РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА Том 106, № 9, 2020

СОДЕРЖАНИЕ

Экспериментальные статьи	
Регенерация нервных волокон седалищного нерва крысы после повреждения и введения мезенхимных стволовых клеток <i>Е. С. Петрова, Е. А. Колос</i>	1059
Эффекты острого стресса у мышей, различающихся чувствительностью 5-HT _{1A} -рецепторов к хронической активации с помощью 8-OH-DPAT <i>Е. М. Кондаурова, Е. В. Антонов, Е. Ю. Баженова,</i> <i>Д. В. Базовкина, В. С. Науменко</i>	1069
Изменение характера поведения и активности гипофизарно-адренокортикальной системы крыс — потомков отцов, подвергнутых стрессированию в парадигме "стресс—рестресс" перед спариванием <i>Н. Э. Ордян, С. Г. Пивина, В. К. Акулова, Г. И. Холова</i>	1085
 Evaluation of the t-system of rat cardiomyocytes during early stages of streptozotocin-induced diabetes <i>I. V. Kubasov, D. E. Bobkov, A. V. Stepanov, I. B. Sukhov,</i> <i>O. V. Chistyakova, and M. G. Dobretsov</i> 	1098
Влияние Roux-en-Y гастрошунтирования и продольной резекции желудка на метаболические и гормональные показатели и гипоталамический сигналинг у крыс с диабетом 2 типа О. В. Корнюшин, К. В. Деркач, И. Б. Сухов, А. С. Полозов, Е. В. Савочкина, В. В. Маслей, А. Э. Егорова, А. А. Бахтюков, А. О. Шпаков	1109
Роль тканевого эритропоэтина и механизмов обратной связи в локальной регуляции эритропоэза <i>Н. В. Тишевская, С. А. Шевяков</i>	1122
Влияние экзогенного фибрин-мономера на гемостатический потенциал и образование фибрина в области дозированной травмы печени в эксперименте В. М. Вдовин, А. П. Момот, Д. А. Орехов, И. П. Бобров, Д. А. Момот, И. И. Шахматов, В. О. Красюкова, В. Е. Чернусь, В. В. Теряев, Н. А. Лычёва, С. В. Москаленко	1132
Влияние реальной микрогравитации на мышечную архитектуру и функцию скелетной мышцы человека Ю. А. Коряк	1144
Метолические статьи	
Способ создания нейрофизиологической модели простой нервной системы,	
обладающей реверберацией	1163
Скрининговый метод оценки пространственной и временной разрешающей	1105
способности слуха при локализации движения по азимутальной координате А. П. Гвоздева, В. М. Ситдиков, И. Г. Андреева	1170

-

Experimental Articles

1059
1069
1085
1098
1109
1122
1132
1144
1163
1170

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 9, с. 1059-1068

— ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ —

РЕГЕНЕРАЦИЯ НЕРВНЫХ ВОЛОКОН СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА КРЫСЫ ПОСЛЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ И ВВЕДЕНИЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

© 2020 г. Е. С. Петрова^{1, *}, Е. А. Колос¹

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия *E-mail: iempes@yandex.ru

> Поступила в редакцию 11.03.2020 г. После доработки 18.04.2020 г. Принята к публикации 20.04.2020 г.

В экспериментальных исследованиях, посвященных поиску способов стимуляции регенерации поврежденных нервных проводников, часто используются мезенхимные стволовые клетки (МСК). Целью настоящей работы явилось изучение влияния субпериневрального введения МСК на регенерирующие волокна поврежденного седалищного нерва крысы с использованием иммуногистохимического выявления периферина. Была проведена трансплантация суспензии МСК костного мозга крыс Вистар-Киото (5 × 10⁴ клеток в 5 мкл среды) в поврежденный путем наложения лигатуры (40 с) седалищный нерв взрослых животных. Контрольной группе животных после наложения лигатуры субпериневрально вводили 5 мкл среды. Через 2 мес. после операции на поперечных срезах, проходящих через дистальный сегмент нерва реципиента, проводили подсчет и измерение периферин-иммунопозитивных регенерирующих нервных волокон. Морфометрический анализ регенерирующих волокон, выполненный с помощью программы ImageJ (NIH, США), показал, что средняя толщина нервных волокон у животных подопытной группы достоверно увеличивалась по сравнению с контролем. Изучение распределения нервных волокон дистального сегмента поврежденного нерва по толщине показало, что у животных, получивших однократную трансплантацию МСК, процентное содержание волокон большего диаметра выше, чем у животных контрольной группы.

Ключевые слова: нерв, мезенхимные стволовые клетки, нервные волокна, периферин, иммуногистохимия

DOI: 10.31857/S0869813920070055

Актуальность проблемы восстановления периферических нервных проводников связана с высокой частотой их травмирования в результате переломов и ушибов и недостатком фундаментальных знаний о молекулярной регуляции процессов дегенерации и регенерации нервов. Применение современных хирургических подходов к восстановлению поврежденного нерва таких, как нейропластика и совершенствование шовной техники, не всегда приводит к восстановлению функций нервного проводника. В настоящее время разрабатываются новые способы восстановления проводников с помощью создания специальных конструкций – кондуитов, соединяющих проксимальный и дистальный сегменты поврежденного периферического нерва [1–4]. Ведется разработка синтетических и натуральных материалов для создания таких кондуитов и их наполнителей, имитирующих

структуру эндоневрия. Следует отметить, что в хирургической практике, по-прежнему, оптимальным методом для соединения дистального и проксимального концов поврежденного проводника является использование аутотрансплантации сегмента нерва. Это связано с тем, что микроокружение нервных волокон должно содержать необходимые для осуществления регенерации аксонов сигнальные молекулы, факторы роста и белки экстрацеллюлярного матрикса. С целью создания такого микроокружения для регенерирующих аксонов периферических нервных проводников в экспериментальных исследованиях наряду с нейропластикой и использованием специальных кондуитов активно применяется клеточная и генная терапия [3, 5–10]. В качестве клеточной терапии наиболее часто используют мезенхимные стволовые клетки (МСК). МСК – мультипотентные клетки, вырабатывающие большое число ростовых и трофических факторов, обладающие способностью модулировать иммунные процессы и влиять на репаративные процессы в различных тканях и органах [11, 12].

В течение последних двадцати лет было выполнено множество экспериментальных исследований с применением МСК для стимуляции регенерации периферических нервных проводников, в большинстве случаев отмечено благоприятное воздействие клеточной терапии с применением МСК на восстановление нерва в эксперименте, результаты этих исследований обобщены в ряде обзоров [7, 10, 13]. Однако механизмы влияния экзогенных МСК на восстановление поврежденных нервов до сих пор неясны. Эффект клеточной терапии зависит от многих факторов: от источника получения МСК (из жировой ткани, костного мозга, пупочного канатика, амниотической жидкости и др.), от способа введения клеток в организм реципиента (в кровоток, в кондуит, соединяющий проксимальный и дистальный сегменты поврежденного нервного проводника, непосредственно в нервный ствол), от количества пересаженных клеток. Для изучения влияния экзогенных МСК на репаративные процессы в нерве реципиента применяют различные модели повреждения (перерезка с последующим сшиванием или соединением с помощью биологического или искусственного кондуита, передавливание зажимом и др.). В настоящем исследовании использована модель повреждения нервного проводника путем наложения лигатуры в течение времени, достаточного для того, чтобы вследствие такой травмы в дистальном сегменте начались процессы валлеровской дегенерации с последующей регенерацией волокон. Это удобная модель, позволяющая изучать регенерацию нервных волокон как после травмы, так и после применения клеточной терапии [14]. Она позволяет решать такие фундаментальные вопросы, как изучение судьбы пересаженных в поврежденный нервный ствол клеток, взаимоотношения МСК с клетками реципиента, их влияние на изменение васкуляризации нерва реципиента и другие [15, 16].

Наше предыдущее исследование было посвящено изучению судьбы пересаженных в поврежденный нерв крыс Вистар—Киото МСК костного мозга крыс той же линии [15]. Было показано, что меченные бромдезоксиуридином МСК идентифицируются в нервном стволе, а также оболочках нерва реципиента, в течение 7 сут после пересадки [15]. Целью настоящей работы явилось изучение влияния субпериневрального введения МСК на регенерирующие волокна передавленного седалищного нерва крысы с использованием иммуногистохимического выявления периферина.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании использовали крыс линии Вистар–Киото массой 200–250 г (*n* = 36; по 12 животных на группу). При работе с животными руководствовались международными правилами Европейского сообщества по гуманному обращению с экспериментальными животными и "Правилами проведения исследований с использованием экспериментальных животных" (Приказ № 755 от 12.08.1977, Министерство Здравоохранение РФ). Исследование было одобрено этическим комитетом Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Институт экспериментальной медицины" (протокол № 3/17 от 30.11.2017).

Повреждение седалищных нервов крыс и трансплантацию МСК осуществляли, используя микроскоп МБС-2 (ЛОМО, Россия) по методу, описанному в предыдущих исследованиях [14, 15]. Под эфирным наркозом проводили операцию: на уровне верхней трети бедра крысы после эпиляции делали разрез кожи размером 1-1.5 см, рассекали подлежащие мышцы и фиксировали седалищный нерв на стеклянной палочке, затем накладывали лигатуру в течение 40 с. Подопытной группе животных под периневрий одного из нервных стволов седалищного нерва вводили суспензию MCK (5 × 10⁴ в 5 мкл культуральной среды). Животным контрольной группы вводили культуральную среду в том же объеме. МСК костного мозга крыс Вистар-Киото были получены в ООО Транс-Технологии (ген. директор к. б. н. Д.Г. Полынцев). Характеристика используемых для трансплантации МСК подробно представлена в работе Зиньковой и соавт. [17]. МСК выделяли из костного мозга бедренной кости крыс Вистар-Киото и культивировали в стандартных условиях. Проведенное фенотипирование показало, что 97% клеточной суспензии экспрессируют на поверхности CD90+. Продемонстрировано, что клетки сохраняют способность к дифференцировке в нескольких направлениях в определенных условиях in vitro [17]. Используемые для трансплантации клетки в культуре обладают свойством адгезивности, имеют характерную для МСК фибробластоподобную форму и экспрессируют виментин [15].

Животных содержали в стандартных условиях вивария без ограничения доступа к воде и пище. Через 2 мес. после операции животных умершвляли передозировкой паров этилового эфира; дистальнее места наложения лигатуры выделяли сегменты нерва размером 3-4 мм и фиксировали в растворе цинк-этанол-формальдегида [18]. Фиксация осуществлялась в течение 24 ч, затем материал обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и ксилоле и заливали в парафин. Поперечные срезы седалищных нервов толщиной 5 мкм изготавливались на ротационном микротоме фирмы Pfm Rotary 3003 (PFM, Германия). Для идентификации нервных волокон проводили иммуногистохимическую реакцию на периферин. Периферин – белок промежуточных филаментов, маркер периферических нервных аксонов [19]. Первичные антитела наносили на депарафинированные срезы. В качестве первичных антител использовали кроличьи поликлональные антитела к периферину (Аbcam, Великобритания). В качестве вторичных антител применяли реагенты из набора Reveal Polyvalent HRP/DAB Detection System kit (SpringBioscience, США). Визуализацию продукта иммуногистохимической реакции проводили при помощи диаминобензидинового хромогена (DAB+) (Agilent, CША; pahee Dako, Дания). После проведения реакций часть срезов подкрашивали астровым синим для обзорного гистологического анализа препаратов. Для проведения морфометрического анализа с применением программы ImageJ использовали только неподкрашенные срезы.

Гистологические препараты анализировали с использованием светового микроскопа Leica DM750 (Германия) и цифровой фотокамеры ICC50 (Leica, Германия). Для обработки изображений использовалось программное обеспечение LAS EZ (Leica, Германия). Измерение количества и площади регенерирующих аксонов осуществляли на поперечных срезах через нерв, используя программу ImageJ (NIH, США). Подсчет нервных волокон проводили на 2–3 изображениях площадью 82365.2 мкм², выполненных при увеличении микроскопа ×400, с последую-



Рис. 1. Фрагменты поперечных срезов через седалищный нерв крыс. A – интактный нерв; B – дистальный сегмент регенерирующего нерва через 2 мес. после наложения лигатуры; C – дистальный конец через 2 мес. после наложения лигатуры; C – дистальный конец через 2 мес. после наложения лигатуры и введения МСК. Иммуногистохимическая реакция на периферин, подкраска астровым синим (A), без подкраски (B, C). Масштабный отрезок равен 50 мкм. **Fig. 1.** Fragments of transverse sections through the sciatic nerve of rats. A – intact nerve; B – the distal segment of the nerve 2 months after the ligature; C – the distal segment of the nerve 2 months after ligature and MSC transplantation. Immunohistochemical reaction to peripherin, astro-blue staining (A), without astro-blue staining (B, C). Scale, 50 µm.

щим пересчетом на 1 мм². Сравнительные исследования проводили между двумя группами животных: 1. интактные крысы и крысы с лигатурой; 2. крысы с лигатурой и крысы с лигатурой и введением МСК. Данные гистограмм приведены как среднее значение в группе со стандартным отклонением. Различия определяли по *t*-критерию при p < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование поперечных срезов через интактный седалищный нерв крысы подтвердило, что периферин является селективным маркером периферических нервных волокон и четко визуализируется в их осевых цилиндрах (рис. 1). Периферин — белок промежуточных филаментов с молекулярной массой 57 кД, который наряду с тубулином и актином участвует в процессе элонгации нервных волокон в поврежденных нервных стволах и применяется для исследования структур периферической нервной системы [19, 20]. Шванновские клетки (нейролеммоциты) и другие структурные элементы нерва (клетки эндоневрия, кровеносных сосудов, периневральной и эпиневральной оболочек) при этом не окрашиваются. Это дает возможность проводить подсчет нервных волокон на единицу площади нервного ствола, используя программ ImageJ (NIH, США). Применение иммуногистохимической реакции на периферин позволяет на поперечных срезах через нерв идентифицировать нервные волокна с диаметром менее 1 мкм. Оказалось, что в наиболее крупном стволе интактного седалищного нерва крысы количество периферин-содержащих нервных волокон составляет приблизительно 8000 волокон на 1 мм². Большинство этих волокон имеет диаметр от 2 до 8 мкм.

Анализ распределения регенерирующих аксонов показал, что в изученный срок (2 мес.) число волокон на единицу площади у животных с наложением лигатуры увеличивается по сравнению с интактным нервом (рис. 2) и достигает почти



Рис. 2. Изменение числа нервных волокон на единицу площади в седалищном нерве крысы. По оси ординат — число нервных волокон на 1 мм². I — интактный нерв; II — лигатура; III — лигатура и введение MCK. * $p_{I \mu II} < 0.05$; ** $p_{II \mu III} > 0.05$.

Fig. 2. The change in the density of the rat sciatic nerve fibers. The ordinate – the number of nerve fibers per 1 mm^2 . I – intact nerve; II – ligature; III – ligature and the introduction of MSCs. **p*_{I, II} < 0.05; ***p*_{II, III} > 0.05.

13000 волокон на 1 мм². Увеличение нервных волокон в дистальном сегменте нерва после повреждения является характерной особенностью регенерирующего нерва: в месте повреждения нервные волокна подвергаются разветвлению [21, 22]. Затем мы провели анализ числа регенерирующих нервных волокон у животных контрольной (лигатура) и подопытной (лигатура и введение MCK) группы, оказалось, что у них этот показатель достоверно не отличается (рис. 2).

При этом была выявлена значимая разница средней толщины регенерирующих волокон у животных контрольной и подопытной групп (рис. 3).

В связи с этим было проведено исследование распределения волокон с разной площадью сечения, то есть с разной толщиной. Гистограмма распределения (рис. 4) нервных волокон по размерам демонстрирует, что процент аксонов с площадью более 20 мкм² (т.е. с диаметром более 5 мкм) заметно увеличивается в подопытной группе. Таким образом, показано, что применение клеточной терапии МСК приводит к увеличению количества более толстых аксонов в нерве реципиента.

Несмотря на то, что исследования по разработке терапии поврежденных нервных проводников с помощью применения МСК ведутся с 2001 г. [23], относительно механизмов влияния МСК на регенерацию нерва, по-прежнему, нет ясности. Авторы пионерских исследований в этом направлении предполагали, что экзогенные МСК способны дифференцироваться в нейролеммоциты (шванновские клетки) и участвовать в миелинизации регенерирующих аксонов. Позднее было показано, что МСК обретают способность дифференцироваться в шванновские клетки только после их предифференцировки в условиях *in vitro* с использованием специальных индукторов [7]. Были разработаны специальные протоколы с использованием ряда индукторов и регуляторов дифференцировки клеток в направлении ШК [23]. В последние годы более вероятным механизмом влияния МСК на репаративные процессы считается выработка и секреция ими ростовых и ангиогенных факторов, цитокинов, белков экстрацеллюлярного матрикса, необходимых для регенерации нервных проводников [3, 5, 7, 10].



Рис. 3. Изменение средней толщины нервных волокон в седалищном нерве крысы. По оси ординат – средняя площадь сечения нервных волокон (мкм²). І – интактный нерв; ІІ – лигатура; ІІІ – лигатура и введение МСК. * $p_{I \ N \ II} < 0.05$; ** $p_{II \ N \ III} < 0.05$.

Fig. 3. Change in the average thickness of rat sciatic nerve fibers. The ordinate – the average cross-sectional area of nerve fibers (μ m²). I – intact nerve; II – ligature; III – ligature and the transplantation of MSCs. * $p_{I, II} < 0.05$; ** $p_{I, III} < 0.05$.

