако несколько более значительно: общая длительность замирания и таковая в периферической зоне повы-

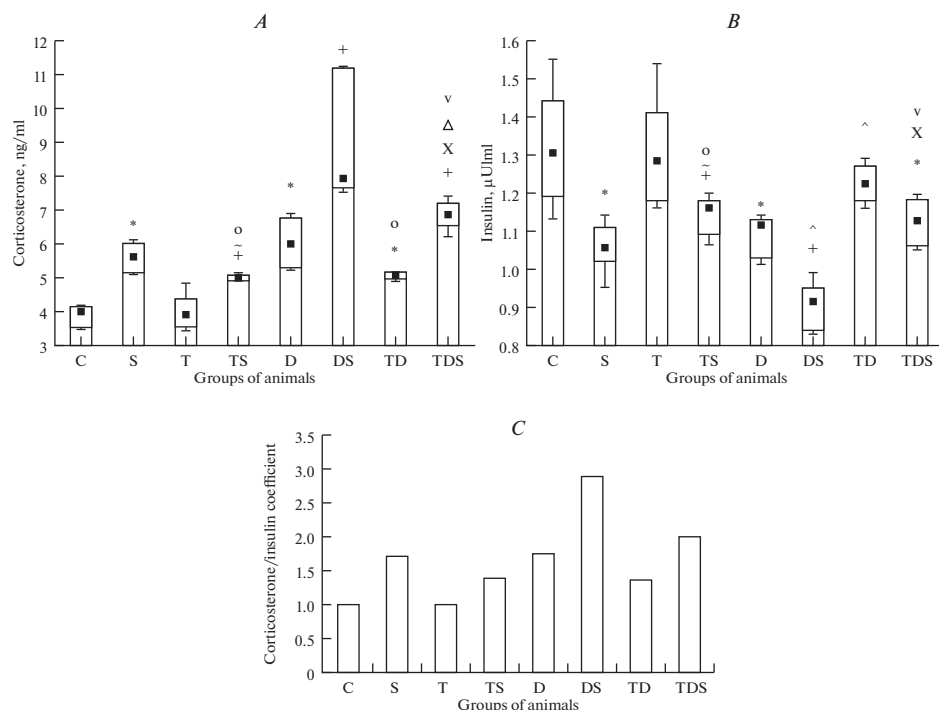


Рис. 3. Влияние десимпатизации на изменения сыровоточного содержания кортикостерона (A), инсулина (B) и кортикостерон/инсулинового коэффициента (C) в условиях стресса без и на фоне введения малых доз L-тироксина. Обозначения те же, что на рис. 1.

Fig. 3. The effect of desympatization of sympathetic nervous influences on the changes of serum corticosterone (A), insulin (B) levels and corticosteroid/insulin coefficient (C) under stress conditions with and without injection of small doses of L-thyroxine. The designations are the same as in Fig. 1.

шались на 34 и 46%, число входов в центральную зону уменьшалось на 40%. Параллельный индекс становился положительным (0.10), хотя и не отличался статистически достоверно от его величины в группе “Десимпатизация”. Остальные изученные нами параметры поведенческой активности крыс были такими же, как у симпатэктомированных животных.

В результате отмеченных сдвигов по отношению к их значениям у контрольных крыс были ниже: время удержания животных на вращающемся валике ротарода на 76%, общая дистанция перемещения на 58%, максимальная скорость движения на 29%, число входов в центр на 72%, количество вертикальных стоек на 52%. Дистанция перемещения и продолжительность пребывания крыс на периферии и в центре поля, латентный период входа в центр были такими же, как в контроле. Общая длительность замирания и таковая в периферической зоне были выше — на 67 и 77%, как и параллельный индекс — на 0.26. Время неподвижности крыс в центре поля имело тенденцию к увеличению.

По сравнению с величиной аналогичных параметров в группе “Стресс” у десимпатизированных животных, подвергнутых стрессу, были ниже: время удержания крыс на валике ротарода на 111%, общая дистанция и максимальная скорость пере-

Таблица 1. Повреждение СОЖ при стрессе у крыс, подвергнутых химической десимпатизации, без и на фоне введения L-тироксина**Table 1.** Damage to the gastric mucosa under stress in rats subjected to chemical desympatisation without and with injected of L-thyroxine

Группы животных Groups of animal	Частота поражения, % Damage frequency, % (<i>n</i> = 30)	Тяжесть поражения, баллы Damage severity, scores (<i>n</i> = 10)	Индекс поражения Damage index (<i>n</i> = 30)
1. Контроль Control	10	1 у 10%	0.01
2. Стресс Stress	80	1 у 20%; 2 у 30%; 3 у 30%	1.36
<i>p</i> 1–2	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.01	
3. Тироксин Thyroxine	10	1 у 10%	0.01
<i>p</i> 1–3	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	
4. Тироксин + стресс Thyroxine + stress	30	1 у 20%; 2 у 10%	0.12
<i>p</i> 3–4	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	
<i>p</i> 1–4	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	
<i>p</i> 2–4	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.05	
5. Десимпатизация Desympatisation	40	1 у 20%; 2 у 20%	0.24
<i>p</i> 1–5	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	
6. Десимпатизация + стресс Desympatisation + stress	90	2 у 50%; 3 у 40%	1.98
<i>p</i> 5–6	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.01	
<i>p</i> 1–6	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.01	
<i>p</i> 2–6	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	
7. Тироксин + десимпатизация Thyroxine + desympatisation	30	1 у 20%; 2 у 10%	0.12
<i>p</i> 3–7	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	
<i>p</i> 5–7	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	
<i>p</i> 1–7	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	
8. Тироксин + десимпатизация + стресс Thyroxine + desympatisation + stress	50	1 у 10%; 2 у 30%; 3 у 10%	0.5
<i>p</i> 7–8	0.05 < <i>p</i> < 0.1	<i>p</i> > 0.05	
<i>p</i> 1–8	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.05	
<i>p</i> 4–8	0.05 < <i>p</i> < 0.1	<i>p</i> > 0.05	
<i>p</i> 6–8	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.01	
<i>p</i> 2–8	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	

Здесь и в табл. 2–3: *p* – обозначение достоверности различий, *n* – число животных в группе.Here and in the tables 2–3: *p* – difference between statistical significance, *n* – number of animals in the group.

Таблица 2. Изменение физической выносливости и двигательной активности животных с дефицитом симпатических нервных влияний после стресса без и на фоне введения малых доз L-тироксина
Table 2. Changes in physical endurance and locomotor activity of animals with a deficit of sympathetic nervous influences under stress without and with injection of L-thyroxine in small doses

Группы животных Groups of animal	Время удержания на валике рогахода, с Retention time on the rotating roller of the rotarod, s	Общая дистанция, м Total distance, m	Дистанция на периферии, % Distance in the periphery, %	Дистанция в центре, % Distance in the center, %	Максимальная скорость передвижения, см/с Maximum speed, cm/s	Количество вертикальных скачков Number of tacks
1. Контроль Control	8.5 (5.0; 9.0)	14.18 (12.66; 16.12)	81.30 (73.19; 86.07)	18.71 (13.93; 26.81)	57.62 (45.44; 90.27)	11.5 (9.00; 14.00)
2. Стресс Stress	11.5 (10.0; 14.0)	18.27 (17.57; 19.53)	82.11 (72.66; 83.52)	17.90 (16.48; 27.34)	95.22 (85.71; 111.1)	6.5 (5.0; 8.0)
3. Тироксин (Thyroxine)	$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$0.05 < p < 0.1$	$p < 0.05$
4. Тироксин + стресс Thyroxine + stress	10.5 (10.0; 11.0)	20.66 (20.16; 20.98)	56.40 (40.11; 64.18)	43.60 (35.82; 59.89)	91.85 (65.78; 97.56)	15.5 (13.0; 19.0)
5. Десимпатизация Desympatization	$p < 0.05$	$p < 0.01$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p > 0.05$	$p < 0.05$
6. Десимпатизация + стресс Desympatization + stress	11.0 (9.0; 12.0)	19.74 (18.28; 20.33)	54.57 (44.08; 55.11)	45.44 (44.89; 55.92)	84.58 (56.17; 115.15)	10.5 (9.0; 14.0)
7. Тироксин + десимпатизация Thyroxine + desympatization	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$0.05 < p < 0.1$
8. Тироксин + десимпатизация + стресс Thyroxine + desympatization + stress	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
9. Тироксин + стресс Thyroxine + stress	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p > 0.05$	$p < 0.05$
10. Тироксин + стресс + стресс Thyroxine + stress + stress	4.0 (3.0; 6.0)	11.06 (9.30; 13.87)	83.73 (76.29; 90.63)	16.27 (9.37; 23.71)	47.75 (40.33; 63.11)	9.5 (7.0; 11.0)
11. Тироксин + стресс + стресс + стресс Thyroxine + stress + stress + stress	$p < 0.05$	$p < 0.1$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
12. Тироксин + стресс + стресс + стресс + стресс Thyroxine + stress + stress + stress + stress	2.0 (0.0; 3.0)	6.02 (5.12; 7.47)	86.26 (82.11; 90.25)	13.75 (9.75; 17.89)	40.79 (30.07; 48.33)	5.5 (5.0; 7.0)
13. Тироксин + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс Thyroxine + stress + stress + stress + stress + stress	$p > 0.05$	$p < 0.01$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$0.05 < p < 0.1$
14. Тироксин + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс Thyroxine + stress + stress + stress + stress + stress + stress	$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$
15. Тироксин + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс Thyroxine + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress	$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p < 0.01$	$p > 0.05$
16. Тироксин + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс Thyroxine + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress	6.5 (6.0; 8.0)	15.08 (13.49; 16.22)	70.63 (65.12; 74.27)	29.38 (25.73; 34.88)	61.72 (53.15; 74.29)	13.5 (10.00; 16.00)
17. Тироксин + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс Thyroxine + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress	$p < 0.01$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p > 0.05$
18. Тироксин + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс Thyroxine + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress	$p < 0.05$	$p < 0.01$	$0.05 < p < 0.1$	$0.05 < p < 0.1$	$p > 0.05$	$0.05 < p < 0.1$
19. Тироксин + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс Thyroxine + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
20. Тироксин + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс Thyroxine + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress	7.5 (6.0; 10.0)	11.79 (10.71; 14.84)	76.19 (70.18; 82.21)	23.81 (17.79; 29.82)	57.20 (48.32; 68.29)	10.0 (8.0; 14.0)
21. Тироксин + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс Thyroxine + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress	$p > 0.05$	$0.05 < p < 0.1$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
22. Тироксин + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс Thyroxine + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
23. Тироксин + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс Thyroxine + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress	$p < 0.05$	$p < 0.01$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$
24. Тироксин + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс Thyroxine + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress	$p > 0.05$	$p < 0.01$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$
25. Тироксин + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс + стресс Thyroxine + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress + stress	$p < 0.05$	$p < 0.01$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p < 0.05$	$0.05 < p < 0.1$

Здесь и в табл. 3: $n = 6$

Таблица 3. Изменение исследовательской активности животных, перенесших химическую десимпатизацию, после стресса без и на фоне введения малых доз L-тироксина
Table 3. Changes in the research activity of animals under chemical desympatization after stress without and with injected small doses of L-thyroxine

Группы животных Groups of animal	Время пребывания на периферии, % Time in periphery, %	Время пребывания в центре, % Time in center, %	Общая длительность замирания, % Resting Time, %	Длительность замирания на периферии, % Resting Time in periphery, %	Длительность замирания в центре, % Resting Time in center, %	Число входов в центр Entries in the center	Латентный период входа в центр, с Latency entrance to the center, s	Параллельный индекс Parallel Index
1. Контроль Control	85.89 (78.97; 93.25)	14.11 (6.75; 21.03)	43.63 (35.70; 49.29)	38.60 (34.67; 49.19)	1.86 (1.03; 8.28)	12.5 (9.0; 18.0)	9.81 (4.85; 11.48)	-0.16 (-0.34; -0.11)
2. Стресс Stress	88.43 (79.79; 92.21)	11.57 (7.79; 20.21)	64.93 (61.75; 70.84)	63.81 (61.09; 67.49)	1.22 (1.00; 3.35)	7.5 (5.0; 12.0)	14.55 (11.55; 19.35)	0.03 (-0.03; 0.06)
<i>p</i> 1–2	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> > 0.05	0.05 < <i>p</i> < 0.1	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05
3. Тироксин Thyroxine	55.29 (44.53; 68.05)	44.72 (31.95; 55.47)	50.80 (46.83; 57.12)	32.70 (24.54; 40.20)	19.14 (9.76; 23.44)	20.5 (17.0; 23.0)	3.25 (0.42; 7.97)	-0.40 (-0.59; -0.35)
<i>p</i> 1–3	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> < 0.05	0.05 < <i>p</i> < 0.1	<i>p</i> < 0.1	<i>p</i> < 0.01
4. Тироксин + стресс Thyroxine + stress	60.12 (53.58; 69.50)	39.88 (30.50; 46.42)	58.60 (48.34; 73.43)	32.56 (27.30; 39.21)	17.96 (12.60; 29.74)	15.5 (12.0; 23.0)	4.62 (1.18; 7.50)	-0.30 (-0.36; -0.14)
<i>p</i> 3–4	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05
<i>p</i> 1–4	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> < 0.05	0.05 < <i>p</i> < 0.1	0.05 < <i>p</i> < 0.1	<i>p</i> > 0.05
<i>p</i> 2–4	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.05
5. Десимпатизация Desympatization	81.77 (74.12; 92.19)	18.24 (7.81; 25.88)	57.96 (50.52; 63.73)	50.44 (43.45; 57.10)	7.16 (6.27; 9.13)	8.5 (7.0; 11.0)	10.98 (8.36; 13.02)	-0.01 (-0.05; 0.03)
<i>p</i> 1–5	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	0.05 < <i>p</i> < 0.1	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	0.05 < <i>p</i> < 0.1

Таблица 3. Окончание

Группы животных Groups of animal	Время пребывания на периферии, % Time in periphery, %	Время пребывания в центре, % Time in center, %	Общая длительность замирания, % Resting Time, %	Длительность замирания на периферии, % Resting Time in periphery, %	Длительность замирания в центре, % Resting Time in center, %	Число входов в центр Entries in the center	Латентный период входа в центр, с Latency entrance to the center, s	Параллельный индекс Parallel Index
6. Десимпатизация + стресс Desympatization + stress	86.89 (83.54; 91.39)	13.11 (8.61; 16.46)	72.86 (66.21; 79.09)	66.75 (58.96; 68.20)	8.30 (5.38; 12.34)	3.50 (2.0; 5.0)	13.77 (9.17; 18.35)	0.10 (0.1; 0.16)
<i>p</i> 5–6	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05
<i>p</i> 1–6	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.01	0.05 < <i>p</i> < 0.1	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> < 0.05
<i>p</i> 2–6	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05
7. Тироксин + десимпатизация Thyroxine + desympatization	72.75 (69.74; 76.93)	27.26 (23.07; 30.26)	45.10 (42.59; 53.68)	37.67 (33.03; 38.18)	10.66 (7.34; 16.32)	13.0 (10.0; 15.0)	6.26 (5.25; 8.24)	–0.36 (–0.43; –0.27)
<i>p</i> 3–7	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> > 0.05
<i>p</i> 5–7	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	0.05 < <i>p</i> < 0.1	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05
<i>p</i> 1–7	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> < 0.05
8. Тироксин + десимпатизация + стресс Thyroxine + desympatization + stress	73.81 (69.57; 82.38)	26.20 (17.62; 30.43)	56.97 (51.55; 61.85)	44.55 (39.27; 53.04)	11.18 (8.73; 13.29)	9.5 (8.0; 11.0)	7.30 (6.24; 8.22)	–0.25 (–0.31; –0.22)
<i>p</i> 7–8	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> > 0.05	0.05 < <i>p</i> < 0.1	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05
<i>p</i> 1–8	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05
<i>p</i> 4–8	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> > 0.05	0.05 < <i>p</i> < 0.1	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> > 0.05
<i>p</i> 6–8	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.01
<i>p</i> 2–8	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> < 0.05	<i>p</i> > 0.05	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.01

мещения на 87 и 74%, число входов в центральную зону на 32%. Длительность замирания в центре “открытого поля” была, напротив, больше — в 6.8 раза. Остальные параметры двигательной и исследовательской активности животных были такими же.

Введение малых доз L-тироксина симпатэктомированным крысам привело к повышению содержания ЙТГ в крови до его величины в группах “Тироксин” и “Контроль”: по сравнению с ее значением в группе “Десимпатизация” концентрация T_3 увеличивалась на 15%, T_4 на 17%, T_3 св на 24%, T_4 св на 44%. Содержание ТТГ не изменялось. Следовательно, введение L-тироксина нормализует функцию щитовидной железы у десимпатизированных животных.