В некоторых экспериментальных работах [24] показано, что число выживших после введения в организм реципиента МСК невелико. После трансплантации МСК костного мозга в поврежденный нерв крысы также отмечается, что лишь часть пересаженных клеток сохраняет жизнеспособность и идентифицируется в тканях реципиента в течение недели [15]. Есть данные, полученные на модели введения МСК крысам с острым респираторным дистресс-синдромом, о том, что экзогенные МСК подвергаются гибели по механизмам аутофагии и апоптоза [24]. В связи с этим в последние годы в исследованиях в области регенеративной медицины основное внимание уделяется влиянию пересаженных стволовых клеток на эндогенные клетки реципиента и их репаративные потенции. Одним из механизмов такого влияния считается способность МСК обмениваться с клетками реципиента внеклеточными микровезикулами [25] или непосредственно органеллами, например, митохондриями [26]. Есть мнение, что применение самих везикул или их содержимого может быть использовано в качестве терапии [27, 28], причем с меньшими рисками, чем введение самих МСК. На экспериментальных моделях повреждения легких [29] и ишемии задних конечностей [30] показано, что введенные в организм крысы-реципиента МСК оказывают влияние на макрофаги реципиента, на их фенотипические характристики и функции. Описанные наблюдения свидетельствуют о том, что для стимуляции репаративных процессов в тканях и органах реципиента может быть достаточно даже непродолжительного периода времени выживания МСК после операции. Способность МСК влиять на функции макрофагов реципиента [29] позволяет предположить, что клеточная терапия может изменять процессы валлеровской дегенерации в нерве в ранние сроки после операции.

В настоящем исследовании была использована стандартизированная модель регенерации нерва после нанесения травмы путем наложения лигатуры в течение 40 с [14]. Применение иммуногистохимического выявления периферина в осевых цилиндрах нервных волокон позволило провести морфологическую оценку степени восстановления волокон, выяснить особенности влияния на этот процесс клеточной



Рис. 4. Распределение нервных волокон по толщине в интактном седалищном нерве крысы (синие столбики), в нерве после наложения лигатуры (красные столбики) и после лигатуры и введения МСК (зеленые столбики). По оси ординат – доля нервных волокон в %, по оси абсцисс – интервал толщины (площадь сечения) нервных волокон (мкм²).

Fig. 4. The distribution of nerve fibers thickness for the intact sciatic nerve of the rat (blue bars), for the nerve after ligature (red bars) and after ligature and MSC (green bars). The ordinate – the percentage of nerve fibers, %, the abscissa – the thickness interval (cross-sectional area) of nerve fibers (μ m²).

терапии с применением MCK. Полученные данные имеют не только практическую значимость, но и важное теоретическое значение для нейрофизиологии. Травма нервных проводников приводит к изменению структуры самого нерва, гибели части нейронов спинного мозга и спинномозгового ганглия, нарушению иннервации органов-мишеней, приводящей к их атрофии [3, 21, 22]. Для предотвращения этих нарушений необходима разработка методов, влияющих на скорость регенерации аксонов. В настоящей работе установлено, что однократное введение MCK в поврежденный нерв способствует увеличению доли толстых волокон в дистальном конце травмированного нерва.

Относительно объяснения полученного факта можно высказать два предположения. Первое касается особенностей восстановления и роста регенерирующих нервных волокон после травмы периферических нервных проводников. Известно, что после травмы нервного ствола в его дистальном сегменте происходит валлеровская дегенерация, почти одновременно начинают расти на периферию тонкие регенерирующие аксоны. По мере роста их толщина увеличивается, часть из них подвергается миелинизации. Мы полагаем, что пересаженные в поврежденный нерв мезенхимные стволовые клетки, вырабатывая нейротрофические и ростовые факторы, создают благоприятное микроокружение для регенерации нервных волокон и могут ускорять репаративные процессы в нерве — такие, как рост регенерирующих аксонов, увеличение их калибра, их миелинизацию. Без дополнительных исследований структурных изменений, происходящих в ранние сроки после наложения лигатуры и введения МСК, мы не можем исключить второе предположение. Благодаря паракринному влиянию на эндогенные клетки нерва реципиента (нейролеммоциты, фибробласты, клетки периневрия, клетки стенок кровеносных сосудов, макрофаги) трансплантация МСК может способствовать сохранности единичных волокон после передавливания. Для решения этого вопроса необходимы дальнейшие исследования не только динамики роста нервных волокон в ранние сроки после травмы, но и влияния экзогенных МСК на происходящие в первые недели после травмы процессы валлеровской дегенерации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение иммуногистохимической реакции на периферин позволило провести оценку регенерирующих нервных волокон седалищного нерва крысы после наложения лигатуры и применения клеточной терапии с использованием МСК. Через 2 мес. после операции была выявлена значимая разница средней толщины регенерирующих волокон у животных контрольной группы, которым была нанесена травма седалищного нерва путем наложения лигатуры, и животных подопытной группы, которым была проведена однократная субпериневральная трансплантация МСК сразу после травмы. Анализ распределения нервных волокон дистального сегмента нерва по толщине показал, что введение МСК костного мозга крысы в поврежденный нерв приводит к увеличению доли регенерирующих волокон большого диаметра по сравнению с контролем (повреждение без введения МСК). Предположительно это является следствием стимулирующего влияния МСК на рост нервных волокон реципиента в более ранние сроки. Полученные данные следует учитывать в нейрофизиологических исследованиях, касающихся восстановления периферических нервных проводников, и в разработках, посвященных поиску новых способов стимуляции регенерации нервов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках темы государственного задания (шифр темы НИР: 0557-2019-0007).

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выражают благодарность ООО "Транс-Технологии" (ген. директор – к.б.н. Д.Г. Полынцев) за предоставленные мезенхимные стволовые клетки, а также сотруднику НИИОЧБ (СПб) к.б.н. Е.И. Исаевой за помощь и консультации при работе с культивируемыми МСК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Kemp S.W., Walsh S.K., Midha R.* Growth factor and stem cell enhanced conduits in peripheral nerve regeneration and repair. Neurol. Res. 30(10): 1030–1038. 2008.
- 2. Челышев Ю.А., Богов А.А. Экспериментальное обоснование применения кондуитов нерва. Невролог. вестник. 40(4): 101–109. 2008. [*Chelyshev J.A., Bogov A.A.* Experimental ground for nerve conduit usage. Nevrolog. vestnik. 40(4): 101–109. 2008. (In Russ)].
- Щаницын И.Н., Иванов А.Н., Бажанов С.П., Нинель В.Г., Пучиньян Д.М., Норкин И.А. Стимуляция регенерации периферического нерва: современное состояние, проблемы и перспективы. Успехи физиол. наук. 48(3): 92–112. 2017. [Shchanitsyn I.N., Ivanov A.N., Bazhanov S.P., Ninel' V.G., Puchin'yan D.M., Norkin I.A. Stimulation of peripheral nerve regeneration: current status, problems and perspectives. Advances in physiol. sciences. 48(3): 92–112. 2017. [In Russ)].
- 4. Sarker M., Saman N., McInnes A.D., Schreyer D.J., Xiongbiao C. Regeneration of peripheral nerves by nerve guidance conduits: Influence of design, biopolymers, cells, growth factors, and physical stimuli. Progress in Neurobiology. 2018. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.07.002

1066

- 5. Карагяур М.Н., Макаревич П.И., Шевченко Е.К., Стамбольский Д.В., Калинина Н.И., Парфёнова Е.В. Современные подходы к регенерации периферических нервов после травмы: перспективы генной и клеточной терапии. Гены и Клетки. 12(1): 6–14. 2017. [Karagyaur M.N., Makarevich P.I., Shevchenko E.K., Stambolsky D.V., Kalinina N.I., Parfyonova E.V. Modern approaches to peripheral nerve regeneration after injury: the prospects of gene and cell therapy. Genes and cells. 12(1): 6–14. 2017. (In Russ)].
- Karagyaur M., Rostovtseva A., Semina E., Klimovich P., Balabanyan V., Makarevich P., Popov V., Stambolsky D., Tkachuk V. A bicistronic plasmid encoding brain-derived neurotrophic factor and urokinase plasminogen activator stimulates peripheral nerve regeneration after injury. J. Pharmacol. Exp. Ther. 372(3): 248–255. 2020.
- 7. *Petrova E.S.* Differentiation potential of mesenchymal stem cells and stimulation of nerve regeneration. Russ. J. Develop. Biol. 49(4): 193–205. 2018.
- Boldyreva M.A., Stafeev I.S., Makarevich P.I., Beloglazova I.B., Zubkova E.S., Shevchenko E.K., Molokotina Y.D., Parfyonova Y.V., Bondar I.V., Rainer E.I., Karagyaur M.N. Plasmid-based gene therapy with hepatocyte growth factor stimulates peripheral nerve regeneration after traumatic injury. Biomedicine & Pharmacotherapy. 101. 682–690. 2018.
- Masgutov R., Masgutova G., Mullakhmetova A., Zhuravleva M., Shulman A., Rogozhin A., Syromiatnikova V., Andreeva D., Zeinalova A., Idrisova K., Allegrucci C., Kiyasov A., Rizvanov A. Allogenic adipose derived stem cells transplantation improved sciatic nerve regeneration in rats: autologous nerve graft model. Front. Med. (Lausanne). 6: 68. 2019. https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00068
- Mathot F., Shin A.Y., Van Wijnen A.J. Targeted stimulation of MSCs in peripheral nerve repair. Gene. 20(710): 17–23. 2019.
- 11. Kalinina N.I., Sysoeva V.Yu., Rubina K.A., Parfenova E.V., Tkachuk V.A. Mesenchymal stem cells in tissue growth and repair. Acta Naturae. 3(4(11)): 30–37. 2011.
- 12. Mukhamedshina Y., Rizvanov A., Chelyshev Y., Gracheva O., Mukhutdinova D. Mesenchymal stem cells and the neuronal microenvironment in the area of spinal cord injury. Neural Regenerat. Res. 14(2): 227–237. 2019.
- 13. *Petrova E.S.* Injured nerve regeneration using cell-based therapies: current challenges. Acta Naturae. 7(3): 38–47. 2015.
- 14. *Petrova E.S., Isaeva E.N.* Study of effect of embryonic anlage allografts of the rat spinal cord on growth of regenerating fibers of the recipient nerve. Biol. Bull. 41(6): 479–485. 2014.
- Petrova E., Isaeva E., Kolos E., Korzhevskii D. Allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells in the epineurium and perineurium of the recipient rat. Biol. Communications. 63(2): 123–132. 2018.
- 16. *Petrova E., Isaeva E., Kolos E., Korzhevskii D.* Vascularization of the damaged nerve under the effect of experimental cell therapy. Bull. Exp. Biol. 165(1): 161–165. 2018.
- 17. Zinkova N.N., Sokolova I.B., Shvedova E.V., Bilibina A.A., Kruglyakov P.V., Polyntsev D.G., Gilerovitch E.G. Dynamics of morphological changes after transplantation of mesenchymal stem cells in rat brain provoked by stroke. Cell and Tissue Biology. 1(6): 482–490. 2007.
- Grigorev I.P., Korzhevskii D.E. Current technologies for fixation of biological material for immunohistochemical analysis (Review). Modern Technologies in Medicine. 10(2): 156–165. 2018.
- Петрова Е.С., Павлова Н.В., Коржевский Д.Э. Современные морфологические подходы к изучению регенерации периферических нервных проводников. Мед. акад. журн. 12(3): 15– 29. 2012. [Petrova E.S., Pavlova N.V., Korzhevskii D.E. Advanced morphological approaches to the study of peripheral nerve regeneration. Med. Acad. J. 12(3): 15–29. 2012. (In Russ)].
- Chadan S., Le Gall J.Y., Di Giamberardino L., Filliatreau G. Axonal transport of type III intermediate filament protein peripherin in intact and regenerating motor axons of the rat sciatic nerve. J. Neurosci. 39(2): 127–139. 1994.
- Ноздрачев А.Д., Чумасов Е.И. Периферическая нервная система. СПб. Наука. 1999. [Nozdrachev A.D., Chumasov E.I. Perifericheskaya nervnaya sistema. (Peripheral nervous system) Spb. Nauka. 1999. (In Russ)].
- 22. Zochodne D.W. Neurobiology of peripheral nerve regeneration. Cambridge, New York, Melbourne, Madrid, Cape Town, Singapore, Sao Paulo. Cambridge Univer. Press. 2008.
- Dezawa M., Takahashi I., Esaki M. Takano M., Sawada H. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. Eur. J. Neurosci. 14: 1771–1776. 2001.
- Weiss D.J., English K., Krasnodembskaya A., Isaza-Correa J.M., Hawthorne I.J., Mahon B.P. The Necrobiology of mesenchymal stromal cells affects therapeutic efficacy. Front. Immunol. 10: 1228. 2019. https://doi.org/. eCollection 2019 https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01228
- Lee Y, El Andaloussi S., Wood M.J. Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. Human Mol. Genetics. 21 (R1): R125–134. 2012. https://doi.org/10.1093/hmg/dds317
- 26. Jackson M.V., Morrison T.J., Doherty D.F., McAuley D.F., Matthay M.A., Kissenpfennig A., O'Kane C.M., Krasnodembskaya A.D. Mitochondrial transfer via tunneling nanotubes is an important mechanism by which mesenchymal stem cells enhance macrophage phagocytosis in the in vitro and in vivo models of ARDS. Stem Cells. 2016. 34(8): 2210–2223.

- 27. Сагарадзе Г.Д., Григорьева О.А., Ефименко А.Ю., Чапленко А.А., Суслина С.Н., Сысоева В.Ю., Калинина Н.И., Акопян Ж.А., Ткачук В.А. Терапевтический потенциал секреторных компонентов мезенхимных стромальных клеток человека: проблема стандартизации. Биомед. химия. 61(6): 750–759. 2015. [Sagaradze G.D., Grigorieva O.A., Efimenko A. Yu., Chaplenko A.A., Suslina S.N., Sysoeva V.Yu., Kalinina N.I., Akopyan Zh.A., Tkachuk V.A. Therapeutic potential of human mesenchymal stromal cells secreted components: a problem with. Biomed. Chemistry. 61(6): 750–759. 2015. [In Russ]].
- Dong R., Liu Y., Yang Y., Wang H., Xu Y., Zhang Z. MSC-derived exosomes-based therapy for peripheral nerve injury: a novel therapeutic strategy. Biomed. Res. Int. 18;2019: 6458237. 2019. doi: eCollection 2019 https://doi.org/10.1155/2019/6458237
- 29. Murray L.M.A., Krasnodembskaya A.D. Concise review: intercellular communication via organelle transfer in the biology and therapeutic applications of stem cells. Stem Cells. 37(1): 14–25. 2019.
- 30. Арутюнян И.В., Фатхудинов Т.Х., Ельчанинов А.В., Макаров А.В., Васюкова О.А., Усман Н.Ю., Марей М.В., Володина М.А., Кананыхина Е.Ю., Лохонина А.В., Большакова Г.Б., Гольд-штейн Д.В., Сухих Г.Т. Исследование механизмов терапевтической активности аллогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток пупочного канатика в модели ише-мии задних конечностей. Гены и клетки.13(1): 82–89. 2018. [Arutyunyan I.V., Fatkhudinov T.X., Elchaninov A.V., Makarov A.V., Vasyukova O.A., Usman N.Yu., Marey M.V., Volodina M.A., Kananykhina E.Yu., Lokhonina A.V., Bolshakova G.B., Goldshtein D.V., Sukhikh G.T. Understanding mechanisms of the umbilical cord-derived multipotent mesenchymal stromal cell-mediated recovery enhancement in rat model of limb ischemia. Genes and cells. 13(1): 82–89. 2018. [In Russ)].

Regeneration of Nerve Fibers of the Rat Sciatic Nerve after Damage and Injection of MSCs

E. S. Petrova^{*a*}, * and E. A. Kolos^{*a*}

^aInstitute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia

*e-mail: iempes@yandex.ru

Mesenchymal stem cells (MSCs) are often used in experimental studies on the stimulation of damaged nerve regeneration. The aim of this work was to study the effect of subperineural transplantation of MSCs on the regenerating fibers of a rat damaged sciatic nerve using immunohistochemical detection of peripherin. The transplantation of a suspension of Wistar–Kyoto rats bone marrow-derived mesenchymal stem cells (5×104 cells in 5 µl of medium) was performed into the rat sciatic nerve damaged by ligature (40 s). The animals of the control group, which had a ligature, 5 µl of culture medium was injected subperineurally. Two months after the operation, peripherin-immunopositive nerve fibers were counted and measured on transverse sections of the distal segment of the recipient's nerve. Morphometric analysis of regenerating fibers performed using ImageJ software (NIH, USA) showed that the average thickness of nerve fibers in animals of the experimental group was increased. A study of the thickness of the nerve fibers of the damaged nerve distal segment showed that in animals treated with MSCs, the percentage of larger diameter fibers is higher than in animals of the control group.

Keywords: nerve, mesenchymal stem cells, nerve fibers, peripherin, immunohistochemistry

ЦИТИРОВАТЬ:

Петрова Е.С., Колос Е.А. Регенерация нервных волокон седалищного нерва крысы после повреждения и введения мезенхимных стволовых клеток. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(7): 1059–1068.

DOI: 10.31857/S0869813920070055

TO CITE THIS ARTICLE:

Petrova E.S., Kolos E.A. Regeneration of Nerve Fibers of the Rat Sciatic Nerve after Damage and Injection of MSCs. Russian Journal of Physiology. 106(7): 1059–1068.