Относительная масса тимуса и селезенки у крыс группы “Десимпатизация + тироксин” несколько возрастала по отношению к ее величине в группе “Десимпатизация” — на 6 и 9%, надпочечников — не изменялась. Сывороточный уровень кортикостерона снижался на 22%, а содержание инсулина повышалось на 8%, поэтому значение К/И коэффициента падало — в 1.28 раза. Повреждение СОЖ было таким же.

В результате описанных сдвигов по отношению к группе “Тироксин” относительная масса тимуса и селезенки была меньше на 16 и 10%. Сывороточный уровень кортикостерона был выше на 29%, инсулина — таким же, вследствие чего значение К/И коэффициента было больше в 1.39 раза. Параметры повреждения СОЖ были такими же.

По сравнению с величиной аналогичных показателей в группе “Контроль” относительная масса надпочечников была выше на 22%, тимуса и селезенки — меньше на 13 и 8%. Уровень кортикостерона в крови был больше на 27%, а инсулина — таким же. Величина К/И коэффициента была выше в 1.36 раза.

Введение L-тироксина десимпатизированным крысам несколько повысило их физическую выносливость, двигательную и исследовательскую активность: по сравнению с их значениями в группе “Десимпатизация” время удержания животных на вращающемся валике ротарода увеличилось на 29%, общая дистанция перемещения на 28%. Вертикальная локомоторная активность (количество стоек) и дистанция движения в центре имели тенденцию к увеличению, расстояние перемещения на периферии — к укорочению.

Число входов в центральную зону возросло на 36% (по сравнению с группой “Десимпатизация”). Латентный период входа в центр и длительность замирания в периферической зоне, напротив, снизились на 48 и 33%. Значение параллельного индекса стало более отрицательным и составило -0.36 , вследствие чего он был меньше, чем в группе “Десимпатизация”, на 0.35 . Это подтверждает стимуляцию интенсивности исследовательских реакций у десимпатизированных крыс под влиянием L-тироксина.

По отношению к их значениям в группе “Тироксин” были меньшими: время удержания животных на валике ротарода на 48%, общая дистанция перемещения на 40%, максимальная скорость движения на 52%, расстояние перемещения в центральной зоне и продолжительность пребывания в ней на 76 и 124%, как и число входов в центр — на 60%. Дистанция движения в периферической зоне и время пребывания в ней, напротив, были большими — на 18 и 21%. Остальные параметры двигательной и исследовательской активности крыс были такими же.

По сравнению с их величинами у контрольных животных, у симпатэктомированных крыс, получавших L-тироксин, время пребывания и неподвижности в центре “открытого поля” было больше на 93% и в 5.7 раза, а продолжительность нахождения животных на периферии, напротив, меньше на 15%, как и параллельный индекс — на 0.20.

Введение L-тироксина крысам с дефицитом симпатических влияний оказало стресс-протекторное действие, как это имело место и у животных с интактной симпатической нервной системой.

У десимпатизированных крыс, получавших L-тироксин и подвергнутых стрессу, уровень ЙТГ в крови не снижался, как после стресса у симпатэктомированных животных. По отношению к его значению в группе “Тироксин + десимпатизация” сывороточное содержание T_4 и T_3 св незначительно повышалось — на 14 и 8%. Концентрация T_3 и T_4 св не изменялась. Уровень ТТГ в крови, в отличие от указанной группы сравнения, падал на 39%. Вследствие описанных изменений, по отношению к группе “Контроль” содержание T_4 в крови было больше на 16%, остальных фракций ЙТГ — таким же. По сравнению с ее величиной в группе “Десимпатизация + стресс”, сывороточная концентрация ЙТГ была выше: T_3 на 27%, T_4 и T_3 св на 35%, T_4 св на 52%. Содержание ТТГ в крови, напротив, было ниже на 48%. По отношению к его значениям в группах “Тироксин + стресс” и “Стресс”, сывороточный уровень T_3 был меньше на 7 и 13%, T_3 св на 13 и 26%. Концентрация T_4 св в крови была ниже только по сравнению с таковой в группе “Стресс” — на 17%. Содержание T_4 и ТТГ было таким же, как в обеих указанных группах сравнения.

В отличие от десимпатизированных крыс, подвергнутых стрессу без введения L-тироксина, относительная масса надпочечников не повышалась (по сравнению с группой “Тироксин + десимпатизация”). Относительная масса тимуса и селезенки снижалась в той же мере — на 12 и 13%. Концентрация кортикостерона в крови возрастала менее значительно — на 44%, а сывороточное содержание инсулина уменьшалось менее существенно — только на 8%. Поэтому К/И коэффициент повышался всего в 1.46 раза. Это свидетельствует о снижении напряжения компенсаторных процессов при стрессе у десимпатизированных животных под влиянием L-тироксина. Повреждение СОЖ характеризовалось меньшими частотой и тяжестью.

По отношению к их величинам в группе “Контроль”, относительная масса надпочечников и уровень кортикостерона в крови были больше на 36 и 71%, относительная масса тимуса, селезенки и содержание инсулина — ниже на 25, 21 и 14%. Величина К/И коэффициента была выше в 1.99 раза. Частота, тяжесть и индекс повреждения СОЖ были большими.

По сравнению с их значениями в группе “Тироксин + стресс”, относительная масса надпочечников и сывороточная концентрация кортикостерона были выше на 16 и 46%, относительная масса тимуса и селезенки — ниже на 14 и 15%, содержание инсулина — таким же. Значение К/И коэффициента и индекс повреждения СОЖ были больше в 1.42 и 4.17 раза.

По отношению к их величине в группе “Десимпатизация + стресс”, относительная масса надпочечников и содержание кортикостерона в крови были меньше на 28 и 30%, относительная масса тимуса, селезенки и сывороточный уровень инсулина — больше на 10, 12 и 16%. Величина К/И коэффициента была ниже в 1.44 раза. Частота повреждения СОЖ была меньше — на 40%, как и тяжесть, и индекс поражения (в 3.96 раза).

По сравнению с таковыми в группе “Стресс”, относительная масса селезенки и концентрация кортикостерона были выше на 7 и 31%. Значение К/И коэффициента было больше в 1.16 раза. Остальные изученные нами параметры стресс-реакции не отличались от их величины в указанной группе сравнения.

В отличие от группы “Десимпатизация + стресс” общая дистанция перемещения, число входов в центр поля, вертикальная двигательная активность не уменьшались. Общая длительность неподвижности и таковая на периферии, хотя и увеличивались, однако менее существенно, чем после стресса у крыс с дефицитом симпатических влияний, которым не вводили L-тироксин, — на 29 и 17%. Число

входов в центральную зону не падало, как у животных этой группы сравнения, а имело только тенденцию к уменьшению. Другие показатели физической выносливости, локомоторной и исследовательской активности животных не отличались от их значений в группе “Тироксин + десимпатизация”, как и параллельный индекс, который также имел отрицательное значение (-0.25).

В результате по отношению к их величинам в группе “Десимпатизация + стресс” были большими: общая дистанция движения на 41%, расстояние и продолжительность нахождения в центральной зоне “отрытого поля” на 54 и 93%, максимальная скорость перемещения на 28%, количество вертикальных стоек на 39%, число входов в центр на 48%. Дистанция перемещения и продолжительность нахождения крыс на периферии поля, напротив, были ниже — на 12 и 15%, как и общая длительность замирания, таковая в периферической зоне, латентный период входа в центр и параллельный индекс — на 36, 62, 72 и 0.15.

По сравнению с их величинами в группах “Стресс” и “Тироксин + стресс” были ниже: время удержания животных на вращающемся валике родарода — на 47 и 41%, общая дистанция перемещения — на 46 и 56%. По отношению к их значениям в группе “Тироксин + стресс” расстояние движения и продолжительность пребывания крыс на периферии поля были больше на 27 и 16%, а дистанция и время нахождения в центре, напротив, меньше — на 116 и 79%, как и число входов в центр “открытого поля” — на 48%. По сравнению с их величинами в группе “Стресс” были меньшими: время пребывания животных на периферии — на 17%, максимальная скорость перемещения — на 46%, общая длительность замирания и таковая в периферической зоне — на 20 и 50%, латентный период входа в центр — на 74%, параллельный индекс — на 0.28. Продолжительность нахождения и длительность замирания крыс в центральной зоне поля по отношению к их значениям в группе “Стресс”, напротив, были больше — на 104% и в 9.2 раза.

По сравнению с их величинами в контроле время нахождения животных на периферии “открытого поля” в группе “Тироксин + десимпатизация + стресс” было меньше на 14%, а время нахождения их в центральной зоне, наоборот, больше — на 86%, как и общая длительность неподвижности, и таковая в центре — на 31% и в 6.0 раз.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

“Выключение” симпатических нервных влияний, достигнутое в наших опытах введением гуанетидина, подавляет функцию щитовидной железы, увеличивает относительную массу надпочечников, концентрацию кортикостерона в крови, снижает относительную массу тимуса и селезенки, сывороточное содержание инсулина и физическую выносливость животных, определяет поражение СОЖ с более высоким индексом. Высокая величина К/И коэффициента (1.74) свидетельствует о существенном напряжении компенсаторных механизмов у таких крыс, степень которого практически сопоставима с таковой при стрессе (1.72).

Уменьшение уровня ЙТГ в крови после введения симпатолитиков было обнаружено и другими авторами [28] и может быть связано с морфометрическими (снижение массы щитовидной железы [29]) и функциональными (увеличение периода полураспада изотопов йода [29] и захвата их щитовидной железой [30, 31]) изменениям.

Возрастание относительной массы надпочечников после фармакологической симпатэктомии согласуется с данными, полученными Vavřínová с соавт. [32], и может являться результатом показанных другими исследователями: 1) стимуляции экспрессии генов ферментов, участвующих в биосинтезе катехоламинов в мозговом веществе надпочечников, приводящей к возрастанию уровня адреналина и ме-

тадреналина в плазме крови [32]; 2) увеличением площади среза коркового и мозгового вещества надпочечников [33].

Падение относительной массы тимуса и селезенки после устранения симпатических нервных влияний было установлено и другими авторами [34], и, вероятно, обусловлено показанными ими: 1) стимуляцией апоптоза в клетках тимуса в этих условиях [34]; 2) атрофией тимуса (опустошение коркового вещества и инверсия слоев) [35] и селезенки [36] под действием глюкокортикоидов, повышение уровня которых в крови обнаружено в наших опытах. В свою очередь, это может быть вызвано ростом относительной массы надпочечников, обнаруженным нами.

Падение сывороточного содержания инсулина, возможно, обусловлено показанным другими исследователями уменьшением экспрессии гена этого гормона в островках поджелудочной железы у животных, подвергнутых фармакологической симпатэктомии [37].

Повреждение СОЖ может быть связано с тем, что химическая десимпатизация вызывает: 1) вазоконстрикцию в СОЖ [38]; 2) существенное повышение экспрессии генов индуцибельной NO-синтазы и циклооксигеназы-2, содержания в сыворотке крови факторов, играющих роль в развитии патологических процессов в СОЖ – интерлейкинов 6 и 12, фактора некроза опухоли- α ; мотилина и субстанции P, стимулирующих секрецию желудочного сока, и, напротив, снижение уровня соматостатина и вазоактивного интестинального пептида, обладающих ингибирующим эффектом на последний процесс [39]; 3) активацию ПОЛ (рост концентрации малонового диальдегида), связанную с падением активности супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы, а также концентрации NO в СОЖ [39].

Падение двигательной активности и физической выносливости может являться следствием изменений, развивающихся у животных с дефицитом симпатических нервных влияний. Возможные причины – изменения, развивающиеся в скелетных мышцах после симпатэктомии:

1) изменение интенсивности протеолиза: гуанетидин (подкожно 100 мг/кг) – увеличение общей и кальций-зависимой протеолитической активности в камбаловидной мышце крыс после 2 дней, и, напротив, их снижение после 4 дней. Эти же виды активности в длинном разгибателе пальцев, как и интенсивность АТФ-зависимого протеолиза в обоих указанных мышцах уменьшались во все указанные сроки исследования [40];

2) снижение интенсивности гликогенолиза: резерпин (внутривенно 5 мг/кг) или гуанетидин (внутривенно 35 мг/кг) – уменьшение лактациемии и интенсивности гликогенолиза в четырехглавой мышце бедра крыс, индуцированных фентоламином (внутривенно 25 мг/кг) [41].

3) структурные изменения и нарушение энергообеспечения сократительного акта: гуанетидин (подкожно 200 мг/кг) – ограничение увеличения константы скорости поглощения глюкозы в камбаловидных мышцах и длинных разгибателях пальцев, белых и красных мышечных волокнах четырехглавой и икроножной мышц крыс при электростимуляции вентромедиального ядра гипоталамуса [42]; резерпин (подкожно крысам в течение 3 дней в конечной дозе 1 мг/кг) – значительное снижение диаметра мышечных волокон, экспрессии миогенина, маркеров митохондриальной функции, изменение длины саркомеров, гетерогенность и повреждения в межфибрилярном пространстве и субсарколеммальных митохондриях, расширение и деформация саркоплазматического ретикулума в икроножных мышцах, значительное снижение их массы [43, 44];

4) изменение экспрессии маркеров воспалительной реакции и оксидативного стресса: резерпин (подкожно 1 мг/кг) – увеличение таковой NLRP3 (nucleotide oligomerization domain like receptor 3) (участвует в воспалении, оксидативном стрессе и клеточной гибели через активацию каспазы 1 и каспазы 5) и, напротив, умень-

шение экспрессии циклооксигеназы-1 (изоформа фермента, участвующая в регуляции микроциркуляции, базального обмена и в разных этапах миогенеза) и сиртуина 3 (участвует в регуляции окислительно-восстановительных реакций) в икроножных мышцах. Развитие оксидативного стресса может быть связано со снижением экспрессии антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы и каталазы), а также с падением уровня общих тиолов [43].

Следовательно, дефицит симпатических нервных влияний предупреждает активацию функции щитовидной железы при стрессе и, вместе с тем, определяет более выраженный рост концентрации кортикостерона в крови, снижение физической выносливости, горизонтальной двигательной и исследовательской активности крыс, отягощает повреждение СОЖ в этих условиях. Химическая десимпатизация не влияет на изменение относительной массы надпочечников, селезенки и уровня инсулина в крови при стрессе. Однако по сравнению с их величиной у животных с интактной нервной системой, подвергнутых стрессу, относительная масса надпочечников была больше, тогда как относительная масса селезенки и концентрация инсулина в крови, напротив, меньше. Более выраженной общей реакции организма у подвергнутых стрессу животных со сниженным уровнем адренергических влияний соответствовал более низкий по сравнению с таковым в группе “Стресс” уровень ЙТГ в крови. Существенная величина К/И коэффициента (2.87) у крыс группы “Десимпатизация + стресс” свидетельствует о более значительном напряжении компенсаторных механизмов, чем у крыс, перенесших стресс без введения гуанетидина (1.72).

Введение L-тироксина в малых дозах десимпатизированным крысам ограничивает стимуляцию тиреоидной функции, повышение сывороточного уровня кортикостерона и К/И коэффициента, снижение относительной массы тимуса и содержания инсулина в крови, предупреждает рост относительной массы надпочечников и повреждение СОЖ, падение вертикальной двигательной активности животных при стрессе. L-тироксин не влияет на изменение относительной массы селезенки при стрессе, однако обеспечивает ее более высокое значение по сравнению с таковым в группе “Десимпатизация + стресс”. L-тироксин, хотя и предупреждает рост физической выносливости, горизонтальной и исследовательской активности крыс при стрессе, обеспечивает их более высокий уровень по сравнению с таковым у животных, не получавших указанный препарат и подвергнутых стрессу. Меньшей напряженности общего адаптационного синдрома в группе “Тироксин + десимпатизация + стресс” соответствовала более высокая концентрация ЙТГ в крови, чем в группе “Десимпатизация + стресс”. Следовательно, по сравнению с таковым у крыс с интактной симпатической нервной системой, у которых стресс сопровождался более существенной активацией тиреоидной функции, стресс-протекторный эффект тироксина у животных с дефицитом симпатических нервных влияний был выражен в меньшей степени.

Прямая зависимость между уровнем йодтиронинов в крови и резистентностью организма была обнаружена и в условиях воздействия других стрессоров, в том числе и антагонистических (холодового и теплового) [45]. В настоящей работе впервые установлено, что химическая десимпатизация ограничивает выраженность защитного эффекта малых доз L-тироксина при стрессе, но не “выключает” его полностью.

Полученные данные свидетельствуют о функциональной взаимосвязи симпатoadреналовой и тиреоидной осей в процессах гормональной регуляции реакций общего адаптационного синдрома и указывают на то, что антистрессорный эффект ЙТГ частично опосредован катехоламинами, но в значительно большей мере определяется прямым действием ЙТГ.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках задания темы ГПНИ Республики Беларусь на 2019–2020 гг. “Изучить возможность повышения устойчивости организма к стрессу за счет стимуляции центрального отдела антистресс-системы и снижения активности стресс-реализующей системы путем целенаправленной коррекции тиреоидного статуса (экспериментальное исследование)”.

ВКЛАД АВТОРОВ

Е.А. Гусакова — сбор данных, статистическая обработка, написание текста, оформление рукописи, работа с графическим материалом, редактирование и переработка рукописи. И.В. Городецкая — концепция и дизайн исследования, интерпретация результатов исследования, формулировка выводов, окончательное утверждение версии рукописи для публикации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Godoy L.D., Rossignoli M.T., Delfino-Pereira P., Garcia-Cairasco N., de Lima Umeoka E.H. A comprehensive overview on stress neurobiology: Basic concepts and clinical implications. *Front. Behav. Neurosci.* 12(3): 127. 2018. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00127>
2. Rizoli S.B., Jaja B.N., Di Battista A.P., Rhind S.G., Neto A.C., da Costa L., Inaba K., da Luz L.T., Nascimento B., Perez A., Baker A.J., de Oliveira Manoel A.L. Catecholamines as outcome markers in isolated traumatic brain injury: the COMA-TBI study. *Crit. Care.* 21(1): 37. 2017. <https://doi.org/10.1186/s13054-017-1620-6>
3. Мещанинов В.Н. Влияние нейромедиаторов на перекисное окисление липидов при иммобилизационном стресс-воздействии у крыс разного возраста. *Казанский мед. журн.* 96(5): 843–849. 2015. [Meshchaninov V.N. Effect of neurotransmitters on lipid peroxidation during immobilization stress in rats of different ages. *Kazan. Med. J.* 96(5): 843–849. 2015. (In Russ)]. <https://doi.org/10.17750/KMJ2015-843>
4. Feng Y., Feng Q., Lv Y., Song X., Qu H., Chen Y. The relationship between iron metabolism, stress hormones, and insulin resistance in gestational diabetes mellitus. *Nutr. Diabetes.* 10(1): 17. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41387-020-0122-9>
5. Булатецкий С.В., Бяловский Ю.Ю. Реакция систем организма на увеличенное сопротивление дыханию в группах с разным уровнем адаптационных возможностей. *Центр. науч. вестник.* 1(4): 7–11. 2016. [Bulatetsky C.V., Byalovsky Yu.Yu. Reaction of body systems to increased breathing resistance in groups with different levels of adaptive capabilities. *Central Sci. Bull.* 1(4): 7–11. 2016. (In Russ)].
6. Porta F., Bracht H., Weikert C., Beck M., Takala J., Brandt S., Hildebrand L.B., Jakob S.M. Effects of endotoxin and catecholamines on hepatic mitochondrial respiration. *Inflammation.* 32(5): 315–321. 2009. <https://doi.org/10.1007/s10753-009-9138-y>
7. Узбекова Н.Р., Хужамбердиев М.А., Таштемирова И.М. К вопросу о взаимосвязи активности симпатико-адреналовой системы и медиаторов иммунных нарушений у больных метаболическим синдромом. *Рос. кардиол. журн.* 107(3): 72–75. 2014. [Uzbekova N.R., Khuzhamberdiev M.A., Tashtemirova I.M. On the relationship between the activity of the sympathetic-adrenal system and mediators of immune disorders in patients with metabolic syndrome. *Russ. Cardiol. J.* 107(3): 72–75. 2014. (In Russ)].
8. Борщикова Т.И., Епифанцева Н.Н., Кан С.Л., Филимонов С.Н. Роль катехоламинов в развитии иммуносупрессии при тяжелой черепно-мозговой травме. *Медицина в Кузбассе.* 18(1): 5–10. 2019. [Borshchikova T.I., Epifantseva N.N., Kan S.L., Filimonov S.N. The role of catecholamines in the development of immunosuppression in severe traumatic brain injury. *Medicine in Kuzbass.* 18(1): 5–10. 2019. (In Russ)].
9. Barth E., Albuszies G., Baumgart K., Matejovic M., Wachter U., Vogt J., Calzia E. Glucose metabolism and catecholamines. *Crit. Care. Med.* 35: 508–518. 2007. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000278047.06965.20>
10. Jones B.J., Tan T., Bloom S.R. Minireview: Glucagon in stress and energy homeostasis. *Endocrinol.* 153(3): 1049–1054. 2012. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1979>

11. *Borelli M.I., Gagliardino J.J.* Possible modulatory effect of endogenous islet catecholamines on insulin secretion. *BMC Endocr. Disord.* 1(1): 1. 2001.
<https://doi.org/10.1186/1472-6823-1-1>
12. *Dienel G.A., Cruz N.F.* Aerobic glycolysis during brain activation: adrenergic regulation and influence of norepinephrine on astrocytic metabolism. *J. Neurochem.* 138(1): 14–52. 2016.
<https://doi.org/10.1111/jnc.13630>
13. *Bonora M., Patergnani S., Rimessi A., De Marchi E., Suski J.M., Bononi A., Giorgi C., Marchi S., Missiroli S., Poletti F., Wieckowski M. R., Pinton P.* ATP synthesis and storage. *Purinergic Signaling.* 8(3): 343–357. 2012.
<https://doi.org/10.1007/s11302-012-9305-8>
14. *Mullins G.R., Wang L., Raje V., Sherwood S.G., Grande R.C., Boroda S., Eaton J.M., Blancquaert S., Roger P.P., Leitinger N., Harris T.E.* Catecholamine-induced lipolysis causes mTOR complex dissociation and inhibits glucose uptake in adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111(49): 17450–17455. 2014.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1410530111>
15. *Adameova A., Abdellatif Y., Dhallaa N.S.* Role of the excessive amounts of circulating catecholamines and glucocorticoids in stress-induced heart disease. *Can. J. Physiol. Pharm.* 87(7): 493–514. 2009.
<https://doi.org/10.1139/y09-042>
16. *Чинкин А.С.* Соотношение адреналин:норадреналин и альфа-:бета-адренорецепторы в миокарде и адренергические хроно- и инотропные реакции при экстремальных состояниях и адаптации. *Наука и спорт: соврем. тенденции.* 4(3): 10–18. 2014. [*Chinkin A.S.* The ratio of epinephrine: norepinephrine and alpha-:beta-adrenoreceptors in the myocardium and adrenergic chrono- and inotropic reactions in extreme conditions and adaptation. *Science Sport: Current Trends.* 4(3): 10–18. 2014. (In Russ)].
17. *Коротаева Ю.В., Ноздрачев А.Д., Циркин В.И.* Влияние адреналина на сократимость и возбудимость миокарда правого желудочка крысы в зависимости от фаз эстрального цикла и наличия беременности. *Вестник Санкт-Петерб. Универ. Серия 3.* 4: 76–98. 2016. [*Korotaeva Yu. V., Nozdrachev A.D., Tsirkin V.I.* The effect of epinephrine on the contractility and excitability of the rat right ventricle myocardium depending on the phases of the estral cycle and the presence of pregnancy. *Bull. St. Petersburg Univer. Ser. 3.* 4: 76–98. 2016. (In Russ)].
18. *Божко А.П., Сухорукова Т.А.* Нарушения сократительной функции сердца и адренореактивность миокарда при стрессе в зависимости от уровня тиреоидных гормонов. *Пробл. эндокринол.* 35(6): 71–75. 1989. [*Bozhko A.P., Sukhorukova T.A.* Violations of the contractile function of the heart and adrenergic reactivity of the myocardium under stress, depending on the level of thyroid hormones. *Endocrinol. Problems.* 35(6): 71–75. 1989. (In Russ)].
19. *Божко А.П., Солодков А.П.* Предупреждение стрессорных изменений коронарной ауторегуляции, расширительного резерва коронарных сосудов и сократительной функции изолированного сердца малыми дозами тиреоидных гормонов. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 36(1): 30–35. 1990. [*Bozhko A.P., Solodkov A.P.* Prevention of stressful changes in coronary autoregulation, expansion reserve of coronary vessels and contractile function of an isolated heart with small doses of thyroid hormones. *Russ. J. Physiol.* 36(1): 30–35. 1990. (In Russ)].
<https://doi.org/10.14341/probl12471>
20. *Малышев И.Ю., Голубева Л.Ю., Божко А.П., Городецкая И.В.* Роль локальных стресс-лимитирующих систем миокарда в протекторном кардиальном эффекте малых доз тиреоидных гормонов при иммобилизационном стрессе у крыс. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 86(1): 62–67. 2000. [*Malyshev I.Yu., Golubeva L.Yu., Bozhko A.P., Gorodetskaya I.V.* The Role of local stress-limiting myocardial systems in the protective cardiac effect of small doses of thyroid hormones in immobilization stress in rats. *Russ. J. Physiol.* 86(1): 62–67. 2000. (In Russ)].
21. *Масюк Н.Ю., Городецкая И.В.* Анализ корреляционной связи концентрации йодсодержащих гормонов щитовидной железы в крови, интенсивности кариеса и активности перекисного окисления липидов в слюне крыс. *Вестн. ВГМУ.* 17 (3): 38–43. 2018. [*Masyuk N.Yu., Gorodetskaya I.V.* Analysis of the correlation between the concentration of iodine-containing thyroid hormones in the blood, the intensity of caries and the activity of lipid peroxidation in the saliva of rats. *Bull. VSMU.* 17 (3): 38–43. 2018. (In Russ)].
<https://doi.org/10.22263/2312-4156.2018.3.38>
22. *Городецкая И.В., Гусакова Е.А.* Влияние тиреоидного статуса на систему протеолиза при стрессе. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 99(12): 1378–1388. 2013. [*Gorodetskaya I.V., Gusakova Ye.A.* Effect of thyroid status on the proteolysis system under stress. *Russ. J. Physiol.*

- 99(12): 1378–1388. 2013. (In Russ)].
<https://doi.org/10.18097/PBMC20156103389>
23. Евдокимова О.В. Зависимость изменения экспрессии ранних генов c-fos и c-jun в миокарде крыс при кратковременном действии стрессоров от тиреоидного статуса организма. Журн. ГрГМУ .2 (46): 32–36. 2014. [Evdokimova O.V. Dependence of changes in the expression of early c-fos and c-jun genes in the myocardium of rats with a short-term effect of stressors on the thyroid status of the organism. J. GSMU. 2(46): 32–36. 2014. (In Russ)].
24. Гусакова Е.А., Городецкая И.В. Способ моделирования эмоционального стресса “дефицита времени”. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 105(4): 520–530. 2019. [Gusakova Ye.A., Gorodetskaya I.V. A method of modeling the emotional stress of “time deficiency”. Russ. J. Physiol. 105(4): 520–530. 2019. (In Russ)].
<https://doi.org/10.1134/S0869813919040010>
25. Whalen K., Feild C., Radhakrishnan R. Lippincott illustrated reviews: Pharmacology. Philadelphia. Wolters Kluwer. 2019.
26. Панин Л.Е. Биохимические механизмы стресса. Новосибирск. Наука. 1983. [Panin L. Biohimicheskie mehanizmyi stressa [Biochemical mechanisms of stress]. Novosibirsk. Nauka. 1983. (In Russ)].
27. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М. Гриф и К. 2012. [Mironov A.N. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovanij lekarstvennyh sredstv [Guidelines for the pre-clinical studies of drugs]. Moscow. Grief and K. 2012. (In Russ)].
28. Parikh R., Pilo B. Effect of chemical sympathectomy on serum levels of thyroid hormones and the biochemical profile of domestic pigeons. J. Auton. Nerv. Syst. 53(2-3): 87–94. 1995.
[https://doi.org/10.1016/0165-1838\(94\)00170-0](https://doi.org/10.1016/0165-1838(94)00170-0)
29. Coleoni A.H. Effects of the administration of catecholamine-depleting drugs on the thyroid function of the rat. Pharmacology. 8 (4–6): 300–310. 1972.
<https://doi.org/10.1159/000136346>
30. Goodman J.R., Florsheim W.H., Tempereau C.E. Reserpine and thyroid function. Exp. Biol. Med. 90 (1): 196–198. 1955.
31. Young J.B., Bürgi-Saville M.E., Bürgi U., Landsberg L. Sympathetic nervous system activity in rat thyroid: potential role in goitrogenesis. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 288(5): 861–867. 2005.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00292.2004>
32. Vavřínová A., Behuliak M., Bencze M., Vodička M., Ergang P., Vaněčková I., Zicha J. Sympathectomy-induced blood pressure reduction in adult normotensive and hypertensive rats is counteracted by enhanced cardiovascular sensitivity to vasoconstrictors. Hypertens. Res. 42: 1872–1882. 2019.
<https://doi.org/10.1038/s41440-019-0319-2>
33. Студеникина Т.М., Слuka Б.А., Богданова М.И. Морфологические изменения надпочечников крыс в условиях химической десимпатизации гуанетидином. Морфология. 117(3): 116. 2000. [Studenikina T.M., Sluka B.A., Bogdanova M.I. Morphological changes of the adrenal glands of rats in the conditions of a chemical desympathization by guanethidine. Morphology. 117(3): 116. 2000. (In Russ)].
34. Kendall M.D., Al-Shawaf A.A. Innervation of the rat thymus gland. Brain Behav. Immun. 5(1): 9–28. 1991.
[https://doi.org/10.1016/0889-1591\(91\)90004-t](https://doi.org/10.1016/0889-1591(91)90004-t)
35. Старская И.С., Гурова О.В., Засеева М.Д., Кудрявцев И.В., Полевщиков А.В. Роль апоптоза и экстралимфатической миграции в развитии атрофии тимуса при стрессе. Цитокины и воспаление. 13(4): 29–33. 2014. [Starskaya I.S., Gurova O.V., Zaseeva M.D., Kudryatsev I.V., Polevshchikov A.V. Role of apoptosis and extratim migration in the development of thymus atrophy under stress. Cytokines and Inflammation. 13(4): 29–33. 2014. (In Russ)].
36. Orzechowski A., Ostaszewski P., Wilczak J., Jank M., Bałasińska B., Wareski P., Fuller J. Rats with a glucocorticoid-induced catabolic state show symptoms of oxidative stress and spleen atrophy: the effects of age and recovery. J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med. 49(5): 256–263. 2002.
<https://doi.org/10.1046/j.1439-0442.2002.00443.x>
37. Kvist-Reimer M., Sundler F., Bo A. Effects of chemical sympathectomy by means of 6-hydroxydopamine on insulin secretion and islet morphology in alloxan-diabetic mice. Cell Tissue Res. 307 (2): 203–209. 2002.
<https://doi.org/10.1007/s00441-001-0496-5>

38. *Salim A.S.* Mechanism of reserpine-induced acute gastric mucosal injury in the rat: role of endogenous 5-hydroxytryptamine. *Clin. Sci.* 80(1): 59–64. 1991.
<https://doi.org/10.1042/cs0800059>
39. *Zhou Y.L., Wang R., Feng X., Zhao X.* Preventive effect of insect tea against reserpine-induced gastric ulcers in mice. *Exp. Ther. Med.* 8(4): 1318–1324. 2014.
<https://doi.org/10.3892/etm.2014.1859>
40. *Navegantes L.C., Resano N.M., Migliorini R.H., Kettelhut I.C.* Effect of guanethidine-induced adrenergic blockade on the different proteolytic systems in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 277(5): 883–889. 1999.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.1999.277.5.E883>
41. *Salvador R.A., April S.A., Lemberger L.* Phentolamine activation of glycogenolysis in rat skeletal muscle. *Biochem. Pharmacol.* 17(3): 395–402. 1968.
[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(68\)90249-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(68)90249-9)
42. *Minokoshi Y., Okano Y., Shimazu T.* Regulatory mechanism of the ventromedial hypothalamus in enhancing glucose uptake in skeletal muscles. *Brain Res.* 649(1–2): 343–347. 1994.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91085-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91085-5)
43. *Favero G., Trapletti V., Bonomini F., Stacchiotti A., Lavazza A., Rodella L.F., Rezzani R.* Oral supplementation of melatonin protects against fibromyalgia-related skeletal muscle alterations in reserpine-induced myalgia rats. *Int. J. Mol. Sci.* 18(7): 1389. 2017.
<https://doi.org/10.3390/ijms18071389>
44. *Franco L.M., Gadkari M., Howe K. N., Sun J., Kardava L., Kumar P., Kumari S., Hu Z., Fraser I., Moir S., Tsang J.S., Germain R.N.* Immune regulation by glucocorticoids can be linked to cell type-dependent transcriptional responses. *Exp. Med.* 216(2): 384–406. 2019.
<https://doi.org/10.1084/jem.20180595>
45. *Городецкая И.В.* Влияние тиреоидных гормонов на интенсивность стресс-синдрома в эксперименте. *Здравоохранение.* 7: 25–28. 2000. [*Gorodetskaya I.V.* The influence of thyroid hormones on the intensity of stress syndrome in the experiment. *Healthcare.* 7: 25–28. 2000. (In Russ)].