DOI: 10.31857/S0869813920070055

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 9, с. 1069-1084

= ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ =

ЭФФЕКТЫ ОСТРОГО СТРЕССА У МЫШЕЙ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ 5-НТ_{1А}-РЕЦЕПТОРОВ К ХРОНИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИИ С ПОМОЩЬЮ 8-ОН-DPAT

© 2020 г. Е. М. Кондаурова^{1, *, #}, Е. В. Антонов^{1, #}, Е. Ю. Баженова¹, Д. В. Базовкина¹, В. С. Науменко¹

¹Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук Новосибирск, Новосибирск, Россия

*E-mail: kond_em@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 13.05.2020 г. После доработки 25.06.2020 г. Принята к публикации 05.07.2020 г.

Недавно были созданы рекомбинантные линии мышей B6.CBA-D13Mit76C (B6-M76C) и B6.CBA-D13Mit76B (B6-M76B), различающихся чувствительностью 5-HT_{1A} рецептора к хронической активации агонистом 8-ОН-DPAT (8-гидрокси-2-(ди-н-пропиламино)тетралин). 5-НТ1А рецептор является ключевым регулятором серотониновой (5-НТ) системы мозга, которая участвует в регуляции реакции на стресс. В данной работе было обнаружено, что острый эмоциональный стресс (40-минутное обездвижение) увеличивает экспрессию гена c-fos, являющего маркером реакции на стресс, в мозге мышей обеих линий. Вызванное стрессом увеличение экспрессии *c-fos* в стриатуме, гипоталамусе и коре мышей B6-M76C было более выраженным. Реакция на эмоциональный стресс привела к увеличению соотношения метаболита серотонина – 5-ГИУК (5-гидроксиинодолуксусная кислота) к 5-НТ в среднем мозге и гиппокампе у обеих линий. Выявлено повышенное соотношение 5-ГИУК/5-НТ в гипоталамусе В6-М76С и коре В6-М76В мышей после стресса. При этом реакция на стресс привела к снижению уровня норадреналина в гиппокампе и гипоталамусе у В6-М76С мышей. Уровни дофамина, норадреналина, адреналина и соотношения дофамин/норадреналин в надпочечниках возросли в ответ на стрессирующее воздействие только у мышей В6-М76С. Настоящее исследование показало, что у мышей линии В6-М76С симпатоадреналовая система более чувствительна к действию острого стресса. Реакция на стресс у В6-М76С мышей приводит к увеличению содержания норадреналина и адреналина в ткани надпочечника. Повышение отношения дофамин/норадреналин в надпочечнике может свидетельствовать о более быстром превращении промежуточных продуктов биосинтеза катехоламинов (дофамин) в норадреналин и далее в адреналин вследствие ускорения биосинтетического процесса в ответ на стресс у мышей В6-М76С. Кроме того, была показана повышенная чувствительность нейронов гипоталамуса к действию стресса у животных линии В6-М76С. Таким образом, мыши В6-М76С представляют значительный интерес для изучения гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы с гиперактивным ответом на стресс, и могут способствовать выявлению новых биомаркеров заболеваний, связанных со стрессом.

Ключевые слова: острый стресс, 5-HT_{1A}-рецептор, мыши, ген *с-fos*, метаболизм, серотониновая система мозга, катехоламины надпочечников

DOI: 10.31857/S0869813920090010

[#] Авторы внесли равный вклад в работу.

Стресс – совокупность всех неспецифических реакций организма [1], возникающих в ответ на действие стрессора, которым является всякое достаточно сильное (не обязательно экстремальное) воздействие – тепло, холод, болевые раздражения, эмоциональное воздействие и другие. Психоэмоциональный стресс является одним из основных факторов риска множества заболеваний. Центральная нервная система и нейроэндокринные регуляторные контуры (симпатоадреналовая система и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система (ГГНС)) реализуют реакцию организма на стресс. Симпатоадреналовая система обеспечивает быстрый ответ организма на стрессирующие обстоятельства. В свою очередь, активация ГГНС является одним из наиболее ярких проявлений реакции организма на продолжительное воздействие стресса. Именно ГГНС отводится особая роль, так как при длительном воздействии стрессорной ситуации относительно стойкий адаптивный эффект может трансформироваться в повреждающий [2]. Влияние стресса на ГГНС приводит к повышенной секреции глюкокортикоидов надпочечниками [3, 4]. Реакция на стресс со стороны симпатоадреналовой системы – повышение уровня катехоламинов – дофамина (ДА), норадреналина (НА), адреналина (А). Стресс вызывает высвобождение катехоламинов из надпочечников, симпатической нервной системы и катехоламинергических нейронов в мозге [5, 6]. Реакция на стресс сопровождается увеличением экспрессии гена быстрого ответа *c-fos* в нейронах головного мозга, который используется в качестве маркера нейрональной активности после воздействия стрессовых стимулов [7]. Известно, что стрессовая реакция, а также связанное с ней поведение находятся под контролем нейротрансмиттеров мозга. В связи с этим особое внимание привлекают классические нейромедиаторы норадреналин и серотонин (5-НТ).

Норадренергическая система действует как система возбуждения и оповещения, усиливая сенсомоторные функции и обостряя реакции на важные внешние раздражители [8, 9]. Норадренергическая система находится во взаимодействии с ГГНС, что определяет ее важную интегративную функцию в преодолении стресса и адаптации к нему [10, 11]. Неспособность надлежащим образом инициировать или регулировать реакцию на стресс была предложена в качестве критического фактора в патофизиологии различных расстройств, связанных со стрессом [10, 12]. Нарушения регуляции норадренергической нейротрансмиссии вовлечены в связанные со стрессом психические заболевания, такие как депрессия, посттравматическое стрессовое расстройство и другие тревожные расстройства [13–15].

Серотониновая система мозга принимает участие во многих формах поведения [16], нейроэндокринной регуляции [17] и реакции на стресс [18-20]. Нейрохимические и электрофизиологические исследования показали, что нервная возбудимость 5-НТ системы чувствительна к действию стресса. Последствиями такой чувствительности могут являться однократная спайковая активность 5-НТ нейронов и изменения активности рецепторов, локализованных на этих нейронах. Стресс также оказывает влияние на синтез, внутриклеточный перенос, деградацию и обратный захват моноаминов, таким образом воздействуя на процессы нейротрансмиссии [21]. Острое воздействие стресса отражается на активности 5-НТ системы мозга. 5-НТ система играет важную роль в центральной регуляции нейроэндокринной реакции на стресс. Серотонин, действующий через различные типы рецепторов, является мощным активатором ГГНС. Так, хорошо известно прямое синаптическое взаимодействие серотонинергических аксонов с нейронами, вырабатывающими кортикотропин-рилизинг-гормон, в гипоталамусе [22-24]. Среди многочисленных подтипов 5-НТ рецепторов – 5-НТ_{1А} рецептор, связанный с G_i белком, является одним из наиболее изучаемых в связи с исследованиями основ болезней настроения [21]. Эти рецепторы могут локализоваться как пост-, так и пресинаптически. Активность 5-НТ нейронов дорсального ядра шва негативно регулируется этими рецепторами, которые локализуются в соматодендритных компартментах (пресинаптические аутоингибирующие рецепторы) 5-НТ нейронов [25–27]. Предполагается, что снижение активности 5-НТ_{1А} рецепторов является важным фактором патогенеза тревожных и депрессивных расстройств [28, 29]. Линия мышей с нарушенной активностью 5-НТ_{1А} ауторецепторов (но не постсинаптических рецепторов) продемонстрировали изменения в стрессовых реакциях, поведенческом отчаянии и ответе на антидепрессанты, но без различий в тревожном поведении [30].

Предварительное введение антагониста 5-HT_{1A} рецепторов перед воздействием на крыс однократным стрессом уменьшало уровень кортикотропин-рилизинггормона. 5-HT_{1A} рецепторы также влияют на функционирование отрицательной обратной связи в ГГНС, снижая уровни экспрессии гена и белка глюкокортикоидного рецептора [31].

В одном из исследований [32] было показано, что крысы линии, выведенной путем отбора на отсутствие агрессии по отношению к человеку (ручные крысы) [33], демонстрируют сниженную реакцию на стресс со стороны ГГНС в отличие от линии крыс, которых отбирали на усиление агрессии по отношению к человеку (агрессивные крысы). При этом значительное снижение плотности 5-HT_{1A} рецептора было показано в гипоталамусе, фронтальной коре и амигдале агрессивных крыс по сравнению с ручными крысами. Эти изменения сопровождались значительным снижением экспрессии гена 5-HT_{1A} рецептора в среднем мозге, где локализованы тела серотонинергических нейронов [34].

У мышей рекомбинантной линии B6-M76C (см. раздел методы исследований) наблюдается сниженный катаболизм 5-HT в гиппокампе и повышенная экспрессия гена 5-HT_{1A} рецептора по сравнению с мышами B6-M76B [35].

Однократное введение агониста 5-HT_{1A} рецептора 8-OH-DPAT приводило к дозозависимой гипотермии и снижению двигательной активности как у мышей линии B6-M76C, так и у мышей линии B6-M76B. Острая инфузия 8-OH-DPAT на фоне умеренного хронического введения этого препарата снижала температуру тела у мышей линии B6-M76B, но не у мышей B6-M76C. Иными словами, хронические введение 8-OH-DPAT купирует гипотермический эффект однократного введения 8-OH-DPAT только у мышей линии B6-M76C [35]. Известно, что стимуляция центральных постсинаптических 5-HT_{1A} рецепторов увеличивает, в частности, синтез оксида азота на периферии, что обуславливает расширение поверхностных сосудов и, следовательно, повышение теплоотдачи [36]. Это дает основания полагать, что хроническая активация постсинаптических 5-HT_{1A} рецепторов у мышей линии B6-M76C привела к их более эффективной десенсибилизации по сравнению с мышами линии B6-M76B.

Хроническое введение 8-OH-DPAT вызывало значительное увеличение показателей двигательной активности только у мышей B6-M76B. Мыши линии B6-M76C, в свою очередь, не продемонстрировали изменений в показателях двигательной активности в ответ на продолжительное введение 8-OH-DPAT. Поскольку пресинаптические 5-HT_{1A} рецепторы важны для регуляции двигательной активности [37], наши данные позволили предположить, что чувствительность пресинаптических 5-HT_{1A} рецепторов снижена у мышей линии B6-M76C [35].

Кроме того, мыши линии B6-M76C характеризовались уменьшенным объемом всего мозга и уменьшенными размерами стриатума, мозжечка и гипофиза по сравнению с мышами B6-M76B [38]. Известно, что изменения объема гипофиза связаны с повышенной уязвимостью к психическим расстройствам [39]. Также мыши линии B6-M76C показали пониженную экспрессию гена *Bdnf* (brain derived neurotropic factor) в гипоталамусе и повышенную экспрессию гена *Arc* (activity-regulated суtoskeleton-associated protein) в стриатуме после действия стресса по сравнению с контрольной группой [38]. Эти гены считаются генами раннего реагирования, играют важную роль в активности нервной системы и тесно связаны с поведенческииндуцированной пластичностью нейронов [40, 41]. Однако концентрация кортикостерона в плазме крови достоверно не отличалась у мышей линий B6-M76B и B6-M76C ни в покое, ни при стрессе [38].

Целью настоящего исследования было изучение реакции на эмоциональный стресс у мышей линий B6-M76С и B6-M76В. Для этого необходимо было определить ответ нейронов на стресс посредством оценки уровня экспрессии гена *c-fos* в среднем мозге, гиппокампе, стриатуме, гипоталамусе и префронтальной коре головного мозга. Затем мы сравнили содержание HA, A и ДA в ткани надпочечников в покое и при стрессе у мышей обеих линий. Было вычислено соотношение ДА/HA с целью оценить активность фермента дофамин-бета-гидроксилазы (D β H) в мозговом веществе надпочечников у исследуемых линий. Было измерено содержание HA, 5-HT и 5-ГИУК, а также вычислен индекс катаболизма серотонина – отношение 5-ГИУК/5-HT в среднем мозге, гиппокампе, стриатуме, гипоталамусе и префронтальной коре у мышей данных линий.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Создание линий. На основе генома мышей линии С57BL/6 (В6) были созданы новые рекомбинантные линии мышей: линия B6.CBA-D13Mit76C (B6-M76C) была получена рекомбинантным переносом дистального фрагмента хромосомы 13 (102.73-110.56 Мпн) из генома склонной к каталепсии линии СВА в геном линии В6. Данный фрагмент содержит ген, кодирующий 5-НТ_{1А} рецептор. Линия B6.CBA-D13Mit76B (B6-M76B) является контрольной и содержит в геноме фрагмент хромосомы 13 (102.73–110.56 Мпн) от линии В6, устойчивой к каталепсии [42–44]. Самцы, выведенные ранее в лаборатории нейрогеномики поведения (Новосибирск, Россия), склонной к каталепсии рекомбинантной линии АКR.CBA-D13Mit76C, содержащей фрагмент, полученный из CBA на геноме линии AKR [44], и самки инбредной линии В6 были скрещены для получения гибридов первого поколения (F1). Последние использовались для создания рекомбинантных линий, использованных в данной работе. Рекомбинантные линии В6-М76С и В6-М76В были получены путем восьми последовательных обратных скрещиваний гибридов F1 с линией B6. Перенос полученного от CBA линии фрагмента хромосомы 13 в геном В6 контролировали с использованием трех полиморфных микросателлитных маркеров D13Mit287 (102.73 Мпн), D13Mit76 (110.56 Мпн) и D13Mit78 (118.83 Мпн). Гетерозиготные бэккроссы восьмого поколения были скрещены между собой для получения линий В6-М76С и В6-М76В, содержащих соответственно СВА- и Вб аллели маркеров D13Mit287 и D13Mit76, и АКЯ- и Вб-аллели маркеров D13Mit78 в геноме B6 соответственно [35].

Животные. Исследования проводили на взрослых (10–12 нед.) самцах мышей линий B6-M76C и B6-M76B. Животных содержали в группах по 7–8 особей на клетку размером $40 \times 25 \times 15$ см в стандартных условиях (20–22°C, доступ к корму и воде *ad libitum*, 12-часовой цикл свет/темнота). За два дня до экспериментов мышей взвешивали (около 23 г) и рассаживали в отдельные клетки для устранения группового эффекта.

В эксперименте мышей каждого генотипа разделяли на две группы (контроль и стресс) (n = 6-10 на группу). Мыши экспериментальной группы подвергались эмоциональному стрессу (помещение в тубус для рестрикции) в течение 40 мин. Мышей мгновенно декапитировали после воздействия стресса. Структуры головного мозга (префронтальная кора, гиппокамп, стриатум, средний мозг и гипоталамус)

Ген (Gene)	Последовательность праймера Gene Sequence	Температура отжига, °C Annealing temperature, °C	Длина продукта, пн Product length, bp
c-fos	F5'-aaagagaaggaaaaaactggag-3' R5'-cggaaacaagaagtcatcaa-3'	58	264
rPol2	F5'-tgtgacaactccatacaatgc-3' R5'-ctctcttagtgaatttgcgtact-3'	60	194

Таблица 1. Последовательности праймеров, температуры отжига и длина продукта ПЦР **Table 1.** The primer sequences, annealing temperatures and PCR-product length

были выделены для измерения влияния стресса и генотипа на экспрессию гена *c-fos*, уровень моноаминов и норадреналина. Образцы надпочечников были выделены для измерения уровня катехоламинов. Все выделенные структуры мозга и надпочечники были немедленно заморожены в жидком азоте и затем перенесены в морозильную камеру на -80° С, где хранились до проведения измерения уровня катехоламинов (НА, А и ДА) в надпочечниках, 5-НТ, 5-ГИУК, НА и экспрессии гена *c-fos* в мозге.

Все экспериментальные процедуры соответствовали Директиве National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80023, 1996) для экспериментов на животных и были одобрены комиссией по биоэтике ФИЦ ИЦиГ СО РАН.

Эмоциональный стресс. Для индукции эмоционального стресса мышей помещали на 40 мин в небольшую цилиндрическую металлическую тубу (8.5 × 5 см) с 48-ю вентиляционными отверстиями диаметром 0.4 см. Ограничительное устройство позволяло мышам вытягивать лапы, но не двигаться внутри.

Выделение общей РНК. Общую РНК экстрагировали тризолом по протоколу производителя (Bio Rad, США). Осадок РНК растворялся в воде, обработанной диэтилпирокарбонатом с добавлением ДНК-азы по протоколу производителя (RNase free DNase, Promega, США, 1000 о.е./мл). Оптическая плотность РНК была измерена на спектрофотометре (Nanodrop, США). РНК разводилась водой до концентрации 0.125 мкг/мкл и хранилась при -80°С. Присутствие примесей геномной ДНК в препаратах РНК определяли в соответствии с протоколом, описанным ранее [45, 46].

Реакция обратной транскрищии. Общая РНК (8 мкл, или 1 мкг) была смешана со 180 нг статистического праймера длиной 6 нуклеотидов (конечная концентрация праймера составила 5 мкМ) и 2.25 мкМ стерильного 1М КСІ в объеме 16 мкл, денатурирована при 94°С в течение 5 мин на амплификаторе БИС М-120 (БИС-Н, Россия), затем добавлялось 15 мкл смеси, содержащей обратную транскриптазу MuMLV (Биосан, Россия) (2000 ед.), 0.5 М Tris-HCl (рН 8.3, 0.63 мкл), смесь трифосфатов 4мМ (3.63 мкл), дитиотреитол 0.1 М (2.25 мкл), 0.1 М MnCl₂ (0.3 мкл) и 8 мкл воды, обработанной диэтилпирокарбонатом. Полученная смесь (конечным объемом 31 мкл) была инкубирована при 41°С в течение 60 мин. Синтезированная кДНК хранилась при температуре -20° С [47].