Effect of Low Doses of L-Thyroxine on Stress Resistance in Animals with Experimentally Induced Deficits of Sympathetic Nervous Influences

E. A. Gusakova^a, *, I. V. Gorodetskaya^a

^a*Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Belarus*

^{*}*e-mail: elena-gusakova83@mail.ru*

Slight increase in catecholamine levels has an adaptive effect at stress. The role of the thyroid axis in adaptation to stress is also proved. However, it remains unclear whether the protective effect of iodine-containing thyroid hormones (ITH) in stress is mediated by catecholamines or this is direct action of ITH. The purpose of this research is to investigate the expression of the antistress effect of low doses of L-thyroxine at animals with a deficit of sympathetic nervous influences caused in the experiment. The experiment was performed on 270 white unbreed male rats weighing 220–240 g. Stress was modeled using the “time deficit” method. L-thyroxine was injected in small, close to physiological doses (intragastrically from 1.5 to 3 µg/kg for 28 days). Guanethidine was injected intraperitoneally (30 mg/kg for 28 days). The intensity of the stress response was studied by changes in: 1) the relative mass of the adrenal glands, thymus and spleen; 2) the level of corticosterone and insulin in the blood, the value of the corticosterone-insulin coefficient; 3) the state of the gastric mucosa. Motor activity of rats was evaluated in the “open field” test. Physical endurance of animals was studied by the time they were on a rotating roller. The results obtained were processed using nonparametric methods with the help of the program Statistica 10.0 (Stat Softinc., STA999K347156-W). Chemical desympatization prevents the stimulation of thyroid function under stress and, at the same time, determines a greater decrease in the body's stability under these conditions. The combined administration of L-thyroxine and guanethidine has a protective effect under stress at rats with an intact nervous system. However, compared to them, this effect is

less expressed, which indicates that catecholamines play a role in its realization, but ITH have a critical significance. The protective effect of small doses of L-thyroxine under stress is partially mediated by catecholamines, but to a greater extent by ITH itself.

Keywords: iodine-containing thyroid hormones, stress, chemical desympatisation

ЦИТИРОВАТЬ:

Гусакова Е.А., Городецкая И.В. Влияние малых доз L-тироксина на устойчивость к стрессу животных с экспериментально вызванным дефицитом симпатических нервных влияний. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 107(3): 352–373. 2021.

DOI: 10.31857/S0869813921030067

TO CITE THIS ARTICLE:

Gusakova E.A., Gorodetskaya I.V. Effect of low doses of L-thyroxine on stress resistance in animals with experimentally induced deficits of sympathetic nervous influences. Russian Journal of Physiology. 107(3): 352–373. 2021.

DOI: 10.31857/S0869813921030067

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ЭФФЕКТЫ ФАЗОВЫХ СДВИГОВ ЧРЕСКОЖНОЙ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ
СТИМУЛЯЦИИ СПИННОГО МОЗГА НА КИНЕМАТИЧЕСКИЕ
ХАРАКТЕРИСТИКИ ШАГАТЕЛЬНЫХ ДВИЖЕНИЙ У ЧЕЛОВЕКА**

© 2021 г. И. Н. Богачева¹*, Н. А. Щербакова¹, А. А. Гришин¹, Ю. П. Герасименко¹

¹*Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия*

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

Поступила в редакцию 23.10.2020 г.

После доработки 19.01.2021 г.

Принята к публикации 19.01.2021 г.

Чрескожная электрическая стимуляция спинного мозга (ЧЭССМ) осуществлялась в разные фазы шагательного цикла с целью управления кинематическими параметрами шага при ходьбе здоровых испытуемых по беговой дорожке. ЧЭССМ в фазе переноса (на уровне T11–T12), направленная на активацию флексорных моторных пулов, вызывала изменение амплитуды движений в тазобедренном, коленном, голеностопном суставах и увеличение подъема ноги. Стимуляция на уровне L1–L2 в фазе опоры, адресованная к экстензорным моторным пулам, не оказывала существенного влияния на кинематику шагательных движений. Сдвиг начала стимуляции на уровне T11–T12 на 100–150 мс до инициации фазы переноса или ее продление на 100 м после окончания фазы переноса вызывало значимые изменения кинематики шагательных движений. Существенным для начала стимуляции является момент отталкивания ступни от опоры, который происходит несколько раньше фазы переноса. Продление периода стимуляции позволяет увеличить сгибание ноги в голеностопном суставе. Выбор оптимального алгоритма фазозависимой ЧЭССМ для активации флексорных и экстензорных моторных пулов в шагательном цикле повышает эффективность стимуляции, что может быть использовано при разработке реабилитационных методов для восстановления двигательных функций.

Ключевые слова: спинной мозг, электрическая стимуляция, фаза шагательного цикла

DOI: 10.31857/S0869813921030031

Электрическая стимуляция спинного мозга является одним из возможных методов внешнего управления двигательными функциями у человека при их утрате вследствие заболевания или травмы спинного мозга [1]. В последние годы активно ведется поиск неинвазивных методов воздействия на нейронные структуры спинного мозга, к которым относится чрескожная электрическая стимуляция спинного мозга (ЧЭССМ). ЧЭССМ успешно применяется в комплексной терапии для восстановления двигательных функций у человека и животных в клинических и экспериментальных исследованиях [2–5]. В настоящее время разрабатывается новый подход в использовании ЧЭССМ, а именно, возможность адресного воздействия на определенные нейронные структуры спинного мозга. Так, при стимуляции разных уровней спинного мозга (T10–L1) была показана относительная избиратель-

ность рекрутирования различных мотонейронных пулов, иннервирующих мышцы ног, и высказано предположение о возможности селективной активации флексорных или экстензорных моторных пулов [6]. Поскольку локомоция это устойчивая циклическая последовательность движений ног с чередованием фазы опоры и фазы переноса, различающихся по функциям и степени активации мышц, то для управления параметрами шагательных движений стимуляционные воздействия должны адресно прикладываться к моторным пулам, обеспечивающим соответствующую двигательную функцию. В данной работе фазозависимая ЧЭССМ применялась на разных уровнях спинного мозга в зоне вхождения дорсальных корешков с целью управления кинематическими параметрами движений человека при ходьбе. Настоящее исследование направлено на поиски наиболее адекватного алгоритма для такой стимуляции, а именно, ответа на вопрос, как изменение временных границ приложения стимуляции в рамках фаз шагательного цикла влияет на двигательный ответ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследованиях принимали участие здоровые добровольцы – мужчины ($n = 5$, возраст 19–35 лет). В соответствии с принципами Хельсинкской декларации и нормами российского и международного права было получено информированное письменное согласие каждого из испытуемых на участие в исследованиях. В ходе исследования испытуемые выполняли ходьбу по беговой дорожке (h/p/cosmos gaitway®, Германия), движущейся со скоростью 1.5–1.7 км/ч. На фоне спокойной ходьбы после 30–60 с начинали осуществлять ЧЭССМ с частотой 15 Гц, сначала, в течение 30 с, во время фазы опоры ноги, в области позвонков L1–L2, для воздействия на моторные пулы мышц-разгибателей, затем, в следующие 30 с, ЧЭССМ с частотой 30 Гц, во время фазы переноса ноги, в области T11–T12, для воздействия на моторные пулы мышц-сгибателей. Далее ЧЭССМ проводилась с чередованием стимуляции L1 и T11 в соответствующих фазах шагового цикла, т.е. осуществлялась попеременная активация мышц разгибателей и сгибателей. Детектирование фазы опоры и фазы переноса для запуска стимуляции осуществлялось при ходьбе в реальном времени с помощью специально разработанных датчиков [7].

Для выполнения ЧЭССМ использовался пятиканальный электростимулятор Био-Стим-5 (ООО Косима) [8]. Прямоугольные импульсы длительностью 1 мс модулировались частотой 5 кГц; применялась частота стимуляции 15 Гц для экстензорных и 30 Гц для флексорных пулов, интенсивность стимуляции 15–90 мА. Проводилась видеорегистрация движений с использованием системы 3D-видеоанализа (Qualisys, Швеция). Светоотражающие маркеры фиксировались на следующих билатеральных антропометрических точках: плечевая акромиальная (плечевой сустав), вертельная (тазобедренный сустав), верхнеберцовая (коленный сустав), нижнеберцовая (голеностопный сустав), конечная (первый палец стопы). По координатам маркеров рассчитывали траекторию движения ноги и кинематические параметры шагов. Анализировались изменения амплитуды углов в тазобедренном, коленном и голеностопном суставах и высота подъема ступни, которая определялась по координатам смещения маркера, закрепленного на большом пальце ноги. Математическая обработка данных выполнена с помощью оригинальных программ и электронных таблиц Microsoft Excel. Рассчитывались средние значения и среднеквадратические отклонения параметров для каждого испытуемого, оценивали их отношения к значениям в начальном условии (т.е. значениям за первые 30 с исследования, до начала ЧЭССМ). Рассчитанные относительные величины усредняли для всех испытуемых. Статистическую значимость изменений характе-

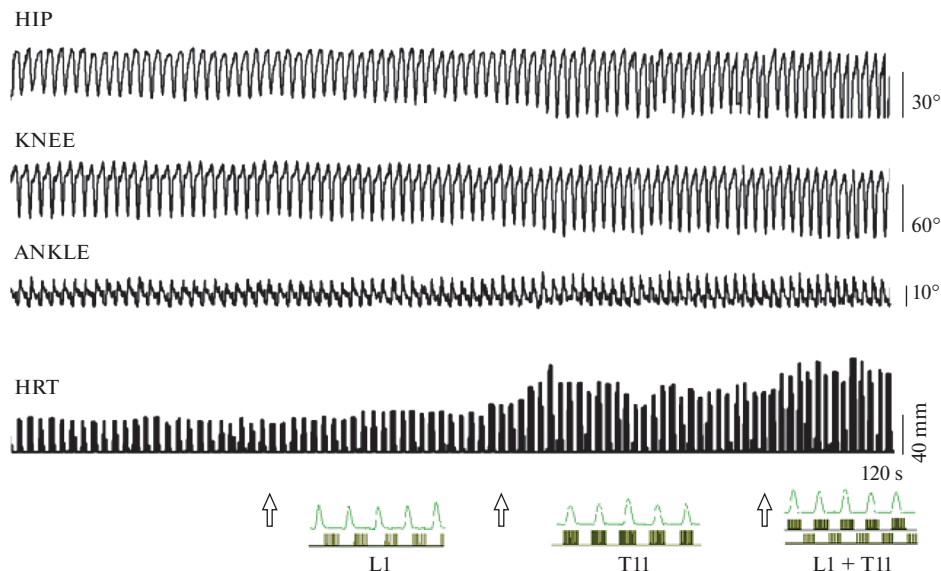


Рис. 1. Изменения углов тазобедренного (HIP), коленного (KNEE) и голеностопного (ANKLE) суставов и величины подъема ступни (по вертикальным координатам большого пальца, Hrf) при ЧЭССМ на фоне ходьбы во время стимуляции L1 (в фазе опоры), T11 (в фазе переноса) и при чередующейся стимуляции L1 и T11, моменты начала стимуляции отмечены стрелками; испытуемый З.Ю., правая нога.

Fig. 1. Changes of the hip (HIP), knee (KNEE) and ankle (ANKLE) joints displacements and the magnitude of the height of the right big toe (based on the vertical toe coordinates, HRT) caused by SctS during walking during stimulation L1 (in the swing phase), T11 (in the stance phase) and alternating stimulation of L1 and T1. The moments of the beginning of stimulation are marked with arrows; subject. Z.Yu., right leg.

ристик оценивали с использованием *t*-критерия Стьюдента, отличия считались достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследований было установлено, что ЧЭССМ оказывает влияние на кинематические параметры ходьбы, при этом эффекты ЧЭССМ в области L1 в фазе опоры и в области T11 в фазе переноса выражены в разной степени. Рис. 1 показывает изменение суставных углов и высоты подъема конечности при ЧЭССМ во время ходьбы для одного испытуемого. Амплитуда движений в суставах, а также высота подъема конечности повышается значительно больше при ЧЭССМ T11 в фазе переноса ноги, чем при ЧЭССМ L1 в фазе опоры, наибольший эффект наблюдался при чередующейся стимуляции (L1 + T11).

Поскольку шаг реализуется путем последовательной активации различных моторных пулов, иннервирующих мышцы ног, и моменты времени начала и окончания стимуляции в границе фаз могут влиять на кинематику движений, нами был проведен анализ зависимости высоты подъема ступни от фазовых сдвигов, применяемой ЧЭССМ. Именно в изменении высоты подъема ступни может проявляться влияние параметров ЧЭССМ, т.к. в условиях ходьбы по движущейся дорожке другие кинематические параметры движения в значительной степени определены скоростью движения дорожки тредбана.

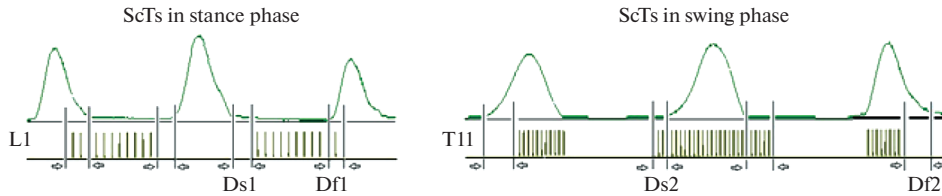


Рис. 2. Примеры реальных регистраций подъемов большого пальца стопы в шагах при ЧЭССМ с обозначениями сдвигов начала (Ds1, Ds2) и конца (Df1, Df2) первой (в фазе опоры ноги) и второй (в фазе переноса ноги) стимуляции.

Fig. 2. Examples of real recordings of the big toe height during stepping using ScTS with designations of the start (Ds1, Ds2) and end (Df1, Df2) shifts of the first (in the leg stance phase) and second (in the swing phase) stimulation.

В практической реализации фазозависимой ЧЭССМ, когда детектирование фаз осуществляется в реальном времени, не всегда происходит точное попадание в границы фаз шагательного цикла, в результате чего появляются некоторые сдвиги начала и конца стимуляции относительно фаз шагательного цикла (рис. 2), величина которых определяется возможностями технических средств. Поскольку в наших исследованиях все сдвиги распределялись случайным образом, при отдельных стимуляциях их можно было рассматривать как независимые друг от друга характеристики и анализировать влияние каждого сдвига на параметры шага в отдельности.

Результаты статистического анализа изменений высоты подъема ступни при каждом виде сдвига приведены на рис. 3.

Можно видеть, что эффект повышения высоты подъема ступни в разной степени присутствует практически при любых наблюдаемых сдвигах, однако величина подъема зависит от величин сдвигов начала и конца ЧЭССМ в пределах границы фаз. Так, при стимуляции L1 (в фазе опоры) сдвиги начала стимуляции относительно инициации фазы опоры влияют незначительно, в то время как задержка окончания стимуляции, когда она может попадать уже в фазу переноса, вызывает заметное снижение высоты подъема, иногда даже сильнее, чем при свободной ходьбе. Максимальный подъем наблюдается при окончании стимуляции за 100–200 мс до завершения фазы опоры (–250...–150 мс на рис. 3).

При стимуляции в фазе переноса, ЧЭССМ T11, эффект наиболее выражен, когда начало стимуляции оказывается раньше начала переноса на 200 мс (–250...–150 мс на рис. 3), а окончание на 100 мс (+50...+150 мс на рис. 3) позднее. Объединяя данные по задержкам в разные фазы, можно сделать заключение, что стимуляция в фазе опоры должна заканчиваться на 100 мс раньше, а в фазе переноса – начинаться на 100 мс раньше, а продолжаться на 100 мс дольше.

Как известно, на фазу опоры приходится 60%, а на фазу переноса 40% времени шагательного цикла. Однако при помощи многопараметрического анализа ходьбы в шагательном цикле выделяют 6 биомеханических фаз [9]. В 4-ой фазе (51–66% шагательного цикла) происходит отталкивание ноги от опоры, этот момент несколько предшествует началу фазы переноса и является, согласно нашим данным, важным для начала стимуляции. На кривой, описывающей вертикальную составляющую опорной реакции ноги при ходьбе, именно этому интервалу времени соответствует второй максимум, который отражает активное отталкивание ноги от опорной поверхности, что вызывает продвижение тела вверх и вперед [10].