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (real-time PCR). Праймеры, используемые для амплификации кДНК исследуемых генов (табл. 1), разработаны на основе последовательностей, опубликованных в базе данных EMBL Nucleotide database, и синтезированы в компании Биосан (Новосибирск, Россия). 1 мкл кДНК смешивали с 2.5 мкл ПЦР-буфера (содержит интеркалирующий краситель SYBR green I и референсный краситель ROX), 2.5 мкл 2.5 мМ dNTP, 2.5 мкл 25 мМ MgCl₂, 2.5 мкл смеси праймеров (прямого и обратного), 0.2 мкл Таq ДНК-полимеразы и стерильной воды до конечного объема 20 мкл. При приготовлении реакционной смеси были использованы наборы реагентов Синтол (Москва, Россия). ПЦР была проведена на амплификаторе LightCycler 480 System (Roche, Швейцария) в соответствии со следующим протоколом: 3 мин 94°С, 1 цикл; 10 с при 94°С, 30 с при соответствующей температуре отжига (табл. 1), 30 с при 72°С, 40 циклов. Серия разведений геномной ДНК с концентрацией 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 нг/мкл амплифицировалась одновременно в отдельных пробирках и использовалась как внешний экзогенный стандарт для построения калибровочной кривой. Калибровочная кривая в координатах Ct (значение порогового цикла) – logP (десятичный логарифм количества стандарта ДНК) была построена автоматически программным обеспечением LightCycler 480 System. Экспрессия генов представлена как отношение количества кДНК исследуемых генов к 100 копиям кДНК *rPol2* (ген, кодирующий ДНК-зависимую-РНК-полимеразу II), выполняющей функцию внутреннего стандарта [45–47].

Экстракция тканей. Структуры головного мозга и надпочечников гомогенизировали в гомогенизаторе Potter-Elvehjem в 200 мкл 0.6 М HClO₄ (Sigma-Aldrich, США), содержащего 200 нг/мл изопротеренола (Sigma-Aldrich, США) в качестве внутреннего стандарта. Гомогенат центрифугировали при 12000 g в течение 15 мин при 4°С для осаждения белка. Супернатанты разбавляли в два раза сверхчистой водой и фильтровали с использованием центрифужной пробирки с 0.22 мкм ацетатцеллюлозным фильтром (Spin-X®, США). Осадок хранили при -20° С до количественного определения белка по методу Брэдфорда [48]. Двадцать мкл отфильтрованиот с упернатанта вводили в петлю системы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Протокол ВЭЖХ. Уровни НА, 5-НТ, 5-ГИУК были проанализированы в структурах головного мозга, уровни А, НА, ДА определялись в тканях надпочечников. Анализ биогенных аминов был выполнен с использованием системы ВЭЖХ, содержащей следующие компоненты: электрохимический детектор (750 мВ, DECADE IITM; Antec, Нидерланды), проточный элемент из стеклоуглерода (ячейка VT-03, 3 мм GC sb; Antec, Нидерланды), системный контроллер CBM-20A, блок подачи растворителя LC-20AD, автоматический пробоотборник SIL-20A и дегазатор DGU-20A5R (Shimadzu Corporation, США). Хроматографическое разделение веществ осуществляли в изократическом режиме элюирования при скорости потока 0.6 мл/мин на колонке C18 (размер частиц 5 мкм, $L \times ID 75 \times 4.6$ мм, Luna, Penomenex, США), защищенной предколонкой С8 (Penomenex, США). Подвижная фаза состояла из 90% буфера, содержащего 50 мМ дигидроортофосфата калия (Sigma Aldrich, США), 1.4 мМ натриевой соли октансульфоновой кислоты (Chimmed, Россия) и 0.05 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (Sigma Aldrich, США) pH 3.9, и 10% метанола (Chimmed, Россия). Температура колонки стабилизировалась при 40°С. Количества (нг) веществ рассчитывали относительно известного количества внутреннего стандарта. Содержание веществ выражали в нг исследуемого вещества на мг общего белка, определенного по методу Бредфорда.

Статистический анализ. Все значения были представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего ($m \pm SEM$) и сравнивались двухфакторным анализом ANOVA (факторы – генотип и стресс) (B6-M76B против B6-M76C) и (интактные против стрессированных), затем следовал *post-hoc* анализ по Фишеру. Статистическая значимость была установлена на уровне p < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспрессия гена *c-fos*. Острый стресс привел к значительному увеличению экспрессии гена *c-fos* во всех исследованных структурах мозга (рис. 1). Мы обнаружили влияние взаимодействия генотип × стресс на экспрессию гена *c-fos* в среднем

Нг/мг ткани ng/mg of tissue	B6-M76B контроль B6-M76B control	B6-M76B ctpecc B6-M76B stress	B6-M76C контроль B6-M76C control	B6-M76C ctpecc B6-M76C stress
Норадреналин (НА) Norepinephrine (NE)	754.62 ± 60.82	799.97 ± 33.33	881.29 ± 69.13	1140.69 ± 185.06*
Адреналин (A) Epinephrine (E)	1224.22 ± 114.71	1124.95 ± 60.81	1140.98 ± 64.88	$1981.53 \pm 310.54 *$
Дофамин (ДА) Dopamine (DA)	24.62 ± 1.57	$29.83\pm0.1.62$	27.84 ± 1.99	54.34 ± 7.04***
ДА/НА DA/NE	0.033 ± 0.003	0.038 ± 0.002	0.032 ± 0.003	$0.051 \pm 0.007^{**}$

Таблица 2. Уровни катехоламинов в ткани надпочечника **Table 2.** The levels of catecholamines in the adrenal gland tissue)

Все значения представлены как среднее \pm ошибка среднего. *** p < 0.001; **p < 0.01; * p < 0.05 по сравнению с контрольными мышами без стресса той же линии, $n \ge 8$ для каждой группы. All values are presented as mean ± SEM. *** p < 0.001; **p < 0.01; * p < 0.05 compared to control not stressed

mice of the same line, $n \ge 8$ for each group.

мозге (F_{1.26} = 4.73, *p* < 0.05, эффект стресса F_{1.26} = 216.41, *p* < 0.001). В гиппокампе был выявлен только эффект стресса ($F_{1,25} = 77.58, p < 0.001$). В стриатуме наблюдалось влияние взаимодействия генотип × стресс ($F_{1,23} = 4.27$, p = 0.05) и влияние стресса ($F_{1,23} = 26.38, p < 0.001$) на экспрессию гена *c-fos*. Реакция на острый стресс привела к увеличению экспрессии гена *c-fos* в мозге мышей обеих линий по сравнению с соответствующими контрольными группами, однако у мышей В6-М76С после воздействия стресса была обнаружена более высокая экспрессия гена *c-fos* по сравнению с мышами B6-M76B (p < 0.05) (рис. 1). В гипоталамусе был найден эффект взаимодействия генотип × стресс ($F_{1.24} = 4.80, p < 0.05$), стресса ($F_{1.24} = 141.67$, *p* < 0.001) и генотипа (F_{1,24} = 9.15, *p* < 0.001). Мыши B6-M76C продемонстрировали более высокую экспрессию гена *c-fos* по сравнению с мышами B6-M76B (p < 0.001) после воздействия острого стресса (рис. 1). Не было обнаружено какого-либо эффекта взаимодействия генотип × стресс ($F_{1,26} = 2.83, p = 0.10$) в префронтальной коре, но было выявлено влияние стресса ($F_{1,26} = 80.39, p < 0.001$). Вызванное стрессом увеличение экспрессии гена *с-fos* в префронтальной коре мышей B6-M76C было выше по сравнению с мышами B6-M76B (p < 0.05) (рис. 1).

Уровни А, НА, ДА в надпочечниках. Острый стресс значительно повлиял на функционирование надпочечников. Уровни ДА (эффект взаимодействия генотип × × стресс $F_{1.26} = 6.89$, p < 0.05), НА (эффект генотипа $F_{1.26} = 6.89$, p < 0.05), А (эффект генотипа $F_{1,26} = 8.82, p < 0.01$) в надпочечниках увеличились после стресса только у мышей В6-М76С по сравнению с соответствующей контрольной группой. Также было выявлено влияние стресса на соотношение ДА/НА ($F_{1,26} = 7.51, p < 0.01$), косвенно отражающее активность дофамин-бета-гидроксилазы, превращающей ДА в НА. Острый стресс привел к увеличению отношения ДА/НА у мышей В6-М76С, но не у мышей В6-М76В (табл. 2).

Уровни НА, 5-НТ, 5-ГИУК, соотношение 5-ГИУК/5-НТ в структурах мозга. Острый стресс привел к значительным генотип-зависимым изменениям в уровнях моноаминов и их метаболитов в структурах мозга мышей. Реакция на воздействие стресса сопровождалась более выраженным снижением уровня НА в гиппокампе мышей B6-M76C по сравнению с мышами B6-M76B (эффект стресса F_{1.30} = 10.44, p < 0.01). Также острый стресс привел к снижению НА в гипоталамусе (эффект взаимодействия генотип × стресс $F_{1,30} = 5.54$, p < 0.05). Следует отметить, что у мышей В6-М76С обнаружили повышенный базальный уровень НА (p < 0.05) в гипоталамусе по сравнению с мышами В6-М76В (рис. 2). Реакция на стресс вызвала повышение



Рис. 1. Экспрессия гена *c-fos* в структурах мозга контрольных и стрессированных мышей линий B6-M76C и B6-M76B. Экспрессия гена представлена в виде количества копий кДНК относительно 100 копий кДНК *rPol2*, $n \ge 8$ для каждой группы. Все значения представлены как среднее \pm ошибка среднего. *** p < 0.001; * p < 0.05 по сравнению с контрольными мышами той же линии; ### p < 0,001; # p < 0.05 по сравнению С контрольными стрессу.

Fig 1. *c-fos* gene expression in the brain structures of control and stressed B6-M76C and B6-M76B mice. Gene expression is presented as the number of cDNA copies with respect to 100 cDNA copies of *rPol2*, $n \ge 8$ for each group. All values are presented as mean \pm SEM. *** p < 0.001; * p < 0.05 compared to control not stressed mice of the same line, ### p < 0.001; # p < 0.05 compared B6-M76B stressed mice.

уровня 5-ГИУК у мышей обеих линий (эффект стресса $F_{1,32} = 28.32, p < 0.001$), но не изменила уровень 5-НТ в среднем мозге (рис. 3*A*, *B*). Также острая реакция на стресс привела к достоверному увеличению отношения 5-ГИУК/5-НТ у мышей обеих линий (эффект стресса $F_{1,32} = 85.45, p < 0.001$, рис. 3*C*). Интересно отметить, что в гиппокампе контрольных мышей линии B6-М76С соотношение 5-ГИУК/5-НТ было ниже по сравнению с таковым у контрольных мышей линии B6-М76В (p < 0.05).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

О наличии связи между стрессом и множеством психических, нервных и соматических заболеваний известно давно. Центральное место в процессе изучения механизмов такой связи занимают исследования генетического контроля и регуляции функций нейроэндокринных контуров, обеспечивающих реакцию организма на стресс. Самыми значимыми системами в формировании ответа на стресс являются симпатоадреналовая система и ГГНС. Мы обратили пристальное внимание на надпочечниковую железу, потому что она является эффекторным звеном для обеих этих систем.

Активация симпатоадреналовой и ГГНС систем в ответ на стрессовые факторы является важным этапом адаптации организма к изменяющейся среде. Быстрый ответ на стресс в виде реакции типа "бороться или бежать" обеспечивает симпатоадреналовая система [49]. Избыточная секреция катехоламинов в кровоток в ходе такой реакции сама по себе является повреждающей для кровеносных сосудов, органов, критически зависящих от кровоснабжения, в частности, головного мозга.



Рис. 2. Уровень НА в структурах мозга мышей контрольной и стрессированных мышей линий B6-M76C и B6-M76B. Уровень НА представлен в нг/мг, $n \ge 8$ для каждой группы. Все значения представлены как среднее \pm ошибка среднего. ** p < 0.01 по сравнению с контрольными мышами той же линии; # p < 0.05 по сравнению с мышами линии B6-M76B без стресса.

Fig 2. Level of NE in the brain structures of mice of control and stressed B6-M76C and B6-M76B mice. Level of NE is presented in ng/mg, $n \ge 8$ for each group. All values are presented as mean \pm SEM. ** p < 0.01 compared to control not stressed mice of the same line; # p < 0.05 compared to B6-M76B not stressed mice.

В то же время наличие сверхчувствительности катехоламинов к стрессу может расцениваться в качестве предиктора ряда неврологических и психических заболеваний [50]. Гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система обеспечивает адаптацию организма к изменениям внешней и внутренней среды [51]. Глюкокортикоиды – это один из конечных продуктов функционирования ГГНС, регулирующие физиологические процессы и способствующие выживанию в экстремальных (стрессирующих) условиях. В то же время избыточная реакция на стресс со стороны ГГНС зачастую провоцирует развитие различных заболеваний [52]. Активность ГГНС инициируется дискретными сигналами секреторных нервных окончаний, локализованных в средних парвоцеллюлярных и паравентрикулярных ядрах гипоталамуса [53]. Основными нейромедиаторами, принимающими участие в передаче сигнала в гипоталамических ядрах, включенных в организацию стрессовой реакции, являются ацетилхолин, ДА, НА и 5-НТ. Роль последнего как стимулятора секреции кортикотропин-рилизинг-фактора, впервые была показана в работах Науменко [54].

Итак, рассматривая реакцию на стресс, мы имеем дело с каскадом взаимосвязанных процессов, инициированных моноаминергическими нейронами мозга и перерастающих в эндокринный ответ [5, 6].

Известно, что снижение уровня НА в гипоталамусе мышей является более последовательным [55, 56], быстрым [57, 58] и более выраженным, чем в других областях мозга [59–61] после воздействия стресса. В нашем исследовании мы выявили повышенный уровень НА в гипоталамусе и его значительное снижение после острого стресса у мышей B6-M76C по сравнению с мышами B6-M76B. Таким образом, повышенная восприимчивость к стрессу у мышей B6-M76C, наблюдаемая в



Рис. 3. Уровень 5-НТ (*A*), 5-ГИУК (*B*) и соотношение 5-ГИУК/5-НТ (*C*) в структурах мозга контрольных и стрессированных мышей B6-M76C и B6-M76B. Уровни 5-НТ и 5-ГИУК представлены в нг/мг, $n \ge 8$ для каждой группы. Все значения представлены как среднее ± ошибка среднего. *** p < 0.001; ** p < 0.05 по сравнению с контрольными мышами той же линии; ### p < 0.001 по сравнению с мышами линии B6-M76B без стресса.

Fig 3. Level of 5-HT (*A*), 5-HIAA (*B*), and ratio 5-HIAA/5-HT (*C*) in the brain structures of mice of control and stressed B6-M76C and B6-M76B mice. Level of 5-HT and 5HIAA are presented in ng/mg, $n \ge 8$ for each group. All values are presented as mean \pm SEM. *** p < 0.001; ** p < 0.01; * p < 0.05 compared to control not stressed mice of the same line; ### p < 0.001 compared to B6-M76B not stressed mice.

наших предыдущих исследованиях [35, 38], может быть связана и с норадренергической системой мозга. Возможно, реакция на стресс у мышей В6-М76С приводит к усиленному нейроэндокринному ответу, что, в свою очередь, в дальнейшем мо-

1079

жет значительно повышать риски возникновения нервно-психических расстройств, связанных со стрессом [62].

Вызванное стрессом увеличение метаболизма 5-НТ в гипоталамусе было выявлено только у мышей В6-М76С. Наши данные хорошо согласуются с предыдущими исследованиями, которые показали, что реакция на стресс увеличивает 5-НТ и 5-ГИУК в вентромедиальном и дорсомедиальном ядрах гипоталамуса [63, 64]. Известно, что оба ядра вовлечены в механизмы регуляции поведения [65, 66]. Следует отметить, что интактные мыши В6-М76С отличаются от интактных мышей В6-М76В повышенным уровнем 5-НТ и сниженным соотношением 5-ГИУК/5-НТ в гипоталамусе. Кроме того, интактные мыши В6-М76С имеют более низкое соотношение 5-ГИУК/5-НТ в гиппокампе по сравнению с мышами В6-М76В. Реакция на острый стресс привела к увеличению отношения 5-ГИУК/5-НТ в гиппокампе и среднем мозге у обеих линий, но у мышей В6-М76С произошли более существенные изменения в метаболизме 5-HT. Ранее нами было предположено, что мыши В6-М76С отличаются повышенной чувствительностью постсинаптических и пониженной чувствительностью пресинаптических 5-HT_{1A} рецепторов по сравнению с мышами линии B6-M76B [35]. 5-HT_{1A} рецептор в ядрах шва действует как соматодендритный ауторецептор, ингибируя активность нейронов и выход серотонина в синаптическую щель [67, 68]. Также 5-НТ_{1А} рецепторы локализованы постсинаптически в амигдале, гиппокампе, гипоталамусе, перегородке и других структурах мозга [67, 69]. 5-НТ_{1А} рецепторы играют важную роль в модулировании основных эмоциональных процессов. Более того, множество данных свидетельствует о том, что функция как пре- так и постсинаптических 5-НТ₁₄ рецепторов изменяется у пациентов с тревожностью и депрессией по сравнению со здоровыми людьми [28, 70]. Это указывает на то, что функционирование 5-НТ_{1А} рецепторов может служить как некоторый фактор уязвимости для эмоциональной психопатологии [28, 70]. Гиппокамп и гипоталамус – это структуры, в которых постсинаптические 5-НТ₁ рецепторы являются доминирующими рецепторами. Показано, что острая реакция на стресс у крыс вызывает либо увеличение, либо уменьшение связывания антагониста [1251]-4-(2'-метоксифенил)-1-[2'-(н-2"-пиридинил)п-иодобензамидо]этилпиперазина и агониста [3H]-8-гидрокси-2-(ди-н-пропиламино)тетралина 5-НТ_{1А} рецептора в гиппокампе и/или префронтальной коре в зависимости от стрессора и субрегиона [71]. Можно предположить, что изменение чувствительности постсинаптических 5-НТ₁₄ рецепторов привело к ослаблению метаболизма 5-НТ и усилению реакции на острый стресс у мышей В6-М76С, наблюдаемые в гипоталамусе и гиппокампе.

Мыши обеих линий показали повышение экспрессии гена *c-fos* во всех исследованных областях мозга после воздействия стресса по сравнению с соответствующими контрольными группами. Однако у мышей B6-M76C, подвергавшихся стрессу, наблюдалась повышенная экспрессия гена *c-fos* в префронтальной коре, гипоталамусе и стриатуме по сравнению с мышами линии B6-M76B экспериментальной группы. Ген *c-fos* является геном раннего реагирования и играет важную роль в регуляции нервной системы в ответ на стресс [7]. Индукция *c-fos* является характеристикой острой активации во многих областях мозга [72]. Таким образом, мыши B6-M76C более восприимчивы к острому стрессу, что согласуется с нашими предыдущими результатами и нейроанатомическими данными, полученными на этих животных [35, 38].

Хорошо известное увеличение высвобождения катехоламинов в ответ на стимуляцию симпатических нервов происходит в результате активации симпатических нейронов, которая в более общих реакциях связана с выделением адреналина [73]. Одним из основных стресс-индуцированных реакций адрено-медуллярной системы является примерно трехкратное увеличение экспрессии тирозингидроксилазы и удвоение концентрации дофамин-бета-гидроксилазы [74]. В настоящем исследовании содержание ДА в надпочечниках мышей B6-M76C было в 2 раза выше, чем у B6-M76B мышей в условиях стресса. Реакция на стресс увеличила отношение ДА/НА, являющееся косвенным маркером активности DβH, у мышей B6-M76C, но не у животных линии B6-M76B. Эти результаты, совместно с данными о вызванном стрессом увеличении уровней ДА, НА и А у мышей B6-M76C, позволяют предположить повышенную экспрессию тирозингидроксилазы и DβH в надпочечниках мышей линии B6-M76C.

Другим ответом на стресс является увеличение экспрессии гена, кодирующего фермент PNMT (фенилэтаноламин-N-метилтрансфераза). Увеличение уровня глюкокортикоидов и нервных импульсов из-за стресса стимулирует PNMT более интенсивно преобразовывать НА в А [75]. Мы показали, что уровень А в надпочечниках был значительно выше у B6-M76C, чем у мышей B6-M76B после воздействия стресса. Это может указывать на повышенную активность фермента PNMT у мышей B6-M76C.

Учитывая все данные, полученные в этом исследовании, можно предположить более высокую симпатическую иннервацию надпочечников у мышей B6-M76C по сравнению с мышами линии B6-M76B, что отражается в их более высокой реактивности на острый стресс.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Стоимость содержания животных была поддержана базовым исследовательским проектом № 0324-2019-0041-С-01 и реализована с использованием ресурсов Центра генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (RFMEFI-61914X0005 и RFMEFI62114X0010).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-15-00027).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Селье Г. На уровне целого организма. М. Наука. 1972. [Selye G. At the level of the whole organism. M. Science. 1972. (In Russ)].
- 2. *Меерсон* Ф.3. Адаптация, стресс и профилактика. М. Наука. 1981. [*Meerson F.Z.* Adaptation, stress and prevention. M. Science. 1981. (In Russ)].
- 3. *Pacak K., Palkovits M.* Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. Endocr. Rev. 22(4): 502–548. 2001.
- Zamora-Gonzalez E.O., Santerre A., Palomera-Avalos V., Morales-Villagran A. A chronic combinatory stress model that activates the HPA axis and avoids habituation in BALB/C mice. J. Neurosci. Methods. 213(1): 70–75. 2013.
- 5. Kvetnansky R., Pacak K., Sabban E.L., Kopin I.J., Goldstein D.S. Stressor specificity of peripheral catecholaminergic activation. Adv. Pharmacol. 42: 556–560. 1998.
- 6. Pacak K., Baffi J.S., Kvetnansky R., Goldstein D.S., Palkovits M. Stressor-specific activation of catecholaminergic systems: implications for stress-related hypothalamic-pituitary-adrenocortical responses. Adv. Pharmacol. 42: 561–564. 1998.
- 7. *Seo J.H., Kim T.W., Kim C.J., Sung Y.H., Lee S.J.* Treadmill exercise during pregnancy ameliorates posttraumatic stress disorderinduced anxietylike responses in maternal rats. Mol. Med. Rep. 7(2): 389–395. 2013.
- Robbins T.W., Everitt B.J. Central norepinephrine neurons and behavior. In: Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress. Eds. *Bloom F.E., Kupfer D.J.* New York. Raven Press. 363–372 1995.

- Aston-Jones G., Rajkowski J., Cohen J. Role of locus coeruleus in attention and behavioral flexibility. Biol. Psychiatry. 46(9): 1309–1320. 1999.
- Johnson E.O., Kamilaris T.C., Chrousos G.P., Gold P.W. Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. Neurosci. Biobehav. Rev. 16(2): 115–130. 1992.
- 11. *Koob G.F.* Corticotropin-releasing factor, norepinephrine, and stress. Biol. Psychiatry. 46(9): 1167–1180. 1999.
- 12. Gold P.W., Chrousos G.P. The endocrinology of melancholic and atypical depression: relation to neurocircuitry and somatic consequences. Proc. Assoc. Am. Physicians. 111(1): 22–34. 1999.
- Southwick S.M., Krystal J.H., Morgan C.A., Johnson D., Nagy L.M., Nicolaou A., Heninger G.R., Charney D.S. Abnormal noradrenergic function in posttraumatic stress disorder. Arch. Gen. Psychiatry. 50(4): 266–274. 1993.
- Schatzberg A.F., Schildkraut J.J. Recent studies on norepinephrine systems in mood disorders. In: Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress. Eds. Bloom F.E., Kupfer D.J. New York. Raven Press. 911–920 1995.
- 15. *Sullivan G.M., Coplan J.D., Kent J.M., Gorman J.M.* The noradrenergic system in pathological anxiety: a focus on panic with relevance to generalized anxiety and phobias. Biol. Psychiatry. 46(9): 1205–1218. 1999.
- Jacobs B.L., Fornal C.A. Serotonin and behavior. A general hypothesis. In: Psychopharmacology: The fourth generation of progress. Eds. Bloom F.E., Kupfer D.J. New York. Raven Press. 461–469. 1995.
- Науменко Е.В., Попова Н.К. Серотонин и мелатонин в регуляции эндокринной системы. Н. Наука. 1975. [Naumenko E.V., Popova N.K. Serotonin and melatonin in the regulation of the endocrine system. N. Science. 1975. (In Russ)].
- Jiang D.G., Jin S.L., Li G.Y., Li Q.Q., Li Z.R., Ma H.X., Zhuo C.J., Jiang R.H., Ye M.J. Serotonin regulates brain-derived neurotrophic factor expression in select brain regions during acute psychological stress. Neural Regen. Res. 11(9): 1471–1479. 2016.
- Yamaguchi N., Nakajima N., Okada S., Yuri K. Effects of aging on stress-related responses of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of male rats. Neurobiol. Stress. 3. 43–51. 2016.
- Stamper C.E., Hassell J.E., Jr., Kapitz A.J., Renner K.J., Orchinik M., Lowry C.A. Activation of 5-HT1A receptors in the rat dorsomedial hypothalamus inhibits stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Stress. 20(2): 223–230. 2017.
- 21. *Holmes A*. Genetic variation in cortico-amygdala serotonin function and risk for stress-related disease. Neurosci. Biobehav. Rev. 32(7): 1293–1314. 2008.
- 22. *Liposits Z., Phelix C., Paull W.K.* Synaptic interaction of serotonergic axons and corticotropin releasing factor (CRF) synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. A light and electron microscopic immunocytochemical study. Histochemistry. 86(6): 541–549. 1987.
- Chaouloff F. Physiopharmacological interactions between stress hormones and central serotonergic systems. Brain Res. Brain Res. Rev. 18(1): 1–32. 1993.
- Carrasco G.A., Van de Kar L.D. Neuroendocrine pharmacology of stress. Eur. J. Pharmacol. 463(1–3): 235–272. 2003.
- Pazos A., Probst A., Palacios J.M. Serotonin receptors in the human brain–III. Autoradiographic mapping of serotonin-1 receptors. Neuroscience. 21(1): 97–122. 1987.
- Hall H., Lundkvist C., Halldin C., Farde L., Pike V.W., McCarron J.A., Fletcher A., Cliffe I.A., Barf T., Wikstrom H., Sedvall G. Autoradiographic localization of 5-HT1A receptors in the postmortem human brain using [3H]WAY-100635 and [11C]way-100635. Brain Res. 745(1-2): 96– 108. 1997.
- 27. *Popova N.K., Naumenko V.S.* 5-HT1A receptor as a key player in the brain 5-HT system. Rev. Neurosci. 24(2): 191–204. 2013.
- 28. *Neumeister A., Young T., Stastny J.* Implications of genetic research on the role of the serotonin in depression: emphasis on the serotonin type 1A receptor and the serotonin transporter. Psychopharmacology (Berl). 174(4): 512–524. 2004.
- Nash J.R., Sargent P.A., Rabiner E.A., Hood S.D., Argyropoulos S.V., Potokar J.P., Grasby P.M., Nutt D.J. Serotonin 5-HT1A receptor binding in people with panic disorder: positron emission tomography study. Br. J. Psychiatry. 193(3): 229–234. 2008.
- Richardson-Jones J.W., Craige C.P., Guiard B.P., Stephen A., Metzger K.L., Kung H.F., Gardier A.M., Dranovsky A., David D.J., Beck S.G., Hen R., Leonardo E.D. 5-HT1A autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants. Neuron. 65(1): 40–52. 2010.
- Wang H.T., Han F., Shi Y.X. Activity of the 5-HT1A receptor is involved in the alteration of glucocorticoid receptor in hippocampus and corticotropin-releasing factor in hypothalamus in SPS rats. Int. J. Mol. Med. 24(2): 227–231. 2009.
- 32. *Plyusnina I.Z., Oskina I.N., Tibeikina M.A., Popova N.K.* Cross-fostering effects on weight, exploratory activity, acoustic startle reflex and corticosterone stress response in Norway gray rats selected for elimination and for enhancement of aggressiveness towards human. Behav. Genet. 39(2): 202–212. 2009.

- 33. *Dygalo N.N., Shishkina G.T., Borodin P.M., Naumenko E.V.* Role of the brain neurochemical systems in altering the reactivity of the hypophyseal-adrenal system in the gray rat selected for behavior. Zh. Evol. Biokhim. Fiziol. 21(4): 342–347. 1985.
- Popova N.K., Naumenko V.S., Plyusnina I.Z., Kulikov A.V. Reduction in 5-HT1A receptor density, 5-HT1A mRNA expression, and functional correlates for 5-HT1A receptors in genetically defined aggressive rats. J. Neurosci. Res. 80(2): 286–292. 2005.
- 35. Kulikova E.A., Bazovkina D.V., Akulov A.E., Tsybko A.S., Fursenko D.V., Kulikov A.V., Naumenko V.S., Ponimaskin E., Kondaurova E.M. Alterations in pharmacological and behavioural responses in recombinant mouse line with an increased predisposition to catalepsy: role of the 5-HT1A receptor. Br. J. Pharmacol. 173(13): 2147–2161. 2016.
- 36. *Rea M.A.* Photic entrainment of circadian rhythms in rodents. Chronobiol. Int. 15(5): 395–423. 1998.
- Faccidomo S., Bannai M., Miczek K.A. Escalated aggression after alcohol drinking in male mice: dorsal raphe and prefrontal cortex serotonin and 5-HT(1B) receptors. Neuropsychopharmacology. 33(12): 2888–2899. 2008.
- 38. Kulikova E.A., Bazovkina D.V., Antonov Y.V., Akulov A.E., Kulikov A.V., Kondaurova E.M. Alteration of the brain morphology and the response to the acute stress in the recombinant mouse lines with different predisposition to catalepsy. Neurosci. Res. 117. 14–21. 2017.
- 39. Garner B., Pariante C.M., Wood S.J., Velakoulis D., Phillips L., Soulsby B., Brewer W.J., Smith D.J., Dazzan P., Berger G.E., Yung A.R., van den Buuse M., Murray R., McGorry P.D., Pantelis C. Pituitary volume predicts future transition to psychosis in individuals at ultra-high risk of developing psychosis. Biol. Psychiatry. 58(5): 417–423. 2005.
- 40. Hendrickx A., Pierrot N., Tasiaux B., Schakman O., Kienlen-Campard P., De Smet C., Octave J. N. Epigenetic regulations of immediate early genes expression involved in memory formation by the amyloid precursor protein of Alzheimer disease. PLoS One. 9(6): e99467. 2014.
- 41. Gao P., Limpens J.H., Spijker S., Vanderschuren L.J., Voorn P. Stable immediate early gene expression patterns in medial prefrontal cortex and striatum after long-term cocaine self-administration. Addict. Biol. 22(2): 354–368. 2017.
- 42. Куликов А.И., Базовкина Д.В. Проверка гипотез о сцеплении в гибридологическом анализе альтернативных поведенческих признаков с неполной пенетрантностью. Генетика 39(8): 1066–1072. 2003. [Kulikov A.V., Bazovkina D.V. Testing linkage hypothesis in hybrid analysis of alternatively distributed behavioral traits with incomplete penetrance. Genetika. 39(8): 1066–1072. 2003. (In Russ)].
- 43. *Kondaurova E.M., Bazovkina D.V., Kulikov A.V., Popova N.K.* Selective breeding for catalepsy changes the distribution of microsatellite D13Mit76 alleles linked to the 5-HT serotonin receptor gene in mice. Genes Brain Behav. 5(8): 596–601. 2006.
- 44. Kulikov A.V., Bazovkina D.V., Kondaurova E.M., Popova N.K. Genetic structure of hereditary catalepsy in mice. Genes Brain Behav. 7(4): 506–512. 2008.
- 45. *Naumenko V.S., Kulikov A.V.* Quantitative assay of 5-HT(1A) serotonin receptor gene expression in the brain. Mol. Biol. (Mosk.). 40(1): 37–44. 2006.
- 46. *Naumenko V.S., Osipova D.V., Kostina E.V., Kulikov A.V.* Utilization of a two-standard system in real-time PCR for quantification of gene expression in the brain. J. Neurosci. Methods. 170(2): 197–203. 2008.
- Kulikov A.V., Naumenko V.S., Voronova I.P., Tikhonova M.A., Popova N.K. Quantitative RT-PCR assay of 5-HT1A and 5-HT2A serotonin receptor mRNAs using genomic DNA as an external standard. J. Neurosci. Methods. 141(1): 97–101. 2005.
- 48. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 (248–254). 1976.
- 49. *Cannon W.J.* The emergency function of the adrenal medulla in pain and the major emotions. Am. J. Physiol. 33. 356–372. 1914.
- Maes M., Meltzer H.Y., Suy E., Minner B., Calabrese J., Cosyns P. Sleep disorders and anxiety as symptom profiles of sympathoadrenal system hyperactivity in major depression. J. Affect. Disord. 27(3): 197–207. 1993.
- Joseph D.N., Whirledge S. Stress and the HPA Axis: Balancing Homeostasis and Fertility. Int. J. Mol. Sci. 18(10): 2017.
- Kaushik R.M., Mahajan S.K., Rajesh V., Kaushik R. Stress profile in essential hypertension. Hypertens. Res. 27(9): 619–624. 2004.
- 53. *Whitnall M.H.* Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. Prog. Neurobiol. 40(5): 573–629. 1993.
- 54. *Науменко Е.В.* Центральная регуляция гипофизарно-надпочечникового комплекса. Ленинград. Наука. 1971. [*Naumenko E.V.* Central regulation of the pituitary-adrenal complex. Leningrad. The science. 1971. (In Russ)].
- 55. Shanks N., Griffiths J., Anisman H. Norepinephrine and serotonin alterations following chronic stressor exposure: mouse strain differences. Pharmacol. Biochem. Behav. 49(1): 57–65. 1994.