Известно, что в фазе переноса происходит сгибание тазобедренного сустава, затем сгибание коленного сустава при согласованном действии двуглавой мышцы

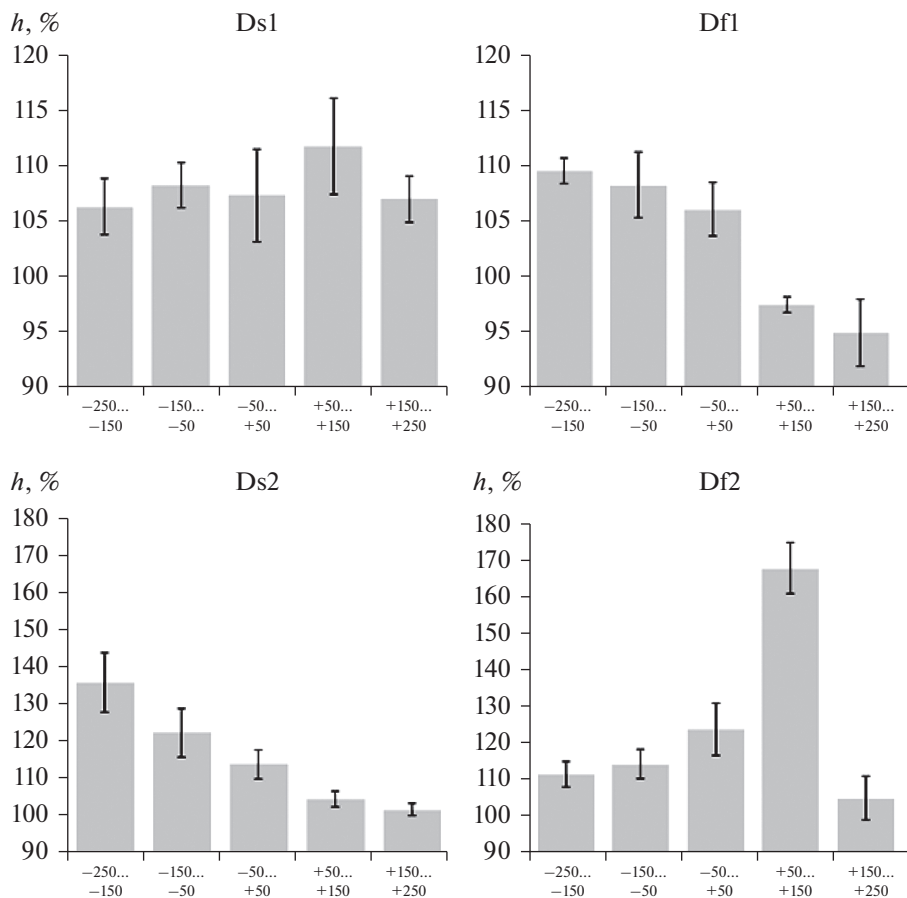


Рис. 3. Зависимости средних значений подъема ипсилатеральной ноги в шаге (h , %) от величин сдвигов начала и конца ЧЭССМ, определенных в диапазонах по 100 мс относительно границ фаз, совпадение с границей фазы соответствует 0 (оси абсцисс). За 100% принималась средняя высота подъема ноги в шагах до стимуляции. Данные усреднены по 5 испытуемым, у каждого по 30 шагов на каждую стимуляцию. Верхний ряд — для стимуляции в фазе опоры, нижний ряд — для стимуляции в фазе переноса.

Fig. 3. Dependences of the values (means) of the ipsilateral leg height in the step (h , %) on the shifts of the beginning and end of the ScTS, determined in ranges of 100 ms relative to the phase boundaries, coincidence with the phase boundary corresponds to 0 (abscissa axis). The average leg height in steps before stimulation was taken as 100%. The data were averaged over 5 subjects; 30 steps during each stimulation for each subject. The top row: stimulation during stance phase, the bottom row: stimulation during swing phase.

бедрa (biceps femoris) и полусухожильной мышцы (semitendinosus), и, наконец, сгибание голеностопного сустава [11]. Из наших данных следует, что при продлении стимуляции в фазе переноса на 100 мс усиливается воздействие на эти мышцы, максимальная активность которых приходится на конец и на начало фазы опоры. Удлинение периода стимуляции позволяет воздействовать на переднюю большеберцовую мышцу (tibialis anterior) и увеличить сгибание ноги в голеностопном суставе.

Большой эффект стимуляции в фазе переноса можно объяснить тем, что мышцы-разгибатели составляют силовую, а мышцы-сгибатели — коррекционную часть локомоторной синергии. В связи с их функциями, мышцы-разгибатели имеют бо-

лее жесткую иннервационную программу ходьбы, а мышцы-сгибатели — более адаптивную. В работе [12] было показано, что проприоцептивные афференты вызывают моносинаптические реакции в нейронах-разгибателях и задействуют нейроны-сгибатели через полисинаптические пути.

В ряде работ [9–11] использовалась функциональная электростимуляция (ФЭС) мышц, активных в определенные фазы шагательного цикла. ФЭС была разработана на основе анализа биомеханики и нейрофизиологии походки и показала хорошие результаты в коррекции параметров шага у лиц с двигательными нарушениями [10, 11, 13]. В настоящее время анализ походки используется как один из основных методов для диагностики двигательной патологии в клинических исследованиях [14, 15]. В отличие от ФЭС, фазозависимая ЧЭССМ как метод искусственной коррекции движений активизирует моторные пулы комплекса мышц, воздействуя на систему управления локомоторной синергией, а при мультисегментарной ЧЭССМ происходит конвергенция нисходящих и восходящих влияний на нейронные сети, ответственные за постуральную и локомоторную функции [16].

Фазозависимая ЧЭССМ позволяет сочетать естественную и искусственную активацию моторных пулов, не нарушая автоматизма ходьбы, а выработка правильного алгоритма открывает возможность управлять характеристиками шага, что может быть использовано при разработке новых реабилитационных методик для восстановления двигательных функций.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке НИР с ООО Косима № 2/2019 от 01.12.2019 в рамках проекта НТИ “Разработка нейростимуляционного устройства для регуляции двигательных функций у больных с последствиями острого нарушения мозгового кровообращения” и Программой “Фундаментальные научные исследования для долгосрочного развития и обеспечения конкурентоспособности общества и государства” (проект № АААА-А18-118050890115-9).

ВКЛАД АВТОРОВ

И.Н. Богачева — написание текста рукописи, обзор публикаций по теме статьи; Н.А. Щербакова — анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи; А.А. Гришин — получение данных для анализа; Ю.П. Герасименко — разработка дизайна исследования, получение данных для анализа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Harkema S., Hodes J., Angeli C., Chen Y., Ferreira C., Willhite A., Gerasimenko Y.P., Edgerton V.R., Burdick J., Rejc E., Grossman R.G. Effect of epidural stimulation of the lumbosacral spinal cord on voluntary movement, standing, and assisted stepping after motor complete paraplegia: a case study. *Lancet*. 377: 1938. 2011.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60547-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60547-3)
2. Dy C.J., Gerasimenko Y.P., Edgerton V.R., Dyhre-Poulsen P., Courtine G., Harkema S.J. Phase-dependent modulation of percutaneously elicited multisegmental muscle responses after spinal cord injury. *J. Neurophysiol.* 103(5): 2808–2820. 2010.
<https://doi.org/10.1152/jn.00316.2009>
3. Hofstoetter U.S., Freundl B., Binder H., Minassian K. Recovery cycles of posterior root-muscle reflexes evoked by transcutaneous spinal cord stimulation and of the H reflex in individuals with intact and injured spinal cord. *PLoS One*. 14(12) e0227057. 2019.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227057>
4. Sayenko D.G., Rath M., Edgerton V.R., Gerasimenko Y.P., Ferguson A.R., Burdick J.W., Havton L.A. Self-Assisted Standing Enabled by Non-Invasive Spinal Stimulation after Spinal Cord Injury. *J. Neurotrauma*. 36(9): 1435–1450. 2019.
<https://doi.org/10.1089/neu.2018.5956>
5. Муслиенко П.Е., Богачева И.Н., Савохин А.А., Килимник В.А., Горский О.В., Герасименко Ю.П. Инициация локомоторной активности у децеребрированных и спина кошек при нейн-вазивной чрезкожной стимуляции спинного мозга. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сече-*

- нова. 99(8): 917–927. 2013. [Musienko P.E., Bogacheva I.N., Savochin A.A., Kilimnik V.A., Gorsky O.V., Nikitin O.A., Gerasimenko Yu. P. Non-invasive transcutaneous spinal cord stimulation facilitates locomotor activity in decerebrated and spinal cats. Russ. J. Physiol. 99(8): 917–927. 2013 (In Russ)].
6. Sayenko D.G., Atkinson D.A., Dy C.J., Gurley K.M., Smith V.L., Angeli C., Harkema S.J., Edgerton V.R., Gerasimenko Y.P. Spinal segment-specific transcutaneous stimulation differentially shapes activation pattern among motor pools in humans. J. Appl. Physiol. 118: 1364–1374. 2015. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01128.2014>
 7. Гришин А.А., Боброва Е.В., Решетникова В.В., Мошонкина Т.Р., Герасименко Ю.П. Система детектирования фаз шагательного цикла и стимуляции спинного мозга как инструмент управления локомоцией человека. Мед. техника. 5: 10–13. 2020. [Grishin A.A., Bobrova E.V., Reshatnikova V.V., Moshonkina T.R., Gerasimenko Yu.P. The system for detecting the phases of stepping cycle and stimulating the spinal cord as instrument for human locomotion control. Med. Equipment. 5: 10–13. 2020. (In Russ)].
 8. Гришин А.А., Мошонкина Т.Р., Солопова И.А. Устройство для неинвазивной электрической стимуляции спинного мозга. Мед. техника. 5: 8–11. 2016 [Grishin A.A., Moshonkina T.R., Solopova I.A. The device for non-invasive electrical stimulation of the spinal cord. Med. Equipment. 5: 8–11. 2016 (In Russ)].
 9. Витензон А.С., Петрушанская К.А. Физиологические обоснования метода искусственной коррекции движений посредством электростимуляции мышц при ходьбе. Рос. журн. биомеханики. 14(48): 7–27. 2010. [Vitenzon A.S., Petrushanskaya K.A. Physiological substantiation of the method of artificial movement correction by means of electrical muscle stimulation under walking. Russ. J. Biomech. 14(48): 7–27. 2010. (In Russ)].
 10. Угнивенко В.И. Кинематика и динамика стопы при ходьбе. <http://www.tri.by/News/Details/271>. 2012. [Ugnivenko V.I. Foot kinematics and dynamics under walking. <http://www.tri.by/News/Details/271>. 2012. (In Russ)].
 11. Витензон А.С., Петрушанская К.А. К фазовому анализу ходьбы и некоторых ритмических движений человека. Рос. журн. биомеханики. 9(1): 19–35. 2005. [Vitenzon A.S., Petrushanskaya K.A. Phase analysis of walking and some rhythmical motions of man. Russ. J. Biomech. 9(1): 19–35. 2005. (In Russ)].
 12. Wagner F.B., Mignardot J.B., Le Goff-Mignardot C.G., Demesmaeker R., Komi S., Capogrosso M., Rowald A., Seáñez I., Caban M., Pirondini E., Vat M., McCracken L.A., Heimgartner R., Fodor I., Watrin A., Seguin P., Paoles E., Van Den Keybus K., Eberle G., Schurch B., Pralong E., Becce F., Prior J., Buse N., Buschman R., Neufeld E., Kuster N., Carda S., von Zitzewitz J., Delattre V., Denison T., Lambert H., Minassian K., Bloch J., Courtine G. Targeted neurotechnology restores walking in humans with spinal cord injury. Nature. 563 (7729): 65–71. 2018.
 13. Буркин А.Н. Особенности кинематики и динамики стопы, требующие учета при разработке методов и средств оценки свойств обувных подошвенных материалов при изгибе. Научные труды БГЭУ. 42–47. 2013. [Burkin A.N. Features of kinematics and dynamics of the foot, requiring consideration in the development of methods and means for assessing the properties of shoe sole materials during bending. In: Scientific works of BSEU. 42–47. 2013. (In Russ)].
 14. Скворцов Д.В. Диагностика двигательной патологии инструментальными методами: анализ походки, стабилметрия. М. 2007. [Skvortsov D.V. Diagnosis of motor pathology by instrumental methods: gait analysis, stabilometry. Moscow. 2007 (In Russ)].
 15. Malouin F., Potvin M., Prevost J., Richards C.L., Wood-Dauphinee S., Giuliani C.A., Duncan P.W. Use of an intensive task-oriented gait training program in a series of patients with acute cerebrovascular accidents. Phys. Ther. 72(11): 781–793. 1992.
 16. Saenko D.G., Alkinson D.F., Floyd T.C., Gorodnichev R.M., Moshonkina T.R., Harkema S.J., Edgerton V.R., Gerasimenko Y.P. Effects of paired transcutaneous electrical stimulation delivered at single and dual sites over lumbosacral spinal cord. Neurosci. Letters. (609): 229–234. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.10.005>

Effects of Phase Shifts of Transcutaneous Electrical Spinal Cord Stimulation on the Kinematic Characteristics of Stepping Movements in Humans

I. N. Bogacheva^{a,*}, N. A. Scherbakova^a, A. A. Grishin^a, and Yu. P. Gerasimenko^a

^aPavlov Institute of Physiology Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

^{*}e-mail: boiss@mail.ru

Transcutaneous electrical stimulation of the spinal cord (ScTS) was carried out in different phases of the stepping cycle in order to control the kinematic parameters of the step in healthy subjects walking on a treadmill. ScTS at the T11–T12 level during swing phase

activated the flexor motor pools and caused change of the motion amplitude in hip, knee, and ankle joints as well as increased the height of the leg elevation. Stimulation at the L1–L2 level at the stance phase, addressed to the extensor motor pools, did not affect the kinematics of stepping movements. Shift in the beginning of T11–T12 stimulation to 100–150 ms before the initiation of the swing phase or its prolongation by 100 ms after the end of it caused significant changes in the kinematics of the movements. Essential for the start of stimulation is the moment of pushing the foot off the support a little earlier the transfer phase. Prolongation the stimulation period in transfer phase allows to increase ankle joint flexion. The choice of the optimal algorithm of the phase-dependent ScTS for activation of the flexor and extensor motor pools during the stepping cycle increases the efficiency of stimulation in motor functions rehabilitation techniques.

Keywords: spinal cord, electrical stimulation, phase of stepping cycle

ЦИТИРОВАТЬ:

Богачева И.Н., Щербакова Н.А., Гришин А.А., Герасименко Ю.П. Эффекты фазовых сдвигов чрескожной электрической стимуляции спинного мозга на кинематические характеристики шагательных движений у человека. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 107(3): 374–381. 2021.

DOI: 10.31857/S0869813921030031

TO CITE THIS ARTICLE:

Bogacheva I.N., Scherbakova N.A., Grishin A.A., Gerasimenko Yu.P. Effects of phase shifts of transcutaneous electrical spinal cord stimulation on the kinematic characteristics of stepping movements in humans. Russian Journal of Physiology. 107(3): 374–381. 2021.

DOI: 10.31857/S0869813921030031

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**СРАВНЕНИЕ СПОСОБНОСТИ К ОБУЧЕНИЮ МАКАКОВ РЕЗУСОВ
(*MACACA MULATTA*) И ПАВИАНОВ ГАМАДРИЛОВ (*PAPIO HAMADRYAS*)
В СВЕТЕ СОЗДАНИЯ МОДЕЛИ КОГНИТИВНОЙ ЭВОЛЮЦИИ ПРИМАТОВ**

© 2021 г. А. Е. Аникаев¹, *, В. Г. Чалян¹, Н. В. Мейшвили¹, Е. Н. Аникаева¹

¹Научно-исследовательский институт медицинской приматологии, Сочи, Россия

*E-mail: mg_anykey@mail.ru

Поступила в редакцию 18.09.2020 г.

После доработки 26.12.2020 г.

Принята к публикации 04.01.2021 г.

Проведено сравнительное исследование способности к обучению двух видов низших обезьян — макаков резусов (*Macaca mulatta*) и павианов гамадрилов (*Papio hamadryas*), использованное в качестве гипотетической модели развития когнитивных способностей приматов при таком эволюционном событии как переход от древесного образа жизни к наземному. Установлено, что у самцов макаков резусов средний уровень обучаемости составил $68.5 \pm 5.8\%$, у самцов павианов гамадрилов — $78.0 \pm 3.1\%$. Медиана распределения обученности, характеризующего максимальное количество непрерывных верных решений, у макаков резусов равна 17.0% (интерквартильный размах, IQR = 11.0), у павианов гамадрилов — 40.0% (IQR = 15.5). У исследуемых групп обезьян обнаружены определенные различия в динамике формирования навыка. Полученные результаты являются иллюстрацией преимуществ наземности как фактора, способствующего эволюции в направлении разумности, и согласуются наилучшим образом с “экологической” гипотезой развития когнитивных способностей.

Ключевые слова: павианы гамадрилы, макаки резусы, формирование навыка, обученность, обучаемость, антропогенез

DOI: 10.31857/S086981392103002X

ВВЕДЕНИЕ

Центральными отличиями *Homo sapiens* от других представителей царства Animalia являются высокий уровень когнитивных способностей, наличие языка и сложной психики. Именно эти различия, а не особенности физиологии и биохимии, более всего определяют уникальность человека. При этом, очевидно, что высокоразвитый интеллект, сложнейшие коммуникативные системы, сложная и пластичная психика человека не могут являться простым следствием его генетической уникальности. Эволюционные изменения животных предков человека, завершившиеся формированием представителей рода Номо, должны были представлять собой результат генетической изменчивости, протекавшей на фоне изменений в условиях среды обитания и сопряженной с социальной изменчивостью. Представляется поэтому, что любые попытки воссоздания процесса антропогенеза должны опираться на комплексный подход, предполагающий исследование эволюции конкретных функций в сочетании с анализом природно-средовых и социальных параметров.

Термин “когнитивные” процессы применяют для тех видов поведения, “в основе которых лежит не акт условнорефлекторного ответа на воздействие внешних стимулов, а формирование внутренних (мысленных) представлений о событиях и связях между ними” [1]. Круг явлений, относимых к данным процессам, достаточно широк — некоторые виды памяти (образная память), ряд форм обучения, прежде всего пространственное, а также рассудочная деятельность. По мнению Крушинского, элементарная рассудочная деятельность — это “способность животного улавливать эмпирические законы, связывающие предметы и явления внешнего мира, и оперировать этими законами в новой для него ситуации для построения программы адаптивного поведенческого акта” [2]. По определению Rumbaugh и Pate — это “адекватное поведение, основанное на восприятии связей между предметами, на представлении об отсутствующих предметах, на скрытом оперировании символами” [3].

Эволюция когнитивных способностей является неотъемлемым и важнейшим звеном антропогенеза. Между тем, отсутствуют материальные свидетельства этой эволюции и восстановление ее этапов представляет собой почти исключительно умозрительный процесс, который может опираться только на исследования современных животных. Полученные при исследовании когнитивных способностей современных животных данные могут служить источником информации для реконструкции процесса возникновения и развития познавательных функций в ходе их эволюции [4]. В частности, эта сторона проблемы позволяет более полно осветить вопросы, касающиеся особенностей формирования психики человека в процессе антропогенеза. В этом аспекте на первый план выходит исследование когнитивных способностей обезьян. По мнению ряда исследователей, изучение когнитивной деятельности современных приматов является источником информации для решения проблем эволюции психики и реконструкции ранних стадий антропогенеза [5–10]. Чрезвычайно важным методическим приемом при этом является сравнительный подход [11]. Сопоставление когнитивных способностей разных видов приматов, значительно отличающихся друг от друга по комплексу признаков, включая такие, как характер среды обитания и связанный с ней тип социального устройства, способствует выявлению центральных тенденций в эволюции когнитивных функций приматов в процессе антропогенеза. Необходимость и важность такого подхода определяется самой сущностью эволюционного подхода к формированию биологически значимых функций организма и структур. К числу таких функций следует, по мнению Чарлза Дарвина и ряда современных ученых, отнести когнитивные способности [12, 13]. При этом в качестве факторов, определяющих приспособительный характер эволюции когнитивных функций приматов, в настоящее время обычно рассматриваются усложнение экологических условий и усиление внутривидовой конкуренции, проявляющейся, в первую очередь, в отношении социальных навыков [14–16]. Вполне логичной кажется идея того, что усложнение экологических условий среды обитания приматов, в том числе необходимость посещения обширных территорий для поиска пропитания, требуют прогрессивного развития определенных когнитивных способностей, прежде всего, развития пространственной ориентации и памяти [17]. На сегодняшний день существует немало гипотез относительно того, что послужило отправной точкой для прогрессивной эволюции группы древних приматов, завершившейся формированием вида *Homo sapiens* [18]. Если придерживаться традиционной модели, согласно которой толчком к развитию в направлении формирования Номо, послужили изменения климата, приведшие к сокращению площади лесов и остепнению суши [19], то очевидно, что переход гомининных предков человека от древесного образа жизни к более суровому полуназемному или полностью наземному способствовал не только развитию пространственных способностей и памяти, но способствовал также их социальной эволюции, изменениям в социальной организации и отношениях. Вы-

сказано предположение, что сложная социальная организация сообществ ведущих наземный образ жизни приматов, способствовала формированию таких качеств как “наличие сообразительности, осторожности, способности к тщательному и оперативному анализу действий членов сообщества, к оценке этих действий и прогнозу возможных последствий” [20, 21]. В последние десятилетия широкое развитие получила идея социального сознания, рассматриваемая как альтернатива традиционной модели эволюции интеллекта, согласно которой приоритетную роль в развитии когнитивной функции играла не инструментально-орудийная деятельность, а социальные взаимодействия, в частности, умение перехитрить, способность манипулировать другими членами группы [22]. Можно предположить следующую логическую цепь эволюционных изменений, имевших место в процессе антропогенеза: аридизация климата — смена экологических условий древних приматов → изменение их образа жизни → усложнение социальной организации → повышение общего уровня когнитивных способностей. Закономерно предположить, что у гомининовых предков человека изменение характера среды обитания в сторону более сурового наземного образа жизни вызвало селективное давление, направленное на усложнение социальной организации, что сопровождалось повышением уровня взаимодействия между членами стада, требовало более высокой степени развития познавательных способностей, рассудочной деятельности и пластичности психики в целом, и что естественным образом отразилось на относительных размерах головного мозга.

Данная работа посвящена сравнительному исследованию способности к обучению у двух видов низших обезьян, принадлежащих к одному семейству Cercopithecoidea — макаков резусов (*Macaca mulatta*) и павианов гамадрилов (*Papio hamadryas*). При этом, макаки резусы рассматриваются в качестве модели сообщества гоминин, ведущих преимущественно древесный образ жизни, тогда как павианы максимально соответствуют модели гоминин, перешедших на преимущественно наземный образ жизни. Использование этих двух видов в качестве модели разных этапов эволюции приматов в антропогенезе основывается на следующих их особенностях:

А. Экология. Макаки резусы обитают в лесах и кустарниковых зарослях. Павианы гамадрилы — обитатели открытых полупустынь и саванн.

Б. Анатомия. Павианы гамадрилы обладают сильно выраженным половым диморфизмом, тогда как размеры тела у самцов и самок макаков резусов отличаются значительно меньше.

В. Физиология. Эти два вида различаются целым спектром физиологических различий, включая степень “цефализации”, отражающей сложность нейронного строения и уровень рассудочной деятельности. По Рогинскому [23] индекс цефализации (ИЦ) у макаков в целом составляет 0.427, у павианов — 1.6; коэффициент энцефализации (EQ) [24] соответственно 2.1 и 2.4 [25]. Имеются исследования, указывающие на различия в цитоархитектуре лобной коры павианов гамадрилов [26].

Г. Социальная организация. Оба вида относятся к числу видов с мультисамцово-социальной организацией, но при этом макаки резусы обладают матрилокальностью и ярко выраженной матрилинейной социальной структурой, а павианы гамадрилы — патрилокальностью и гаремной структурой стада. Размеры групп у макаков резусов варьируют от 11 до 50 особей, тогда как в стадах у павианов гамадрилов до 700 и более особей [27].

Д. Поведение. Павианы гамадрилы отличаются более сложным поведением, в частности, очень сложным коммуникативным поведением, включая большое разнообразие мимических, жестовых и звуковых форм коммуникации [28].

Следует также заметить, что если макаки резусы с точки зрения познавательных функций изучены достаточно неплохо [29–32], то данные по павианам гамадрилам

практически отсутствуют [33]. Соответственно при сравнении павианов гамадрилов с макаками резусами возникает возможность получить новые данные, позволяющие оценить место павианов гамадрилов в общей шкале когнитивных способностей приматов.

Следует отметить, что число сравнительных исследований разных видов приматов, связанных с выявлением зависимости между когнитивными способностями приматов, экологическими условиями их обитания и характером социальных отношений, ограничено [34, 35].

Цель исследования: установление различий в когнитивных способностях (в частности, способности к обучению) современных видов обезьян для создания модели эволюции когнитивных способностей предков гоминин в рамках “экологической” версии процесса антропогенеза.

Задачи:

- осуществить сравнительное исследование способностей к обучению у макаков резусов и павианов гамадрилов;
- провести сравнительный анализ уровня обучаемости, обученности и динамики обучения у макаков резусов и павианов гамадрилов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования являлись половозрелые (возраст исследуемых животных от 13 до 20 лет) самцы макаков резусов (*Macaca mulatta*) ($n = 12$) и павианов гамадрилов (*Papio hamadryas*) ($n = 10$). Все особи были экспериментально наивными, никаких предварительных тестов и наблюдений не производилось. Животные были отсажены из родных групп и помещены на две недели в условия индивидуального содержания, где они проходили этап предварительного привыкания к новым для них условиям содержания и присутствию человека. Все животные были рождены и содержались до начала эксперимента в самцовых группах в вольерах ФГБНУ Научно-исследовательский институт медицинской приматологии. Важно отметить, что в Научно-исследовательском институте медицинской приматологии используется методика содержания обезьян, предполагающая минимальное вмешательство персонала в их жизнь, которое ограничивается ежедневным кормлением, уборкой помещений и ежегодным профилактическим осмотром группы. Фактически, с точки зрения опыта контакта с людьми, содержащиеся в вольерах Адлерского центра обезьяны соответствуют диким обезьянам, привезенным из мест естественного обитания.

В качестве предмета исследования была избрана такая важнейшая характеристика когнитивных способностей животных и человека, как способность к научению. Выбор научения в качестве критерия когнитивных способностей изучаемых видов приматов определялся важностью этой характеристики как базисного элемента познания. Способность к научению тесно связана со скоростью протекания нервно-психических процессов. Она обеспечивает скорость реагирования особей на изменения в окружающей среде, а значит, возможность адаптации животных к различным средовым условиям.

Для оценки способностей обезьян был использован простой тест на выбор емкости с приманкой, в зависимости от ее положения. Используемый тест является классическим тестом, широко применяющимся в исследованиях для оценки способностей к научению у разных видов животных и выявлению качества их пространственной памяти [36]. Избранный тест позволял оценить те особенности когнитивных способностей павианов и макаков, а именно, способность к научению и пространственную память, которые представляются нам ключевыми, определяющими когнитивные различия между этими двумя видами.

Методика теста заключалась в следующем: животному демонстрируют пищевое подкрепление (кусочек яблока) и две емкости разного цвета (желтая и черная) расположенные справа и слева от подкрепления. Затем установку закрывают непрозрачным экраном и помещают подкрепление в одну из емкостей (в черную слева). Экран удаляется, животному предоставляют выбор. Затем процедуру полностью повторяют. Обучение осуществлялось в течение одной сессии (50 предъявлений). На выполнение каждого предъявления отводилась 1 мин. Фиксировались следующие варианты выполнения: верное решение (+), неверное решение (–). Анализ полученных результатов осуществлялся по следующим параметрам:

1. Обучаемость, характеризующая потенциал к обучению, выраженный в общем количестве верных решений из 50 предъявлений (важно отметить, что в данном эксперименте все животные продемонстрировали высокий уровень экспериментальной активности [37] (0% отказов от решений);

2. Обученность, характеризующая результат обучения, выраженный в максимальном количестве непрерывных верных решений, зафиксированных в течение 50 предъявлений;

3. Динамика обучения, анализ параметра осуществлялся путем вычисления количества верных решений и отказов в отдельности по каждому из 50 предъявлений по всем обезьянам с последующим формированием динамических рядов. Также производился подсчет среднего значения по 5-ти интервалам в 10-ти предъявлениях, вычисление общего коэффициента прироста успешности по навыку и темпа прироста успешности по 5-ти интервалам.

Для оценки статистической значимости полученных результатов были применены следующие показатели и критерии. Данные по параметру обучаемость соответствуют нормальному распределению (W-критерий Шапиро–Уилка, $p > 0.05$), применялась параметрическая статистика: среднее значение, стандартная ошибка среднего, критерий Стьюдента t (при $p < 0.05$). Данные по параметру обученность соответствуют ненормальному распределению (W-критерий Шапиро–Уилка, $p < 0.05$), применялась непараметрическая статистика: медиана распределения, интерквартильный размах (IQR), критерий Манна–Уитни (U) (при $p < 0.05$). Для оценки динамики обучения применялась непараметрическая статистика: для анализа различий между интервалами предъявлений критерий Манна–Уитни (U) (при $p < 0.05$) и темп прироста ($T_{пр} = ((x_i/x_0) \times 100) - 100$, где x_i – среднее по интервалу, x_0 – среднее по предыдущему интервалу); для оценки степени и характера динамики обучения коэффициент прироста ($K_{пр} = (K_{p1} K_{p2} \dots K_{pn})^{1/n} - 1$, где K_p – коэффициент роста ($K_p = (y_i/y_0) \times 100$, отношение данного уровня к предыдущему, n – количество измерений (предъявлений)) и дисперсионный анализ интервалов предъявлений критерий Фридмана; для анализа различий между динамическими рядами критерий Манна–Уитни (U) (при $p < 0.05$), и коэффициент корреляции Спирмена (r) (при $p < 0.05$). Для анализа индивидуальных различий в уровне обучаемости был использован коэффициент вариации ($V = (\sigma/k) \times 100$, где σ – среднеквадратическое отклонение; k – среднее значение). Анализ данных осуществлялся с применением пакетов программного обеспечения Microsoft Office Excel 2016 и Statistica 7.0.

Все эксперименты проводились в соответствии с международными правилами по использованию лабораторных животных [38]. На проведение исследования было получено разрешение Комиссии по этике ФГБНУ Научно-исследовательский институт медицинской приматологии.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

По итогам исследования получены следующие результаты. У самцов макаков резусов средний уровень обучаемости, то есть уровень общего количества верных

решений составил $68.5 \pm 5.8\%$, у самцов павианов гамадрилов — $78.0 \pm 3.1\%$. Разница по уровню обучаемости составила 9.5% (критерий Стьюдента, $t = 3.35$, $p < 0.05$) в пользу павианов гамадрилов. Медиана распределения обученности, характеризующего максимальное количество непрерывных верных решений, у макаков резусов равна 17.0% (IQR = 11.0) у павианов гамадрилов — 40.0% (IQR = 15.5). Разница по уровню обученности у макаков и павианов достоверно составила 23.0% (критерий Манн—Уитни, $U = 31.0$, $p < 0.05$) в пользу павианов гамадрилов. Установлена зависимость между уровнем обученности и обучаемости, выражающаяся значениями коэффициента корреляции Спирмена: $r = 0.7$ ($p < 0.05$) для макаков резусов и $r = 0.4$ ($p < 0.05$) для павианов гамадрилов, это означает, что обученность у резусов сильнее связана с уровнем обучаемости, чем у павианов гамадрилов.

Анализ динамики обучения в исследуемых группах макаков резусов и павианов гамадрилов показывает следующее. В целом в исследуемых группах наблюдается сходная динамика формирования навыка — постепенное увеличение среднего количества верных решений с 1-го по 4-й интервал предъявлений и небольшой спад в течение 5-го интервала. Однако значения корреляции Спирмена ($r = 0.4$, $p < 0.05$), критерия Манна—Уитни ($U = 367.0$, $p < 0.05$) между динамическими рядами обеих групп, а также детальный анализ данных по интервалам в 10-ти предъявлениях (табл. 1.) указывает на определенные различия в динамике обучения между исследуемыми группами макаков резусов и павианов гамадрилов.

В группе макаков резусов достоверное увеличение среднего количества верных решений наблюдается при переходе к 4-му интервалу предъявлений, а в группе павианов гамадрилов достоверное увеличение среднего количества верных решений выявляется уже при переходе ко 2-му интервалу. То есть, при сходной положительной динамике, отмечаемой у обоих видов обезьян, у макаков резусов увеличение количества верных решений происходит плавно и достигает пика к 4-му интервалу. У павианов гамадрилов сразу же после 1-го интервала отмечается резкий скачок количества верных решений, хотя пик верных решений также достигается к 4-му интервалу. На более высокую скорость и интенсивность обучения в группе павианов по сравнению с группой резусов также указывают различия в значениях коэффициентов прироста, которые составляют 5.2% у павианов гамадрилов и 1.0% у макаков резусов.