- 56. Shanks N., Griffiths J., Anisman H. Central catecholamine alterations induced by stressor exposure: analyses in recombinant inbred strains of mice. Behav. Brain Res. 63(1): 25–33. 1994.
- Nakagawa R., Tanaka M., Kohno Y., Noda Y., Nagasaki N. Regional responses of rat brain noradrenergic neurones to acute intense stress. Pharmacol. Biochem. Behav. 14(5): 729–732. 1981.
- Tanaka M., Kohno Y., Nakagawa R., Ida Y., Takeda S., Nagasaki N. Time-related differences in noradrenaline turnover in rat brain regions by stress. Pharmacol. Biochem. Behav. 16(2): 315–319. 1982.
- 59. *Irwin J., Ahluwalia P., Anisman H.* Sensitization of norepinephrine activity following acute and chronic footshock. Brain Res. 379(1): 98–103. 1986.
- Adell A., Garcia-Marquez C., Armario A., Gelpi E. Chronic stress increases serotonin and noradrenaline in rat brain and sensitizes their responses to a further acute stress. J. Neurochem. 50(6): 1678–1681. 1988.
- Pol O., Campmany L., Gil M., Armario A. Behavioral and neurochemical changes in response to acute stressors: influence of previous chronic exposure to immobilization. Pharmacol. Biochem. Behav. 42(3): 407–412. 1992.
- Morilak D.A., Barrera G., Echevarria D.J., Garcia A.S., Hernandez A., Ma S., Petre C.O. Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 29(8): 1214–1224. 2005.
- Culman J., Kvetnansky R., Torda T., Murgas K. Serotonin concentration in individual hypothalamic nuclei of rats exposed to acute immobilization stress. Neuroscience. 5(8): 1503–1506. 1980.
- 64. Lowry C.A., Plant A., Shanks N., Ingram C.D., Lightman S.L. Anatomical and functional evidence for a stress-responsive, monoamine-accumulating area in the dorsomedial hypothalamus of adult rat brain. Horm. Behav. 43(1): 254–262. 2003.
- Canteras N.S., Simerly R.B., Swanson L.W. Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. J. Comp. Neurol. 348(1): 41–79. 1994.
- 66. Bernardis L.L., Bellinger L.L. The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1998 update. Proc. Soc. Exp. Biol Med. 218(4): 284–306. 1998.
- 67. Zifa E., Fillion G. 5-Hydroxytryptamine receptors. Pharmacol. Rev. 44(3): 401–458. 1992.
- Aghajanian G. Electrophysiology of serotonin receptor subtypes and signal transduction pathways. In: Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress. Eds. Bloom F.R., Kupfer D.J. New York. Raven Press. 1451–1459. 1995.
- Barnes N.M., Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. Neuropharmacology. 38(8): 1083–1152. 1999.
- Garcia-Garcia A.L., Newman-Tancredi A., Leonardo E.D. 5-HT(1A) [corrected] receptors in mood and anxiety: recent insights into autoreceptor versus heteroreceptor function. Psychopharmacology (Berl). 231(4): 623–636. 2014.
- 71. Raghupathi R.K., McGonigle P. Differential effects of three acute stressors on the serotonin 5-HT1A receptor system in rat brain. Neuroendocrinology. 65(4): 246–258. 1997.
- Paikovits M. Stress related central neuronal regulatory circuits. In: Stress: Neuronal Endocrine and Molecular studies. Ed. McCarty R. Londin. Taylor and Fransis. 1–11. 2002.
- 73. *Bell C*. Dopamine release from sympathetic nerve terminals. Prog. Neurobiol. 30(2–3): 193–208. 1988.
- Kopin I.J., Eisenhofer G., Goldstein D. Adrenergic response following recognition of stress. In: Molecular Biology of Stress, UCLA symposia on molecular and cellular biology. Eds. Bregnitz S., Zinder O. New York. Alan R Liss, Inc. 123–132 1989.
- Wurtman R.J. Stress and the adrenocortical control of epinephrine synthesis. Metabolism. 51(6 Suppl 1): 11–14. 2002.

Acute Stress Effects on Mice Differeding by Sensivity of 5-HT_{1A}-Receptor to Chronic Activation with 8-OH-DPAT

E. M. Kondaurova^{*a*, *, #}, Y. V. Antonov^{*a*, #}, E. Y. Bazhenova^{*a*}, D. V. Bazovkina^{*a*}, and V. S. Naumenko^{*a*}

^aInstitute of Cytology and Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia *e-mail: kond_em@bionet.nsc.ru

[#]Autors equally contributed to this work.

Recently the B6.CBA-D13Mit76C (B6-M76C) and B6.CBA-D13Mit76B (B6-M76B) recombinant mouse lines have been created, which differ in the sensitivity of the 5-HT_{1A}-receptor to chronic activation by an 8-OH-DPAT (8-hydroxy-2- (di-n-propylamino) tetralin). 5-HT_{1A}-receptor is the key regulator of the brain serotonin

(5-HT) system that is implicated in the regulation of stress response. In this work, it was found that acute emotional stress (immobilization of 40 min) increases the expression of the *c*-fos gene, which is a marker of the response to stress, in the brain of both lines. The stress-induced increase *c-fos* expression in the striatum, hypothalamus, and cortex of B6-M76C mice was more pronounced. The reaction to emotional stress led to an increase in the ratio of the serotonin metabolite - 5-HIAA (5-hydroxyinodolacetic acid) to 5-HT in the midbrain and hippocampus in both lines. An increased 5-HIAA/5-HT ratio was detected in the hypothalamus B6-M76C and cortex B6-M76B of mice after stress. Moreover, the reaction to stress led to decrease in the level of norepinephrine in the hippocampus and hypothalamus in B6-M76C mice. The levels of dopamine, norepinephrine, epinephrine and the dopamine/norepinephrine ratio in the adrenal glands increased in response to the stress effect only in B6-M76C. The present study showed that the sympathoadrenal system is more sensitive to acute stress in the B6-M76C mice. Reaction to stress in B6-M76C mice leads to an increase in the content of norepinephrine and epinephrine in adrenal tissue. An increase in the adrenal dopamine/norepinephrine ratio may indicate a more rapid transition of catecholamine biosynthesis intermediates (dopamine) to norepinephrine and further epinephrine due to the acceleration of the biosynthetic process in response to stress in B6-M76C mice. In addition, an increased sensitivity of the hypothalamic neurons to the action of stress in B6-M76C was shown. Thus, B6-M76C mice are of significant interest for the study of the hypothalamic-pituitary-adrenal system with an overactive response to stress, and can contribute to the identification of new biomarkers for clinical studies

Keywords: Acute stress, 5-HT_{1A}-receptor, mice, *c-fos* gene, 5-HT metabolism, adrenal catecholamines

ЦИТИРОВАТЬ:

Кондаурова Е.М., Антонов Е.В., Баженова Е.Ю., Базовкина Д.В., Науменко В.С. Эффекты острого стресса у мышей, различающихся чувствительностью 5-НТ1а-рецепторов к хронической активации с помощью 8-OH-DPAT. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 106(9): 1069–1084.

DOI: 10.31857/S0869813920090010

TO CITE THIS ARTICLE:

Kondaurova E.M., Antonov Y.V., Bazhenova E.Y., Bazovkina D.V., Naumenko V.S. Acute Stress Effects on Mice Differeding by Sensivity of 5-HT1A-Receptor to Chronic Activation with 8-OH-DPAT. Russian Journal of Physiology. 106(9): 1069–1084.

DOI: 10.31857/S0869813920090010

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 9, с. 1085-1097

= ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ ==

ИЗМЕНЕНИЕ ХАРАКТЕРА ПОВЕДЕНИЯ И АКТИВНОСТИ ГИПОФИЗАРНО-АДРЕНОКОРТИКАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ КРЫС – ПОТОМКОВ ОТЦОВ, ПОДВЕРГНУТЫХ СТРЕССИРОВАНИЮ В ПАРАДИГМЕ "СТРЕСС–РЕСТРЕСС" ПЕРЕД СПАРИВАНИЕМ

© 2020 г. Н. Э. Ордян^{1,} *, С. Г. Пивина¹, В. К. Акулова¹, Г. И. Холова¹

¹Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия *E-mail: neo@infran.ru

> Поступила в редакцию 18.05.2020 г. После доработки 19.06.2020 г. Принята к публикации 05.07.2020 г.

В работе изучено влияние стрессирования самцов крыс в парадигме "стресс-рестресс", являющейся моделью посттравматического стрессового расстройства (ПТСР) на поведенческий фенотип и активность гипофизарно-адренокортикальной системы (ГАС) их половозрелых потомков обоего пола. Показано, что только часть самцов формируют ПТСР-подобное состояние, характеризующееся сниженным базальным уровнем кортикостерона. Потомки этих самцов имели низкую массу тела в неонатальный период развития, а во взрослом возрасте характеризовались сниженной двигательной активностью и повышенной депрессивностью поведения. Базальная и стрессорная активность ГАС этих животных была снижена, а чувствительность изученной гормональной оси к сигналам отрицательной обратной связи усилена. Поведенческие изменения были наиболее выражены у потомков-самцов, тогда как у потомков-самок последствия ПТСРподобного состояния отцов выявлены только в отношении уровня тревожности и активности ГАС. Потомки самцов, не сформировавших ПТСР-подобное состояние, имели наименьшие изменения в поведении и активности ГАС. Высказано предположение, что выраженность действия стресса отца на потомков определяется индивидуальной стресс-устойчивостью самцов-отцов.

Ключевые слова: посттравматическое стрессовое расстройство, стресс отца, потомки, поведение, гипофизарно-адренокортикальная система, крыса

DOI: 10.31857/S0869813920090058

В настоящее время возрастает количество экспериментальных и эпидемиологических данных, указывающих на влияние отцовского стресса на поведение потомков. На лабораторных грызунах было установлено, что независимо от периода онтогенеза (стресс в ювенильном возрасте или у половозрелых животных), когда предъявлялись стрессорные воздействия самцам, у потомков проявляется увеличение депрессивно-подобного и тревожного поведения. Так, Franklin с соавт. показали, что длительный отъем от матери с 1-го по 14-й дни жизни у самцов формирует депрессивно-подобный фенотип, который проявляется у их потомков первого и даже второго поколения [1]. В исследованиях других авторов, проведенных на половозрелых мышах, получены сходные данные, но с использованием парадигмы "стресс социальных поражений" [2]. Отметим, что в этих исследованиях в качестве стрессорных воздействий самцам предъявлялись стрессоры, которые у крыс и мышей формируют депрессивно-подобное состояние, проявляющееся не только в усилении депрессивно-подобного поведения, но и в повышенной секреции глюкокортикоидов — характерный клинический симптом больных депрессией [3, 4].

В эпидемиологических исследованиях была обнаружена связь между стрессом отца и физиологическими особенностями их детей. Показано, что в семьях больных посттравматическим стрессовым расстройством (ПТСР), этиология которого связана с сильным психотравматизирующим стрессорным воздействием, наблюдается усиление ПТСР-подобных симптомов у их потомков, которые сами по себе воздействию травматического стресса не подвергались [5, 6]. Развитие ПТСР, хотя и связано с сильным стрессорным воздействием, в отличие от депрессии характеризуется иным профилем активности гипофизарно-адренокортикальной системы (ГАС), заключающимся не только в снижении базальной активности, но и в повышенной чувствительности к сигналам отрицательной обратной связи [7]. Такое состояние отцов перед зачатием может специфическим образом проявляться у их потомков. Однако экспериментальных исследований влияния ПТСР отца на физиологические функции потомков не проводили.

В связи с этим в настоящем исследовании изучено влияние ПТСР-подобного состояния самцов крыс перед спариванием на поведенческий фенотип и характер активности ГАС их потомков обоего пола. Для формирования у самцов признаков ПТСР использовали парадигму "стресс—рестресс", в которой сниженный уровень кортикостерона и повышенная тревожность сохраняются длительно [8].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты выполнены на половозрелых самцах крыс линии Вистар массой 240–250 г из ЦКП "Биоколлекция" Института физиологии им. И.П. Павлова РАН и их потомстве обоего пола 75-дневного возраста массой 230–240 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария без ограничения доступа к воде и пище (гранулированный корм) и 12-часовом световом режиме. Все манипуляции с животными были проведены в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями Комиссии по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Парадигму "стресс—рестресс" использовали в качестве модели ПТСР. Самцов (n = 10) подвергали комбинированному стрессорному воздействию с последующим рестрессом на 7-е сутки после комбинированного стресса по методике, описанной ранее [8]. Животные подвергались комбинированному стрессу, состоящему из двухчасовой иммобилизации, 20-минутного плавания и эфирного стресса до потери сознания. Триггером для развития патологического состояния являлся повторный стресс ("рестресс"), заключавшийся в иммобилизационном стрессе в течение 30 мин, проведенном на 7-е сутки после комбинированного стресса. Контрольных самцов (n = 10) оставляли интактными.

С целью контроля развития у самцов ПТСР-подобного состояния на 10-е сутки после рестресса у контрольных и стрессированных самцов осуществляли забор крови из хвостовой вены для определения уровня кортикостерона.

Через 38—40 сут после рестресса самцов обеих групп поодиночке подсаживали к двум регулярно циклирующим самкам, находящимся в стадии проэструс—эструс. Наступление беременности контролировали по наличию сперматозоидов в вагинальном мазке. В случае, если беременность не наступала, самцов оставляли с самками еще на один эстральный цикл. Самок, у которых в вагинальном мазке обнаруживали сперматозоиды, сразу отсаживали от самцов и до 17-го дня беременности содержали в группах по 6 животных, а далее по одной особи в клетке. На следующий день после родов число крысят в пометах выравнивали до 8 животных с равным соотношением полов. Пометы с преобладанием крысят одного пола или с малым количеством животных из исследования исключали.

Полученное потомство содержали совместно с самками до 30-дневного возраста, а затем в группах по 6—7 животных в соответствии с полом. С целью контроля соматического развития потомков стрессированных и интактных самцов взвешивали на 5-й, 10-й, 15-й и 20-й дни жизни. Дальнейшие эксперименты выполнены на половозрелых потомках обоего пола.

Поведение самцов и самок – потомков контрольных и стрессированных отцов – изучали с использованием различных тестов, позволяющих оценить уровень тревожности (тест приподнятый крестообразный лабиринт), ориентировочно-исследовательскую активность (тест открытое поле) и депрессивность поведения (тест вынужденное плавание). Все тесты выполняли на одних и тех же животных, последовательность тестов определялась их стрессогенностью. До начала тестирования всех животных ежедневно брали в руки на протяжении 8 дней (хендлирование). У самок хендлирование совмещали с взятием влагалищных мазков с целью определения стадии эстрального цикла. Для поведенческих тестов брали только регулярно циклирующих самок. Тестирование самок начинали в стадию диэструс.

В первый день выполняли тест приподнятый крестообразный лабиринт, как наименее стрессогенный. Каждое животное помещали в центр лабиринта, состоящего из двух закрытых и двух открытых рукавов (НПК Открытая наука, Россия). Открытые рукава имели дополнительное освещение 150 лк. В течение 5 мин регистрировали время нахождения животных в открытых или закрытых рукавах. Уровень тревожности рассчитывали как обратно пропорциональное время пребывания крысы в открытых рукавах.

На второй день крыс тестировали в открытом поле, которое представляло собой четырехугольную камеру размером $90 \times 90 \times 50$ см, пол которой был расчерчен на 30 квадратов размером 15×15 см каждый. Освещенность камеры составляла 300 лк. В этом тесте в течение 5 мин регистрировали следующие параметры: число пересеченных квадратов, число вертикальных стоек без упора, продолжительность груминга и замирания.

Тест вынужденное плавание выполняли через 7 сут после теста открытое поле. В этом тесте крыс индивидуально помещали в стеклянные цилиндры (55×20 см), заполненные водой на уровне 30 см, температура воды поддерживалась на постоянном уровне 23—25°C. Время неподвижности регистрировали в течение 5 мин.

Поведение животных фиксировали с помощью видеокамеры (CANON, Япония), расположенной над соответствующей установкой, с последующим просмотром видео и анализом параметров поведения на персональном компьютере.

Поведенческие тесты проводили в 11.00–15.00 ч. В каждой экспериментальной группе животных участвовало 8 самцов и самок.

Отдельную группу животных — потомков стрессированных и контрольных самцов — использовали для изучения активности ГАС, которую оценивали по уровню кортикостерона в покое (базальный уровень) и по динамике изменения уровня этого гормона в ответ на 30-минутную иммобилизацию. Каждую крысу помещали в пластиковый пенал и в течение не более 3 мин из хвостовой вены отбирали пробы крови (0 мин, базальная активность). Далее через 30 мин повторяли отбор крови (30 мин, стрессорная активность ГАС). Затем крысу из пенала извлекали, помещали в домашнюю клетку, а через 180 мин кровь из хвостовой вены отбирали вновь (торможение ГАС после стрессорной активации). Полученные пробы крови центрифугировали (1000 g, 20 мин, 4°С) и далее плазму хранили при температуре -20° С до момента определения содержания в ней кортикостерона.

Уровень кортикостерона в плазме крови определяли методом иммуноферментного анализа, используя стандартные наборы производства ХЕМА (Россия) и ана-

лизатор Multickan FS (Thermo Fisher Scientific, Финляндия). Оценку активности ГАС проводили с 11-00 до 14-00 ч. Каждая группа контрольных и подопытных крыс состояла из 6 животных соответствующего пола.

Статистическую обработку результатов поведенческих тестов проводили с использованием пакета программ STATISTICA 8.0. Уровень кортикостерона в крови самцов-отцов оценивали с применением U-критерия Манна–Уитни. Влияние стресса отца на массу тела потомков в разные дни жизни оценивали с помощью однофакторного анализа ANOVA. Результаты поведенческих тестов анализировали с использованием однофакторного и двухфакторного анализа ANOVA (экспериментальная группа × пол животного). Характер активности ГАС оценивали с помощью двухфакторного анализа ANOVA (экспериментальная группа × уровень кортикостерона в зависимости от времени начала стрессирования). При выявлении различий проводили последующие парные *post-hoc* сравнения (тест Тьюки). Равенство дисперсий анализировали с применением критерия Ливиня, который показал однородность дисперсий для всех выборок (p > 0.05). Для проверки гипотезы нормальности распределения данных в выборках использовали критерий Шапиро– Уилка. В качестве критерия статистически значимого различия принимали p < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведенные исследования показали, что только у части самцов-отцов (n = 6), подвергнутых стрессированию, наблюдается сниженный уровень кортикостерона в крови (65 ± 8.1 нмоль/л, p < 0.05) на 10-е сутки после рестресса, тогда как у 4 самцов уровень кортикостерона (187 ± 21.2 нмоль/л) не отличался от контрольных, не стрессированных животных (192 ± 22.3 нмоль/л).