Обращают на себя внимание выраженные различия в разбросе индивидуальных показателей макаков и павианов. Анализ индивидуальных различий показал, что у макаков резусов максимальное значение уровня обучаемости — 100.0%, минимальное значение — 32.0%, максимальное значение уровня обученности — 100.0%, минимальное значение 6.0%. У павианов гамадрилов максимальное значение уровня обучаемости — 94.0%, минимальное значение — 66.0%, максимальное значение уровня обученности — 68.0%, минимальное значение — 20.0%. При этом коэффициент вариации у макаков резусов по параметру обучаемости составил 29.4%, по параметру обученности — 100.1%, у павианов гамадрилов по параметру обучаемости — 13.6%, по параметру обученности — 35.6%. Исходя из этого, следует сделать вывод, что по обоим используемым параметрам — обучаемость и обученность, исследуемая группа павианов более однородна, чем группа макаков резусов. Это подтверждает и распределение животных по условным группам в зависимости от уровня обучаемости и обученности (рис. 1). Так, по уровню обучаемости (рис. 1А) макаки резусы распределились от 31–40 до 91–100% верных решений с пиком 61–70% верных решений, а павианы гамадрилы — от 61–70 до 91–100% верных решений с пиком 71–80% верных решений. По уровню обученности (рис. 1Б) макаки резусы распределились от 1–10 до 91–100% непрерывных верных решений с выраженным пиком 11–20% непрерывных верных решений, а павианы гамадрилы — от 11–20 до

Таблица 1. Показатели динамики обучения в исследуемых группах макаков резусов и павианов гамадрилов
Table 1. Indicators of the dynamics of learning in the studied groups of rhesus macaques and hamadryas baboons

Интервал Interval	Макаки резусы Rhesus monkeys			Павианы гамадрилы Hamadryas baboons		
	Среднее значение верных решений по интервалу (%) ($\pm$ SEM) Average value of correct decisions over the interval (%) ($\pm$ SEM)	Разница между средними по соседним интервалам (%) (критерий Манна–Уитни, (U)) The difference between the averages of adjacent slots (%) (Mann–Whitney U test, (U))	Темп прироста верных решений (%) The rate of growth of correct decisions (%)	Среднее значение верных решений по интервалу (%) ($\pm$ SEM) Average value of correct decisions over the interval (%) ($\pm$ SEM)	Разница между средними по соседним интервалам (%) (критерий Манна–Уитни, (U)) The difference between the averages of adjacent slots (%) (Mann–Whitney U test, (U))	Темп прироста верных решений (%) The rate of growth of correct decisions (%)
1-й интервал 1 interval	51.7 $\pm$ 3.7	–	–	46.7 $\pm$ 5.9	–	–
2-й интервал 2 interval	60.0 $\pm$ 4.8	8.3 (U = 33.5)	16.1	75.8 $\pm$ 4.7	29.2 (U = 10.0*)	62.5
3-й интервал 3 interval	70.0 $\pm$ 4.3	10.0 (U = 33.5)	16.7	85.8 $\pm$ 2.8	10.0 (U = 30.5)	13.2
4-й интервал 4 interval	82.5 $\pm$ 4.0	12.5 (U = 24.0*)	17.9	91.7 $\pm$ 2.5	5.8 (U = 31.0)	6.8
5-й интервал 5 interval	78.3 $\pm$ 3.6	4.2 (U = 37.5)	–5.1	90.0 $\pm$ 2.7	1.7 (U = 44.0)	–1.8
Дисперсионный анализ (критерий Фридмана) Analysis of variance (Friedman test)	p = 0.002			p = 0.0001		

* Достоверные различия (критерий Манна–Уитни, (U) при $p < 0.05$).

* Significant differences (Mann–Whitney U test, (U) at $p < 0.05$).

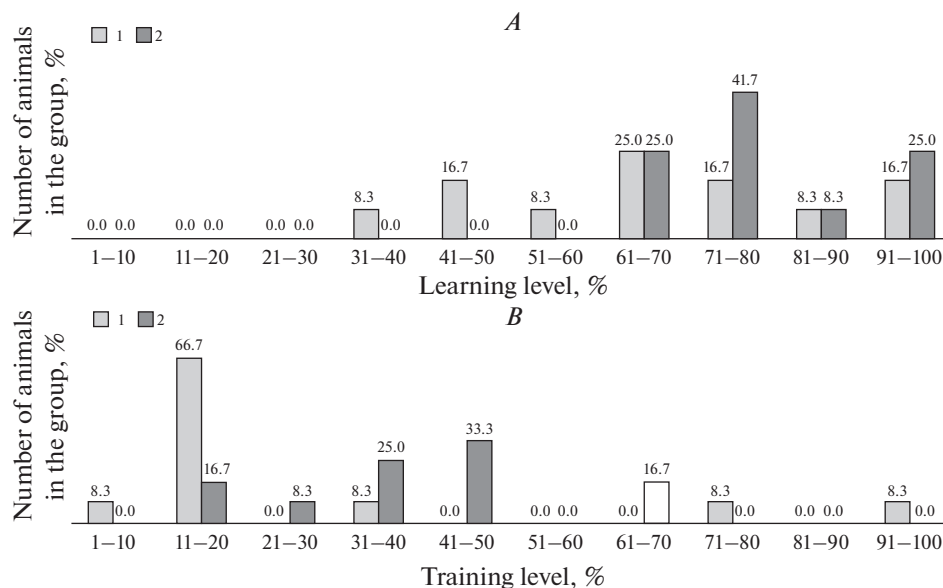


Рис. 1. Распределение обезьян исследуемых групп по (А) уровню обучаемости и (В) уровню обученности.

Обозначения: 1 – макаки резусы; 2 – павианы гамадрилы.

Ось х: (А) Уровень обучаемости (%), (В) Уровень обученности (%). Ось у: (А, В) Количество животных в группе (%).

Fig. 1. Distribution monkey study groups on (А) the level of learning and (В) the level of training.

Note: 1 – rhesus monkeys; 2 – hamadryas baboons.

Axis x: (А) Learning level (%), (В) Training level (%). Y-axis: (А, В) Number of animals in a group (%).

61–70% непрерывных верных решений с пиком 41–50% непрерывных верных решений.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты анализа данных обучения макаков резусов и павианов гамадрилов простому тесту на выбор емкости с приманкой, в зависимости от ее положения, показывают, что по основным характеристикам способностей к обучению в этом тесте павианы гамадрилы демонстрируют более высокие показатели, чем макаки резусы. Отмечено некоторое преобладание павианов над макаками в среднем количестве правильных решений (обучаемость), а также достоверное превышение павианов гамадрилов в среднем количестве повторяющихся правильных решений (обученность), что в целом отражает как различный потенциал к обучению у обезьян этих видов, так и достигаемые ими средние результаты. Обращают на себя внимание выявленные у обезьян этих двух видов различия в динамике процесса обучения, свидетельствующие о более высокой скорости процесса обучения павианов по сравнению с макаками. Можно предположить, что макаки резусы при данной постановке эксперимента (при равном количестве предъявлений) просто не успевают достичь уровня обученности первых.

При анализе индивидуальных различий в способностях к обучению павианов и макаков обнаруживается более высокий уровень минимальных показателей обучаемости и обученности павианов гамадрилов по сравнению с макаками резусами. Важной особенностью павианов гамадрилов также является сравнительно более

высокая однородность показателей обучения, проявляющаяся в их более низком уровне индивидуальных различий в способности к обучению по сравнению с макаками резусами. Можно предположить, что сравнительно более низкий разброс значений по уровню обучаемости и особенно по уровню обученности у павианов гамадрилов объясняется более высокой биологической значимостью этого признака для живущих на открытых пространствах павианов, что обеспечило у них в процессе эволюции более интенсивные темпы отбраковки носителей неудачных комбинаций генов.

В целом, результаты анализа способностей к обучению навыку двух видов обезьян — макаков резусов и павианов гамадрилов показывают, что имеются достоверные различия между этими двумя видами обезьян, проявляющиеся, прежде всего, в скорости процесса обучения, степени индивидуальных различий. Обнаруженные различия хорошо согласуются с данными проведенных нами ранее сравнительных исследований [39, 40], в которых было показано, что павианы гамадрилы в сравнении с макаками резусами показывают более высокий уровень экспериментальной и манипуляционной активности, способности к сознательному выбору, так же как и способности к более успешному решению других когнитивных тестов. Когнитивные преимущества павианов по сравнению с макаками также обнаружены в других исследованиях. Так, при изучении когнитивных способностей павианов анубисов, тонкинских макаков и макаков резусов было установлено, что резусы показывают наихудшие результаты по сравнению с павианами анубисами и тонкинскими макаками в тестах на локализацию пищевого подкрепления, что, по мнению исследователей, хорошо согласуется со степенью социальной сложности у этих видов [41]. Аналогично, сравнительное исследование когнитивных способностей макаков яванских и павианов анубисов [42] показало, что павианы при выполнении пространственного теста (transposition task) демонстрируют результаты более высокие, чем результаты макаков, и приближающиеся по своим значениям к результатам антропоидов.

Полученные в настоящее и в предыдущих исследованиях результаты позволяют сделать заключение о наличии определенного преимущества в уровне когнитивных способностей павианов гамадрилов в сравнении с макаками резусами. Представляется важным, что выявленные у этих двух видов различия хорошо согласуются с различиями в величине коэффициентов энцефализации и цефализации, относительно более высокими у павианов гамадрилов по сравнению с макаками резусами.

Различия в когнитивных способностях павианов гамадрилов и макаков резусов достаточно легко могут быть объяснены, исходя из особенностей их биологии, связанных, прежде всего, с характером среды обитания, а также с образом жизни и социальной организацией. Для павианов гамадрилов, живущих в условиях засушливых полупустынь, возможность выживания определяется не столько физической силой и способностью к дальним переходам, сколько их когнитивными способностями, прежде всего, ресурсами пространственной памяти, обеспечивающей возможность запоминания источников воды и пищи, разделенных десятками километров, запоминания времени созревания плодов, способностью к решению задач, связанных с эффективной защитой членов групп в условиях открытого пространства и освоением различных приемов добывания пищи. В отличие от павианов гамадрилов, у макаков резусов нет необходимости совершать ежедневные многокилометровые переходы, запоминать расположение источников пищи и воды на десятках квадратных километрах. С этой точки зрения, обнаруженные когнитивные преимущества павианов гамадрилов полностью соответствуют основным положениям “когнитивной экологии”, введенной в научный обиход в 1993 г. Real [43]. Согласно этому автору, нервная система формирует у животных определенное представление об окружающей среде, которое выступает в

качестве основы для принятия решений и совершения действий, что приводит к образованию поведенческих реакций, которые как часть фенотипа оказываются подверженными естественному отбору [44]. Успешные модели поведения способствуют более полному и эффективному использованию ресурсов среды, повышая тем самым вероятность выживания [45].

Кроме экологических факторов, немаловажное значение, определяющее более высокий уровень когнитивных способностей, имеет социальная среда, более сложная и менее предсказуемая у павианов гамадрилов, чем у макаков резусов. Для большинства особей макаков резусов она в течение всей жизни ограничена членами своей группы, включающей в себя максимально несколько десятков родственных друг другу особей. У павианов гамадрилов численность особей в стадах достигает нескольких сотен, и мирное сосуществование в своем стаде требует от каждого животного способности различать каждого из них, отличать от членов другого стада, устанавливать с каждым членом своего стада определенные отношения, успешно сосуществовать и общаться с многочисленными неродственными членами своего стада. Когнитивные способности представляют собой целый спектр важнейших психических характеристик, необходимых для формирования сложных социальных взаимодействий. Соответственно чем сложнее группа, чем больше ее численность, тем выше должен быть уровень когнитивных способностей ее членов, в частности, то, что понимается под понятием социального интеллекта.

Одной из первых теорий, рассматривающих социальные факторы как ведущие в когнитивной эволюции приматов, является теория макиавеллевского интеллекта [22]. В соответствии с этой теорией, приоритетную роль в развитии когнитивной функции играла не инструментально-орудийная деятельность, а социальные взаимодействия, в частности, способность преуспеть в конкуренции за пищу и спаривание за счет умения перехитрить, способности манипулировать другими членами группы. Согласно другой теории — теории культурного интеллекта — большая приспособленность у приматов обеспечивается за счет увеличения возможностей обмена информацией, то есть, культурной передачи информации [46, 47]. Наконец, согласно теории социального интеллекта, когнитивная эволюция является способом решения социальных проблем, неизбежно возникающих вследствие экологических изменений [48]. Данная гипотеза находит подтверждения в исследованиях размеров мозга у приматов [49–51]. Следует отметить, что такой показатель как размер мозга сегодня все чаще связывают со сложностью социальных отношений [52] и размерами социальных групп [53]. Некоторые авторы указывают на аналогию развития крупного мозга у приматов с другими млекопитающими, связывая данный факт с социальной конкуренцией, вызванной условиями среды [54]. Исходя из этих данных, любая функция психики неразрывно связана с социальной средой. В частности, параллельно с усложнением социальной организации отмечается вполне закономерное развитие различных форм коммуникаций [55]. Однако является ли разница в социальной организации видов исключительно результатом действия экологических факторов, вопрос весьма спорный. Так, исторически обитающие в сходных условиях гориллы, шимпанзе и орангутаны в корне различны по своей социальной организации [20]. Это же наблюдается и у близкородственных видов павианов и гелад [56], которые обитают в различных условиях. Большинство исследователей сходится во мнении, что на характер социальной организации оказывает влияние множество различных факторов. Тем не менее, очевидно, что роль влияния экологических факторов на социальную организацию нельзя недооценивать. В частности, непосредственным проявлением влияния экологии на социальную организацию приматов является тот факт, что в сообществах наземных обезьян более ярко выражена мультисамцовость. Согласно распространенной точке зрения, в эволюции гоминин такая структура группы могла быть оптимальной, так

как она способствовала развитию скоординированной охоты, передаче опыта и, вероятно, давала возможность поддержки устойчивых социальных связей и распределения социальных ролей в группе [57]. Исходя из этого, логично рассматривать эволюцию гоминин как результат взаимодействия двух факторов — изменения условий обитания в сочетании с усложнением социальной среды. Можно предположить, что усложнение социальности, в определенной степени, должно было явиться неизбежным следствием перехода к наземности, изменившего структуру сообществ, численность особей в группах, характер обмена особями и формы коммуникации вышедших из леса на открытые пространства приматов. Обязательным условием выживания древних гоминин в открытых саваннах неизбежно должно было стать увеличение численности особей в группах, что, с одной стороны, обеспечило эффективность защиты от хищников, а с другой, усложнило процесс коммуникации и потребовало развития интеллекта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, сравнительное исследование способности к обучению у двух видов современных приматов, принадлежащих к одному семейству мартышковых обезьян — макаков резусов и павианов гамадрилов показывает, что ведущие наземный образ жизни и живущие большими стадами павианы гамадрилы обнаруживают более высокий уровень способности к обучению, выраженной в более высоких результатах и высокой скорости обучения, чем живущие относительно небольшими группами и ведущие преимущественно древесный образ жизни макаки резусы. Полученные результаты можно рассматривать как модель последствий очень важного для эволюции отряда приматов и происхождения человечества события — перехода ранних гоминин от древесного к наземному образу жизни. Представляется, что именно наземность и связанные с наземностью вызовы — ограниченность пищевых ресурсов, их разбросанность на большой территории, давление хищников явились, по-видимому, теми важнейшими факторами, которые определили эволюцию гоминин в направлении разумности. С этой точки зрения, полученные нами результаты являются иллюстрацией преимуществ наземности как фактора, способствующего эволюции в направлении разумности, и согласуются наилучшим образом именно с “экологической” гипотезой о происхождении разумности, согласно которой переход к наземному образу жизни явился тем главным фактором, который привел в итоге к появлению на планете *Homo sapiens*.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Грант РФФИ № 19-013-00041 А “Анализ зависимости между показателями обучения и поведенческими характеристиками у низших обезьян”, 2019–2021 гг.