Результаты исследования соматического развития крысят — потомков контрольных и стрессированных отцов — представлены в табл. 1. Однофакторный дисперсионный анализ соматического развития крысят выявил эффект отца (группы животных) на массу тела потомков-самцов на 5-й ($F_{2,56} = 41.3$, p < 0.0001) и на 10-й дни жизни ($F_{2,47} = 3.4$, p = 0.038). При этом животные, родившиеся от отцов в ПТСР-подобном состоянии (низкий уровень кортикостерона), отличались сниженной массой тела на 5-й и 10-й дни жизни как от потомков контрольных самцов, так и от потомков отцов с нормальным уровнем кортикостерона после стрессирования. Сходное влияние отца на массу тела было обнаружено и у потомков самок на 5-й ($F_{2,55} = 16.5$, p < 0.0001) и на 10-й дни жизни ($F_{2,55} = 6.1$, p = 0.004). Самки — потомки отцов с низким уровнем кортикостерона после стрессирования имели статистически значимо более низкую массу тела, чем самки, родившиеся от контрольных или стрессированных самцов с нормальным уровнем кортикостерона после трессирования имели статистически значимо более низкую массу тела, чем самки, родившиеся от контрольных или стрессированных самцов с нормальным уровнем кортикостерона после трессирования имели статистически значимо более низкую массу тела, чем самки, родившиеся от контрольных или стрессированных самцов с нормальным уровнем кортикостерона на 5-й и 10-й дни жизни.

В связи с этим в дальнейших исследованиях мы анализировали поведение потомков стрессированных отцов, разделив их на группу 1 (низкая масса тела) и группу 2 (нормальная масса тела).

Однофакторный дисперсионный анализ ориентировочно-исследовательского поведения в тесте открытое поле выявил значимое влияние отца на локомоторную активность ($F_{2,23} = 5.7$, p = 0.009) и продолжительность замирания ($F_{2,23} = 3.9$, p = 0.03) потомков-самцов (рис. 1). Потомки-самцы с низкой массой тела в раннем неонатальном периоде имели сниженную локомоторную активность по сравнению с потомками контрольных самцов, а также увеличенное время замирания. Потомки самцов с нормальным уровнем кортикостерона демонстрировали лишь тенденцию к снижению времени замирания (p = 0.06) по сравнению с потомками контрольных самцов.

Группа самиов-отнов	Macca тела крысят потомков-самцов (г) Body weight of male offspring (g)				
Father group	5 дней жизни 5 day of life	10 дней жизни 10 day of life	15 дней жизни 15 day of life	20 дней жизни 20 day of life	
Травматический стресс и рес- тресс (группа 1) Traumatic stress and restress (group 1)	11.3 ± 0.19**	$21.4 \pm 0.4^*$ 32.13 ± 0.3		41 ± 2.5	
Травматический стресс и рестресс (группа 2) Traumatic stress and restress (group 2)	13.9 ± 0.2	22.9 ± 0.5 32.9 ± 0.3		43.5 ± 1.9	
Контрольная группа Control group	13.2 ± 0.2	22.8 ± 0.4 33 ± 0.7		44 ± 1.5	
	Macca тела крысят потомков-самок (г) Body weight of female offspring (g)				
Травматический стресс и рестресс (группа 1) Traumatic stress and restress (group 1)	11.2 ± 0.2**	20.6 ± 0.6**	29.8 ± 1.4 (<i>p</i> = 0.05)	39.0 ± 1.6	
Травматический стресс и рестресс (группа 2) Traumatic stress and restress (group 2)	12.4 ± 0.1	22.8 ± 0.2	31.4 ± 0.3	41.0 ± 0.9	
Контрольная группа Control group	12.5 ± 0.2	21.7 ± 0.5	31.9 ± 0.6	41 ± 1.4	

Таблица	 Эффен 	сты стресса	отцов на	массу их	потомков	- самцов и	а самок
Table 1.	Effects of	paternal stre	ess on body	weight o	f male and	female offsp	oring

Достоверное отличие от контрольной группы животных:* p < 0.05, ** p < 0.01. Significant difference from the offspring of control males :* p < 0.05, ** p < 0.01.

Выявлено также влияние фактора отец на время неподвижности в тесте вынужденное плавание ($F_{2,23} = 7.8$, p = 0.002). Самцы, рожденные от отцов с низким уровнем кортикостерона, характеризовались большим временем неподвижности (рис. 1, *G*) по сравнению с потомками контрольных самцов.

В то же время у самок – потомков стрессированных отцов – существенных изменений поведенческих характеристик практически во всех использованных тестах не обнаружено (рис. 2). Однофакторный дисперсионный анализ показал значимое влияние фактора отец на время пребывания в открытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта ($F_{2,23} = 3.4, p = 0.004$), а также снижение времени пребывания крыс 1-й группы (низкая масса тела) в открытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта и соответственно увеличение уровня тревожности по сравнению с самками – потомками контрольных самцов.

Двухфакторный дисперсионный анализ поведения самцов и самок разных экспериментальных групп выявил взаимодействие факторов группа животных × пол животных на уровень тревожности – время пребывания в открытых рукавах ($F_{2,47} = 4.02$, p = 0.002) и время неподвижности в тесте вынужденное плавание ($F_{2,47} = 6.2$, p = 0.004), что свидетельствует о межполовых различиях в действии стресса отца на тревожное и депрессивно-подобное поведение потомков. Двухфакторный дисперсионный анализ выявил статистически значимое влияние у самцов фактора группа животных ($F_{2,35} = 8.4$, p = 0.0006) и уровня кортикостерона в зависимости от времени начала стрессирования ($F_{2,35} = 63.6$, p < 0.0001) у потомков-самцов, взаимодействие этих факторов было статистически значимо ($F_{4,35} = 5.7$, p = 0.005). У потомков-самок также было обнаружено статистически значимое влияние фактора группа животных ($F_{2,35} = 23.9$, p < 0.0001) и уровня кортикостерона в зависимости от времени начала стрессирования ($F_{2,35} = 53.2$, p < 0.0001), а также взаимодействие этих факторов ($F_{4,35} = 12.4$, p < 0.0001).

Сравнение уровня кортикостерона в каждой временной точке стрессорного ответа показало статистически значимое снижение базального уровня гормона у самцов и самок 1-й группы (низкая масса тела), более низкий уровень кортикостерона через 180 мин после начала иммобилизации по сравнению с контрольными крысами (рис. 3). Последние данные указывают на более быстрое торможение активности ГАС после стрессорной активации. У самцов 1-й группы и у самок обеих групп выявлено снижение стрессорного уровня кортикостерона в 30-минутной временной точке по сравнению с контрольными животными. Таким образом, стресс самцов перед спариванием оказывает влияние на базальную и стрессорную реактивность ГАС потомков обоего пола. У потомков, имевших низкую массу тела в неонатальном периоде развития, изменения активности ГАС более выражены.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В исследованиях, выполненных Cohen и Zohar на популяции крыс линии Спрэг—Доули, было показано, что только четверть животных проявляет максимальное или минимальное изменение в поведении в модели ПТСР, а у половины из протестированных крыс нарушения в поведении были выражены частично [9]. При использовании аналогичного подхода (разделение животных по выраженности поведенческих нарушений при моделировании ПТСР) был показан различный профиль экспрессии генов в мозге чувствительных и устойчивых к стрессу животных и, в частности, в отношении экспрессии гена глюкокортикоидных рецепторов у чувствительных крыс [10].

Помимо поведенческих проявлений ПТСР-подобного состояния надежным показателем его развития в модельных экспериментах служит снижение активности ГАС, поскольку это является диагностическим критерием ПТСР в клинике [7]. Ос-

Рис. 1. Эффекты стресса отца на поведение потомков-самцов, различающихся массой тела в неонатальный период развития, в тесте открытое поле (A-D), в тесте приподнятый крестообразный лабиринт (E, F) и тесте вынужденное плавание (G). A – локомоторная активность (число пересеченных квадратов); B – число вертикальных стоек; C – продолжительность замирания; D – продолжительность реакции груминга; E – время пребывания животных в закрытых рукавах лабиринта; F – время пребывания животных в открытых рукавах лабиринта; G – время неподвижности. Светлые столбики – потомки контрольных самцов, темные столбики – потомки стрессированных самцов с низкой массой в неонатальный период, столбики со штриховкой – потомки стрессированных самцов с нормальной массой тела в неонатальный период. Различия между потомками контрольных и стрессированных самцов: * p < 0.05, ** p < 0.01, # p = 0.06.

Fig. 1. Effects of paternal stress onbehavior of male offspring differing in body weight in the neonatal period of development in the open field (A-D), the elevated plus maze (E, F), and the forced swim test (G). A – locomotor activity (number of crossed squares), B – number of rearing, C – duration of freezing reaction, D – duration of grooming reaction, E – time spent in closed arms, F – time spent in open arms, G – time of immobility. Open bars – the offspring of control males, black bars – the offspring of stressed males with normal weight in the neonatal period, shadedblack bars – the offspring of stressed males: p < 0.05, ** p < 0.01, # p = 0.06.





новываясь на этих данных, мы оценили уровень кортикостерона у самцов-отцов, подвергнутых стрессированию в парадигме "стресс—рестресс". Оказалось, что, действительно, только у части самцов наблюдалось снижение уровня кортикостерона в крови на 10-е сутки после рестресса, что расценено нами как ПТСР-подобное состояние. Примечательно, что именно потомки этих самцов имели сниженную массу тела в ранний неонатальный период развития.

В литературе имеются многочисленные указания на то, что низкая масса тела при рождении служит фактором риска развития в последующей жизни многих заболеваний, таких как метаболический синдром [11], сердечно-сосудистыезаболевания [12], синдром гиперактивности и дефицита внимания [13], а также депрессии [14]. В исследованиях на лабораторных животных были получены сходные результаты [15, 16].

Оценивая дифференцированно поведенческие и гормональные проявления стресса самцов-отцов у их потомков с низкой и нормальной массой тела при рождении, мы выявили, что у потомков с низкой массой поведенческие изменения были более выражены. Так, у потомков-самцов с низкой массой наблюдали снижение локомоторной активности и увеличение времени неподвижности в тесте открытое поле. Кроме того, у самцов с низкой массой возрастало время неподвижности в тесте вынужденное плавание и соответственно усиливалась депрессивность поведения. Следует отметить, что у самок-потомков стрессированных отцов независимо от массы тела при рождении поведенческие изменения были минимальны. Только у самок с низкой массой тела выявлено увеличение уровня тревожности в тесте приподнятый крестообразный лабиринт. Более выраженный эффект стрессирования отцов перед спариванием у потомков с низкой массой проявлялся и в отношении активности ГАС. Причем, эти эффекты были сходны у потомков-самцов и самок и заключались в снижении базальной и стрессорной активности системы, а также ускоренном ее торможении после стрессорной активации. Снижение стрессорной активности ГАС также выявлено у потомков-самок с нормальной массой тела.

Изменения в поведении и активности ГАС потомков стрессированных отцов были обнаружены и другими авторами. Однако результаты этих работ весьма противоречивы. Так, было показано, что хронический умеренный стресс самцов мышей как в период пубертата, так и в период половой зрелости снижает общий стрессорный выброс кортикостерона у потомков-самцов и самок, но не оказывает влияние на поведение [17]. В работе других авторов, напротив, было показано, что хронический стресс социальных поражений в течение 10 дней самцов мышей перед спариванием повышает базальный уровень кортикостерона у их потомков и

Рис. 2. Эффекты стресса отца на поведение потомков-самок, различающихся массой тела в неонатальный период развития, в тесте открытое поле (A-D), в тесте приподнятый крестообразный лабиринт (E, F) и тесте вынужденное плавание (G). A – число пересеченных квадратов; B – число вертикальных стоек; C – продолжительность замирания; D – продолжительность реакции груминга; E – время пребывания животных в экрытых рукавах лабиринта; F – время пребывания животных в открытых рукавах лабиринта; G – время неподвижности. Светлые столбики – потомки контрольных самцов, темные столбики – потомки стрессированных самцов с низкой массой тела в неонатальный период, *p < 0.05 – достоверные различия между потомками контрольных и стрессированных самцов.

Fig. 2. Effects of paternal stress on behavior of female offspring differing in body weight in the neonatal period of development in the open field (A-D), the elevated plus maze (E, F), and the forced swim test (G). A – locomotor activity (number of crossed squares), B – number of rearing, C – duration of freezing reaction, D – duration of grooming reaction, E – time spent in closed arms, F – time spent in open arms, G – time of immobility. Open bars – the offspring of control males, black bars – the offspring of stressed males with low weight in the neonatal period, shadedblack bars – the offspring of stressed males with normal weight in the neonatal period. * p < 0.05 – significant differences between female offspring of control and stressed males.






Рис. 3. Эффекты стресса отца на уровень кортикостерона (nmol/l) в плазме крови в ответ на 30-минутный иммобилизационный стресс у потомков-самцов (A) и самок (B) крыс, различающихся массой тела в неонатальный период развития. Светлые столбики – потомки контрольных самцов, темные столбики – потомки стрессированных самцов с низкой массой тела в неонатальный период, столбики со штрихов-кой – потомки стрессированных самцов с нормальной массой тела в неонатальный период. 0 min – базальный уровень кортикостерона; 30 min – иммобилизация; 180 min – уровень кортикостерона спустя 3 ч. Достоверные различия между потомками контрольных и стрессированных самцов: * p < 0.01. ** p < 0.001. Fig. 3. Effects of paternal stress on plasma corticosterone (nmol/l) response to an acute 30 min restraint stress in their male (A) and female (B) offspring differing in body weight in the neonatal period of development. Open bars – the offspring of control males, black bars – the offspring of stressed males with normal weight in the neonatal period. 0 min – basal level of corticosterone; 30 min – restraint; 180 min – level of corticosterone 3 hr later. Significant difference from the offspring of control males: * p < 0.01, ** p < 0.001.

формирует поведенческий фенотип, характеризующийся повышенной тревожностью и депрессивностью [2]. Хроническое стрессирование (вариант иммобилизационного стресса в течение 30 мин дважды в день) самцов крыс линии Лонг—Еванс в течение 27 дней перед спариванием повышало уровень тревожности у потомков в период пубертата и снижало его у взрослых крыс [18]. Моделирование стресса у самцов мышей путем хронического введения кортикостерона в течение 4 нед. повышало уровень тревожности у потомков, но только у самцов, в то время как у самок изменений в поведении этими авторами не обнаружено [19]. В исследованиях Yeshurun и соавт. [20], напротив, было показано преимущественное влияние хронического введения глюкокортикоидов самцам мышей перед спариванием на способность к пространственному обучению у потомков-самок, но не самцов. Такие различия в полученных данных, вероятно, определяются типами стрессорных воздействий на самцов-отцов и их длительностью.

Обращает на себя тот факт, что при наличии ПТСР-подобных симптомов у самцов-отцов (сниженный уровень кортикостерона) у их потомков обоего пола наблюдается снижение активности ГАС как в отношении базальной и стрессорной активности, так и в отношении более быстрого ее выключения после стрессорной активации. В клинических исследованиях было показано, что потомки отцов, болеющих ПТСР вследствие участия в войнах, имеют сниженный базальный уровень кортизола в вечернее время по сравнению с потомками здоровых отцов [21]. Эти данные, а также наши собственные результаты указывают на взаимосвязь заболевания ПТСР у отцов и риском развития у их потомков ПТСР, поскольку было показано, что сниженный базальный уровень активности ГАС и усиление ее чувствительности к сигналам отрицательной обратной связи является фактором риска развития ПТСР [6, 22].

Анализируя данные литературы и наши собственные результаты, мы пришли к заключению, что выраженность и направленность действия стресса отца на потомков, вероятнее всего, определяется не только силой стрессорного воздействия, но и индивидуальной стресс-устойчивостью животных. Действительно, при использовании достаточно мягкого стресса, к которому относится, например, хронический умеренный стресс, изменения поведенческого фенотипа потомков были наименьшими, несмотря на его значительную длительность [17]. В нашей работе сильный травматический стресс использовали однократно, и через 7 сут самцов стрессировали повторно (рестресс) для формирования у них ПТСР-подобного состояния на длительный срок и характерного для клинической картины ПТСР снижения базальной активности ГАС. Тем не менее, только у части самцов базальный уровень кортикостерона был снижен и только у потомков этих самцов изменения в поведении были наиболее значительными. Несмотря на то, что в работе мы использовали инбредных крыс линии Вистар, так же, как и в исследованиях Cohen и Zohar на популяции крыс линии Спрэг–Доули [9], была выявлена различная чувствительность этих животных к сильному стрессорному воздействию. Показано, что у линий крыс, различающихся выраженностью стрессорного ответа ГАС, частота проявлений поведенческих нарушений в модели ПТСР также различна [23]. Возможно, использованные нами в эксперименте животные также имеют отличия в стресс-реактивности ГАС, однако, подобное предположение нуждается в дальнейшей проверке.