ВКЛАД АВТОРОВ

А.Е. Аникаев — планирование эксперимента, сбор и анализ данных, написание и редактирование статьи; В.Г. Чалян — планирование эксперимента, написание и редактирование статьи; Н.В. Мейшвили — планирование эксперимента, написание и редактирование статьи; Е.Н. Аникаева — сбор и анализ данных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Полетаева И.И., Перепелкина О.В., Зорина З.А. Когнитивные способности животных (рассудочная деятельность) в свете генетических представлений. Вавиловский журн. генетики и селекции. 21(4): 421–426. 2017. [Poletaeva I.I., Perepelkina O.V., Zorina Z.A. Cognitive abilities of animals (rational activity) in the light of genetic ideas. Vavilov J. Genetics and

- Selection. 21(4): 421–426. 2017. (In Russ)].
<https://doi.org/10.18699/VJ17.260>
2. Биологические основы рассудочной деятельности. Эволюционный и физиолого-генетический аспекты поведения. Под ред. Крушинского Л.А. М. URSS. 2009. [Biologicheskiye osnovy rassudochnoy deyatel'nosti. Evolyutsionnyy i fiziologo-geneticheskiy aspekty povedeniya [Biological bases of rational activity. Evolutionary and physiological and genetic aspects of behavior]. Ed. *Krushinsky L.A.* Moscow. URSS. 2009. (In Russ)].
 3. *Rumbaugh D.M., Pate J.L.* The evolution of cognition in primates: A comparative perspective. *Animal Cognition*. 569–587. 1984.
 4. *Schwartz B.L.* Using Natural Ecology to Predict Higher Cognition in Human and Non-human Primates. *Animal Behavior and Cognition*. 6(4): 344–354. 2019.
<https://doi.org/10.26451/abc.06.04.13.2019>
 5. *Зорина З.А., Смирнова А.А.* История и методы экспериментального изучения мышления животных. Совр. эксперимент. психология в 2 т., т. 4. М. 61–87. 2011. [*Zorina Z.A., Smirnova A.A.* History and methods of experimental study of animal thinking. *Contempor. Exp. Psychol.* v 2 t., gl. 4. М. 61–87. 2011. (In Russ)].
 6. *Alba D.M.* Cognitive inferences in fossil apes (Primates, Hominoidea): does encephalization reflect intelligence? *J. Anthropol. Sci.* 88: 11–48. 2010.
 7. *Byrne R.W.* Evolution of primate cognition. *Cognitive Science*. 24(3): 543–570. 2000.
https://doi.org/10.1207/s15516709cog2403_8
 8. *Chernigovskaya T.V.* The mirror brain, concepts, and language: The price of anthropogenesis. *Neurosci. Behav. Physiol.* 37(3): 293–302. 2007.
<https://doi.org/10.1007/s11055-007-0014-7>
 9. *Deaner R.O., Isler K., Burkart J., van Schaik C.* Overall brain size, and not encephalization quotient, best predicts cognitive ability across non-human primates. *Brain, Behavior and Evolution*. 70(2): 115–124. 2007.
<https://doi.org/10.1159/000102973>
 10. *Vandenbergh J.G.* The development of social structure in free-ranging rhesus monkeys. *Behaviour*. 29(2–4): 179–193. 1967.
<https://doi.org/10.1163/156853967x00109>
 11. *Mertz J., Surreault A., van de Waal E., Botting J.* Primates are living links to our past: The contribution of comparative studies with wild vervet monkeys to the field of social cognition. *Science Direct. Cortex*. 118. 65–81. 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.cortex.2019.03.007>
 12. *Matsuzawa T.* Primate foundations of human intelligence: a view of tool use in nonhuman primates and fossil hominids. In: *Primate origins of human cognition and behavior*. Tokyo. Springer. 3–25. 2008.
https://doi.org/10.1007/978-4-431-09423-4_1
 13. *Povinelli D.J., Rulf A.B., Landau K.R., Bierschwale D.T.* Self-recognition in chimpanzees (*Pan troglodytes*): distribution, ontogeny, and patterns of emergence. *J. Compar. Psychol.* 107(4): 347–372. 1993.
<https://doi.org/10.1037/0735-7036.107.4.347>
 14. *Alexander R.D.* The evolution of the human psyche. In: *The Human Revolution*. *Stringer C., Mellars P.* (Eds.). Edinburgh: University of Edinburgh Press. 455–513. 1989.
 15. *Barrett L., Henzi P., Dunbar R.* Primate cognition: from ‘what now?’ to ‘what if?’. *Trends in Cognitive Sciences*. 7(11): 494–497. 2003.
<https://doi.org/10.1016/j.tics.2003.09.005>
 16. *Flinn M.V., Geary D.C., Ward C.V.* Ecological dominance, social competition, and coalitionary arms races: Why humans evolved extraordinary intelligence. *Evolution and Human Behavior*. 26(1): 10–46. 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.evolhumbehav.2004.08.005>
 17. *Shettleworth S.J.* Animal cognition and animal behavior. *Animal behaviour*. 61(2): 277–286. 2001.
<https://doi.org/10.1006/anbe.2000.1606>
 18. Человек в лабиринте эволюции. Под ред. Вишняцкого Л.Б. М. Весь Мир. 2004. [Chelovek v labirinte evolyutsii [Man in the labyrinth of evolution]. Ed. *Vishnyatsky L.B.* Moscow. Ves' Mir. 2004. (In Russ)].
 19. Большой иллюстрированный атлас первобытного человека. Под ред. Елинека Я., Фиштейна Е.В., Алексеева В.П. Прага. Артис. 1982. [Bol'shoy illyustrirovanny atlas pervobytnogo cheloveka [Large illustrated atlas of primitive man]. Eds. *Jelinek J., Fishtein E., Alekseev V.P.* Prague. Artia. 1982. (In Russ)].
 20. Интеллект и язык: Животные и человек в зеркале экспериментов. Под ред. Резниковой Ж.И. М. Наука. 2000. [Intellekt i yazyk: Zhivotnyye i chelovek v zerkale eksperimentov [Intelligence and Language: Animals and Man in the Mirror of Experiments] Moscow. Nauka. 2000. (In Russ)].

21. Kummer H. Social knowledge in free-ranging primates. *Animal mind—human mind*. Berlin Heidelberg. Springer. 113–130. 1982.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-68469-2_7
22. Gibson K. Biological Anthropology: Machiavellian Intelligence: Social Expertise and the Evolution of Intellect in Monkeys, Apes, and Humans. *Am. Anthropologist*. 91(2): 516–517. 1989.
<https://doi.org/10.1525/aa.1989.91.2.02a00840>
23. Рогинский Я.Я. Квадратический весовой указатель мозга. *Антропол. журн.* 1:2. 1933. [Roginsky J.J. Brain square weighted index. *Anthropol. J.* 1: 2. 1933 (In Russ)].
24. Jerison H. *Evolution of the Brain and Intelligence*. Elsevier. 2012.
25. Lynn R. The evolution of racial differences in intelligence. *Mankind Quarterly*. 32(1): 99–121. 1991.
<https://doi.org/10.46469/mq.1991.32.1.7>
26. Watanabe-Sawaguchi K., Kubota K., Arikuni T. Cytoarchitecture and intrafrontal connections of the frontal cortex of the brain of the hamadryas baboon (*Papio hamadryas*). *J. Compar. Neurol.* 311(1): 108–133. 1991.
<https://doi.org/10.1002/cne.903110109>
27. Kummer H. *Social organization of hamadryas baboons*. Chicago. University of Chicago Press. 1968.
28. Обезьяна — объект медицинских и биологических экспериментов. Под ред. Лапина Б.А. Изд-во АМН СССР. 1963. [Obez'yana — ob'yekt meditsinskikh i biologicheskikh eksperimentov [The monkey is the object of medical and biological experiments]. Ed. Lapin B.A. USSR Academy of Medical Sciences. 1963. (In Russ)].
29. Altshul D.M., Terrace H.S., Weiss A. Serial Cognition and Personality in Macaques. *Animal Behavior and Cognition*. 3(1): 46–64. 2016.
<https://doi.org/10.12966/abc.02.04.2016>
30. Drucker C., Brannon E. Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) map number onto space. *Cognition*. 132(1): 57–67. 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.cognition.2014.03.011>
31. Herman R.A., Wallen K. Cognitive Performance in Rhesus Monkeys Varies by Sex and Prenatal Androgen Exposure. *Horm. Behav.* 51(4): 496–507. 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.01.005>
32. Podvigina D.N., Ivanova L.E., Varovin I.A., Harauzov A.K. Studies of the Cognitive Abilities of Rhesus Macaques. *Neurosci. Behav. Physiol.* 50(2): 183–191. 2020.
<https://doi.org/10.1007/s11055-019-00886-x>
33. Marsh H.L., Vining A.Q., Levendoski E.K., Judge P.G. Inference by exclusion in lion-tailed macaques, a hamadryas baboon, capuchins and squirrel monkeys. *J. Compar. Psychol.* 129(3): 256–267. 2015.
<https://doi.org/10.1037/a0039316>
34. Huebner F., Fishler C., Kappeler P. Linking cognition with fitness in a wild primate: fitness correlates of problem-solving performance and spatial learning ability. *Philosophical Transactions of the Royal Society B. Biol. Sci.* 373(1756). 2018.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0295>
35. MacLean E.L., Sandel A.A., Bray J., Oldencamp R.E., Reddy R.B., Hare B.A. Group Size Predicts Social but not Nonsocial Cognition in Lemurs. *PloS One*. 8(6). 2013.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066359>
36. Anikaev A.E., Chalyan V.G., Meishvili N.V. Studies of Learning Skills with Different Levels of Difficulty in Hamadryas Baboons (*Papio hamadryas*). *Neurosci. Behav. Physiol.* 50(7): 881–891. 2020.
<https://doi.org/10.31857/s0044467720010037>
37. Anikaev A.E., Chalyan V.G., Meishvili N.V. Parameters of Experimental Activity in the Study of the Cognitive Abilities of Rhesus Monkeys (*Macaca mulatta*) and Baboons (*Papio hamadryas*). *Bull. Exp. Biol. Med.* 168 (6): 793–796. 2020.
<https://doi.org/10.1007/s10517-020-04804-x>
38. National Research Council. *Guide for the care and use of laboratory animals*. Nation. Acad. Press. Washington, 246. 2011.
<https://doi.org/10.17226/25801>
39. Аникаев А.Е., Чалян В.Г., Мейшвили Н.В. Сравнительное исследование способности к сознательному выбору у макаков резусов (*Macaca mulatta*) и павианов гамадрилов (*Papio hamadryas*). *Вестник Московск. универ. Серия 23. Антропология*. 4: 74–87. 2014. [Anikaev A.E., Chalyan V.G., Meishvili N.V. Comparative study of the capacity for conscious choice in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) and hamadryas baboons (*Papio hamadryas*). *Moscow Univer. Anthropol. Bull.* 4: 74–87. 2014. (In Russ)].
40. Аникаев А.Е., Чалян В.Г., Мейшвили Н.В. Сравнительное исследование когнитивных способностей павианов гамадрилов (*Papio hamadryas*) и макаков резусов (*Macaca mulatta*) при решении задач на манипулирование. *Вестник Московск. универ. Серия 23. Антропология*. 4: 93–102. 2013. [Anikaev A.E., Chalyan V.G., Meishvili N.V. Comparative study of the cognitive abilities of hamadryas baboons (*Papio hamadryas*) and rhesus monkeys (*Macaca*

- ca mulatta) in solving manipulation problems. Moscow Univer. Anthropol. Bull. 4: 93–102. 2013. (In Russ)].
41. *Petit O., Dufour V., Herrenschmidt M., De Marco A., Sterck E., Call J.* Inferences about food location in three cercopithecine species: an insight into the socioecological cognition of primates. *Animal Cognition*. 18: 821–830. 2015.
42. *Sánchez M.M., Hearn E.F., Do D., Rilling J.K., Herndon J.G.* Differential rearing affects corpus callosum size and cognitive function of rhesus monkeys. *Brain Res*. 812(1): 38–49. 1998. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)00857-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)00857-9)
43. *Real L.A.* Toward a cognitive ecology. *Trends Ecology & Evolution*. 8(11): 413–417. 1993. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(93\)90044-p](https://doi.org/10.1016/0169-5347(93)90044-p)
44. *Real L.A.* Information processing and the evolutionary ecology of cognitive architecture. *The American Naturalist*. 140: S108–S145. 1992. <https://doi.org/10.1086/285399>
45. *Real L.A.* Animal choice behavior and the evolution of cognitive architecture. *Science*. 253(5023): 980–986. 1991. <https://doi.org/10.1126/science.1887231>
46. *Muthikrishna M., Heinrich J.* Innovation in the collective brain. *Phil. Trans. R. Soc. B: Biol. Sci.* 371(1690): 20150192. 2016. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0192>
47. *Reader S.M., Hager Y., Laland K.N.* The evolution of primate general and cultural intelligence. *Phil. Trans. R. Soc. B*. 366(1567): 1017–1027. 2011. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0342>
48. *Dunbar R.I.M.* The social brain hypothesis. *Evol. Anthropol.* 6(5): 178–190. 1998. <https://doi.org/10.1080/03014460902960289>
49. *Bailey D.H., Geary D.C.* Hominid brain evolution. *Human Nature*. 20(1): 67–79. 2009. <https://doi.org/10.1007/s12110-008-9054-0>
50. *Powell J.L., Lewis P.A., Dunbar R.I.M., García-Fiñana M., Roberts N.* Orbital prefrontal cortex volume correlates with social cognitive competence. *Neuropsychologia*. 48(12): 3554–3562. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2010.08.004>
51. *Washburn D.A., Smith J.D., Shields W.E.* Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) immediately generalize the uncertain response. *J. Exp. Psychol.: Animal Behavior Processes*. 32(2): 185–189. 2006. <https://doi.org/10.1037/0097-7403.32.2.185>
52. *Dunbar R.I.M., Shultz S.* Evolution in the social brain. *Science*. 317(5843): 1344–1347. 2007. <https://doi.org/10.1126/science.1145463>
53. *Lehmann J., Dunbar R.I.M.* cohesion, group size and neocortex size in female-bonded Old World primates. *Proceed. Royal Soc. B: Biol. Sci.* 276(1677): 4417–4422. 2009. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.1409>
54. *Connor R.C.* Dolphin social intelligence: complex alliance relationships in bottlenose dolphins and a consideration of selective environments for extreme brain size evolution in mammals. *Philosoph. Transact. Royal Soc. B: Biol. Sci.* 362(1480): 587–602. 2007. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1997>
55. Предыстория общества. Под ред. *Тух H.A.* Л. Изд-во Ленингр. ун-та. 1970. [Predystoriya obshchestva [Prehistory of society] Leningrad. Publ. House of the Leningrad Unvers. 1970. (In Russ)].
56. *Altmann S.A.* A field study of the sociobiology of rhesus monkeys, macaca mulatta. *Ann. NY Acad. Sci.* 102 (2): 338–435. 1962.
57. У истоков человеческого общества: Поведенческие аспекты эволюции человека. Под ред. *Бутовской М.Л., Файнберга Л.А.* М. Наука. 1993. [U istokov chelovecheskogo obshchestva: Povedencheskiye aspekty evolyutsii cheloveka [At the Origins of Human Society: Behavioral Aspects of Human Evolution]. Eds. *Butovskaya M.L., Faynberg L.A.* Moscow. Nauka. 1993. (In Russ)].

Comparison of the Learning Ability of *Macaca mulatta* and *Papio hamadryas* in Light of Creating a Model of Cognitive Evolution in Primates

A. E. Anikayev^{a,*}, V. G. Chalyan^a, N. V. Meishvili^a, and E. N. Anikaeva^a

^aFederal State Budgetary Scientific Institution: Scientific Research Institute of Medical Primatology: (FSBI “SRI MP”), Sochi, Russia

*e-mail: mg_anykey@mail.ru

A comparative study of the learning ability in two species of lower monkeys, rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) and hamadryas baboons (*Papio hamadryas*), was used as a hypo-

thetical model for the development of cognitive abilities in primates during such an evolutionary event as the transition from an arboreal lifestyle to a terrestrial one. It was found that in male rhesus monkeys the average level of learning was $68.5 \pm 5.8\%$, in male hamadryas baboons — $78.0 \pm 3.1\%$. The median of the distribution of learning, which characterizes the maximum number of continuous correct decisions, in rhesus monkeys is 17.0% (interquartile range, IQR = 11.0); in hamadryas baboons — 40.0% (IQR = 15.5). In the studied groups of monkeys, certain differences were found in the dynamics of skill formation. Our results illustrate the advantages of terrestriality as a factor contributing to evolution towards rationality, and are in the best possible way with the “ecological” hypothesis of the development of cognitive abilities.

Keywords: hamadryas baboons, rhesus monkeys, skill formation, training, learning, anthropogenesis

ЦИТИРОВАТЬ:

Аникаев А.Е., Чалян В.Г., Мейшвили Н.В., Аникаева Е.Н. Сравнение способности к обучению макаков резусов (*Macaca mulatta*) и павианов гамадрилов (*Papio hamadryas*) в свете создания модели когнитивной эволюции приматов. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 107(3): 382–396. 2021.

DOI: 10.31857/S086981392103002X

TO CITE THIS ARTICLE:

Anikayev A. E., Chalyan V. G., Meishvili N. V., Anikaeva E. N. Comparison of the learning ability of *Macaca mulatta* and *Papio hamadryas* in light of creating a model of cognitive evolution in primates. Russian Journal of Physiology. 107(3): 382–396. 2021.

DOI: 10.31857/S086981392103002X