Таким образом, в данной работе мы показали, что стрессирование самцов крыс в парадигме "стресс—рестресс", являющейся моделью ПТСР, только часть самцов формируют ПТСР-подобное состояние, характеризующееся сниженным базальным уровнем кортикостерона. Потомки этих самцов имеют низкую массу тела в неонатальный период развития, а во взрослом возрасте проявляют сниженную двигательную активность и повышенную депрессивность поведения, а также пониженную базальную и стрессорную активность ГАС с усилением чувствительности этой гормональной оси к сигналам отрицательной обратной связи. Поведенческие изменения были наиболее выражены у потомков-самцов, тогда как у потомков-самок последствия ПТСР-подобного состояния отцов выявлены только в отношении уровня тревожности и активности ГАС. Потомки самцов, не сформировавших ПТСР-подобное состояние, имели наименьшие изменения в поведении и активности ГАС, причем как потомки-самцы, так и потомки-самки.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследования выполнены при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-015-00186 (руководитель проекта Н.Э. Ордян).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Настоящая статья не содержит результатов исследований с участием людей в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Franklin T.B., Russig H., Weiss I.C., Gräff J., Linder N., Michalon A., Vizi S., Mansui I.M. Epigenetic transmission of the impact of early stress across generations. Biol. Psychiatry. 68: 408– 415. 2010.
- Dietz D.M., LaPlant Q., Watts E.L., Hodes G.E., Russo S.J., Feng J., Oosting R.S., Vialou S., Nestler E.J. Paternal transmission of stress-induced pathologies. Biol. Psychiatry. 70: 408–414. 2011.
- 3. *Hollis F., Kabbai M.* Social defeat as an animal model for depression. ILAR J. 55(2): 221–232. 2014.
- 4. *Czén B., Fuchs E., Wiborg O., Simon M.* Animal models of major depression and their clinical implications. Prog. Neuropsyhopharmacol. Biol. Psychiatry. 64: 293–310. 2016.
- 5. Yehuda R., Blair W., Labinsky E., Bierer L.M. Effects of parental PTSD on the cortisol response to dexamethasone administration in their adult offspring. Am. J. Psychiatry. 164(1): 163–166. 2007.
- Lehrner A., Bierer L.M., Passarelli V., Pratchett L.C., Flory J.D., Bader H.N., Harris I.R., Bedi A., Daskalakis N.P., Makotkine I., Yehuda R. Maternal PTSD associates with greater glucocorticoid sensitivity in offspring of Holocaust survivors. Psychoneuroendocrinology. 40: 213–220. 2014.
- 7. Yehuda R. Status of glucocorticoid alterations in post-traumatic stress disorder. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1179: 56–59. 2009.
- 8. Ordyan N.E., Smolenskiy I.V., Pivina S.G., Akulova V.K., Rakitskaya V.V. Characteristics of the Formation of the Anxious-Depressive State in an Experimental Model of Post-Traumatic Stress Disorder in Prenatally Stressed Male Rats. Neurosci. Behav. Physiol. 44 (6): 657–663. 2014.
- 9. Cohen H., Zohar J. An animal model of posttraumatic stress disorder: the use of cut-off behavioral criteria. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1032: 167–178. 2004.
- 10. Daskalakis N.P., Cohen H., Cai G., Buxbaum J.D., Yehuda R. Expression profiling associates blood and brain glucocorticoid receptor signaling with trauma-related individual differences in both sexes. PNAS. 111(37): 13529–13534. 2014.
- 11. *Gluckman P.D., Hanson M.A.* The developmental origins of the metabolic syndrome. Trends Endocrinol. Metab. 15(4): 183–187. 2004.
- 12. *Alexander B.T., Dasinger J.H., Intapad S.* Fetal programming and cardiovascular pathology. Compar. Physiol. 5(2): 997–1025. 2015.
- 13. Franz A.P., Bolat G.U., Bolat H., Matijasevich A., Santos I.S., Silveira R.C., Procianoy R.S., Rohde L.A., Moreira-Maia C.R. Attention-deficit/hyperactivity disorder and very preterm/very low birth weight: a meta-analysis. Pediatrics. 141(1): e1645. 2018.
- Loret de Mola C., de França G.V., QuevedoLde A., Horta B.L. Low birth weight, preterm birth and small for gestational age association with adult depression: systematic review and metaanalysis. Br. J. Psychiatry. 205(5): 340–347. 2014.
- 15. Green A.S., Rozance P.J., Limesand S.W. Consequences of a compromised intrauterine environment on islet function. Endocrinology. 205(3): 211–224. 2010.
- 16. *Vuguin P.M.* Animal models for small for gestational age and fetal programming of adult disease. Horm. Res. 68(3): 113–123. 2007.
- 17. Rodgers A.B., Morgan C.P., Bronson S.L., Revello S., Bale T.L. Paternal stress exposure alters sperm microRNA content and reprogramming offspring HPA axis stress regulation J. Neurosci. 33(21): 90003–9012. 2013.
- 18. Harker A., Carrol C., Raza S., Kolb B., Gibb R. Preconception paternal stress in rats alters brain and behavior of offspring. Neuroscience. 388: 474–485. 2018.

- 19. Short A.K., Fennell K.A., Perreau V.M., Fox A., O'Bryan M.K., Kim J.H., Bredy T.W., Pang T.Y., Hannan A.J. Elevated paternal glucocorticoid exposure alters the small noncoding RNA profile in sperm and modifies anxiety and depressive phenotypes in the offspring. Transl. Psychiatry. 6: e837. 2016.
- Yeshurun S., Rogers J., Short A.K., Renoir T., Pang T.Y., Hannana A.J. Elevated paternal glucocorticoid exposure modifies memory retention in female offspring. Psychoneuroendocrinology. 83: 9–18. 2017.
- Yahyavi S.T., Zarghami M., Naghshvar F., Danesh A. Relationship of cortisol, norepinephrine, and epinephrine levels with war-induced posttraumatic stress disorder in fathers and their offspring. Rev. Brasil. Psiquiatria. 37: 93–98. 2015.
- 22. *Yehuda R., Bierer L.M.* Transgenerational transmission of cortisol and PNSD risk. Prog. Brain Res. 167: 121–135. 2008.
- Cohen H., Zohar J., Gidron Y., Matar M.A., Belkind D., Loewenthal U., Kozlovsky N., Kaplan Z.Blunted HPA axis response to stress influences susceptibility to posttraumatic stress response in rats. Biol. Psychiatry. 59(12): 1208–1218. 2006.

Changes of the Behavior and the Pituitary-Adrenocortical Axis Activity of the Offspring of Male Rats Exposed to Stress in the "Stress-Restress" Paradigm before Mating

N. E. Ordyan^a, *, S. G. Pivina^a, V. K. Akulova^a, and G. I. Kholova^a

^a Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St.-Petersburg, Russia *e-mail: neo@infran.ru

In this study, we examined the effect of stressing of male rats in the "stress-restress" paradigm, which is a model of post-traumatic stress disorder (PTSD), on the behavioral phenotype and activity of the pituitary-adrenocortical axis of their sexually mature offspring of both sexes. It was shown that only a portion of males form a PTSD-like symptom, characterized by a reduced basal level of corticosterone. The offspring of these males were of low weight in the neonatal period of development, and in adulthood were characterized by the reduced locomotor activity, and increased depressive-like behavior. The basal and stressful activity of the pituitary-adrenocortical axis in these animals was reduced, and the sensitivity of this hormonal axis to negative feedback signals was enhanced. Behavioral changes were most pronounced in the male offspring, while in the female offspring the consequences of a PTSD-like state of the fathers were revealed only in relation to the anxiety level and activity of the pituitary-adrenocortical axis. The offspring of males who did not form a PTSD-like symptom had the least changes of the behavior and the pituitary-adrenocortical axis activity. These results suggest that the individual stress resistance of fathers determines the severity of the action of father's stress on the offspring.

Keywords: paternal stress, posttraumatic stress disorder, offspring, behavior, pituitary-adrenocortical axis, rat

ЦИТИРОВАТЬ:

Ордян Н.Э., Пивина С.Г., Акулова В.К., Холова Г.И. Изменение характера поведения и активности гипофизарно-адренокортикальной системы крыс — потомков отцов, подвергнутых стрессированию в парадигме "стресс-рестресс" перед спариванием. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(9): 1085–1097.

DOI: 10.31857/S0869813920090058

TO CITE THIS ARTICLE:

Ordyan N.E., Pivina S.G., Akulova V.K., Kholova G.I. Changes of the Behavior and the Pituitary-Adrenocortical Axis Activity of the Offspring of Male Rats Exposed to Stress in the "Stress-Stress" Paradigm before Mating. Russian Journal of Physiology. 106(9): 1085–1097.

DOI: 10.31857/S0869813920090058

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 9, с. 1098-1108

= ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ —

EVALUATION OF THE T-SYSTEM OF RAT CARDIOMYOCYTES DURING EARLY STAGES OF STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES

© 2020 I. V. Kubasov¹, D. E. Bobkov², A. V. Stepanov¹, I. B. Sukhov¹, O. V. Chistyakova¹, and M. G. Dobretsov^{1, *}

¹Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

> ²Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia *e-mail: dobretsovmaxim@gmail.com

> > Received April 27, 2019 Revised June 15, 2020 Accepted July 10, 2020

Disorganization of the T-system of cardiomyocytes is considered an early and critical step in the development of Diabetic Cardiomyopathy (DCM). To test this suggestion, male Wistar rats were injected with streptozotocin (STZ, 30 or 45 mg/kg) and studied one month later. STZ-rats that developed and maintained hyperglycemia (random blood glucose >11 mM) were designated as hyperglycemic (STZ-HG) rats, while the remaining STZ-rats – as normoglycemic (STZ-NG) animals. The structural integrity of the T-system was investigated using an analysis of confocal images of the left ventricle (LV) sub-epicardium of isolated hearts, stained with the Di-8-ANEPPS. In control, T-system was organized into regular networks of t-tubules aligned with Z-discs of cardiomyocyte's sarcomeres. Accordingly, the frequency distributions of intervals between neighboring t-tubules (INT, measured along the major cell axis) peaked at a 2 μ m value with not more than 21% of INT (per cell) exceeding the 3 μ m cut-off. Only 4 \pm 3% of the control cardiomyocytes (274 cells, 4 rats) could be considered as deficient, according to this parameter (>21% occurrence of long INT). Compared to control, in the hearts of STZ-NG and STZ-HG rats, the fractions of such deficient cardiomyocytes were statistically significantly higher: $48 \pm 13\%$ (STZ-NG, 8 rats, 573 cells) and $76 \pm 8\%$ (STZ-HG, 4 rats, 247 cells). Thus, structural changes in the T-system of the rat heart LV cardiomyocytes develop early during chronic hyperglycemia (overt diabetes) as well as during near-normoglycemic stages of diabetes (prediabetes). The relevance of these changes to the development of DCM in subjects with prediabetes remains to be studied.

Keywords: cardiomyocyte, cardiomyopathy, confocal microscopy, Diabetes Mellitus, hyperglycemia, T-system, rat

DOI: 10.31857/S0869813920090046

Diabetic cardiomyopathy (DCM) is one of the most common complications of Diabetes Mellitus (DM). DCM equally affects patients with Type I and Type II DM (T1DM, insulin-dependent and T2DM, insulin-independent DM, respectively) leading on its terminal stages to cardiac failure (CF) and thus constituting the major reason of mortality in this patient population. Despite the gravity of this disease, the etiology of DCM remains poorly

Abbreviations: DCM – diabetic cardiomyopathy; INT – intervals between neighboring t-tubules; LV – left ventricle; ROI – region of interest, STZ – streptozotocin; STZ-HG – hyperglycemic STZ-injected rats; STZ-NG – normoglycemic STZ-injected rats; T1DM / T2DM – type I / type II Diabetes Mellitus.

understood [1]. In particular, DCM is diagnosed when symptoms and clinical signs of the left ventricle hypertrophy and dysfunction are present on a background of DM (chronic hyperglycemia, fasting blood glucose >7 mM or random glucose >11 mM) and in the absence of hypertonia or signs of macrovascular disease [2, 3]. An almost inevitable byproduct of this definition of DCM is the view of chronic hyperglycemia as the major, if not the only, trigger of the pathogenesis of DCM [1, 3]. The hyperglycemic hypothesis of DCM, however, clearly conflicts with accumulating evidence of the abnormally high risk of development of left ventricle hypotrophy and dysfunction observed in populations of human and animal subjects with border side hyperglycemia characterizing states of prediabetes or well-controlled DM [4-10]. These latter observations raise the question about the need for more detailed structure-functional cardiac studies conducted on early stages of DM when insulin deficiency (T1DM) or insulin resistance (T2DM) have not yet translated into substantiating changes in glucose and fat metabolism (early prediabetes). The inquiry into the time of onset of deterioration/remodeling of the T-system of cardiomyocytes appears to be particularly significant. The T-system or the highly structured network of transverse invaginations (t-tubules) of ventricular cardiomyocyte plasma membrane inside the cell plays a critical role in the control of electromechanical coupling and cardiomyocyte contractility [11]. In various animal models of CF structural reorganization of T-system consisting of a decrease in t-tubular density, their dilatation and impairment in their alignment with Z-discs of myocyte sarcomeres are observed long before signs of CF become apparent [12, 13]. Similar changes in the structural integrity of T-system develop and closely coincide with myocardial functional impairment in the hearts of rodents on advanced stages (8 or more weeks) of experimental T1DM and T2DM [14–18]. However, we found no references to the work evaluating the T-system of cardiomyocytes at early terms of acute DM or on prediabetic stages of the disease. As a first step to address this issue, in the current work, the integrity of T-system of left ventricle cardiomyocytes was studied in rats with short-term (4 weeks) streptozotocin (STZ)-induced chronic hyperglycemia and in rats that after injection of pancreatic toxin STZ remained normoglycemic or developed moderate and transient hyperglycemia only. The first group of rats constitutes a well-established model of acute T1DM in which early (1-4 weeks) deterioration in ventricular cardiomyocyte electrogenesis and contractility was universally documented [19–23]. The second group of animals, when studied at 2 weeks, was shown mimicking the early prediabetic state of the disease [24].

RESEARCH METHODS

A total of 16 male Wistar rats (age 3 months, weight 250-350 g) were used in experiments. Animals were kept in standard vivarium conditions (6 rats per cage) at 22° C and relative air humidity of 50-65%. During experiments, rats had free access to water and food. All applicable international, national, and institutional principles of handling and using experimental animals for scientific purposes were observed.

At the beginning of the experiment, 12 rats randomly selected from a total pool were injected intraperitoneally with pancreatic toxin streptozotocin (STZ, Sigma-Aldrich, USA) at a dose of 30 and 45 mg/kg (8 and 4 rats, respectively). The remaining 4 rats were injected with an equivalent volume of the vehicle solution (control, 0.1 M Na-citrate buffer, pH 4.5; 0.1 mL/100 g body weight). The random blood glucose (RG) levels of experimental animals were measured on days 3, 14, and 28 of the experiment using tail capillary blood samples, One Touch Ultra test strips (USA), and Life Scan Johnson & Johnson glucometer.

On the last day of the experiment, the animals were deeply anesthetized with chloralhydrate (400 mg/kg, intraperitoneally; Merck, Germany), their hearts were removed and mounted on a Langendorff apparatus for retrograde perfusion with aerated Tyrode solution containing (mM): NaCl 140, KCl 4.5, CaCl₂ 1, MgCl₂ 1, HEPES 10, glucose 10, pH 7.2–7.4. 2,3-Butanedione monoxime (20 mM, Sigma-Aldrich, USA) and fluorescent dye Di-8-ANEPPS (20 μ M; Thermo Fisher Scientific, USA) were added to the perfusing solution to, respectively, block myosin ATPase, suppress heart contractility, and to stain the plasma membrane of the cells of the myocardium [25, 26].

Cardiomyocytes of the left ventricle heart sub-epicardium were studied using the TCS SP5 MP confocal microscope, equipped with an 8000 Hz resonance scanner and $20 \times -60 \times$ objectives (NA = 1.3; Leica, Wetzlar, Germany). The isolated heart was placed left ventricle down (toward the objective) into the 180 µm-thick glass bottom µ-dish (IBIDI GmbH, Planegg, Germany). The sample was illuminated using an argon laser (488 nm wavelength; 80% power), which emitted a fluorescent signal that was recorded within 600–690 nm spectral range at the pinhole setting of 100 µm. For each heart, 7 to 15 images (205 × 205 µm, 5 pixels/µm) were captured within randomly selected fields of the first epicardial layer fields at the confocal depth of about 10–15 µm from the surface of the myocardium.

Image analysis was conducted using Fiji – ImageJ freeware (NIH, USA). To determine the cardiomyocyte physical dimensions, each cardiomyocyte within the borders of the image was outlined with a Polygon Selection tool. The area of this polygon ROI and lengths of minor and major axes of the ellipse's best fit to the ROI were measured as, respectively, area, width, and length of the myocyte. To estimate the structural integrity of T-system of cardiomyocytes, each of captured images was sharpened (Fig. 1A, a) and processed with the Find Maxima algorithm to generate a black and white mask of the original image, in which each confocal cross-section of each t-tubule was reduced to a corresponding by location dark pixel (Fig. 1A, b). These mask images were then used to determine frequency distributions of intervals between neighboring t-tubules (INT, measured along the major cell axis). For each myocyte, a linear region of interest (ROI, line thickness = 5 pixels or 1 μ m) was selected running along the major cell axis at about mid-width of the myocyte, but avoiding t-tubule free cell nuclei locations (Fig. 1A, a, b). Then the plot profile of this linear ROI was built, in which each intensity peak X-coordinate represents the X position of its corresponding t-tubule within given linear ROI (compare Fig. 1A, b and Fig. 1B, numbered arrows). Based on numerical data for such ROI plot profiles, INT were measured (custom Excel Visual Basic macro) and frequency distributions of INT were built for each studied cell (Fig. 1*C*, a), with subsequent averaging to obtain integral INT frequency distri-

Fig. 1. Analysis of structural integrity of T-system of left ventricle cardiomyocytes in confocal sections of Di-8-ANEPPS-stained rat heart.

A. Representative image of a control rat heart cardiomyocyte before (A, a) and after (A, b – binary mask) application of Find Maxima ImageJ algorithm. Dark pixels in A, b represent detected t-tubular profiles. Line (semitransparent in A, b) shows 5-pixels-thick longitudinal ROI selected at the cell mid-width, but to avoid t-tubule-free cell nuclei regions (text labels "n").

B. The plot profile obtained for the ROI shown in A. Profile Y value corresponds to the average intensity of all pixels across the ROI at given X value of the ROI.

C. Subpanel "a" – Frequency distribution of INT calculated for the cell and ROI shown in panels A and B. In correspondence with the sarcomeric arrangement of the T-system, most of INT measured are distributed around 2 μ m value (main peak). However, there is also substantial for a given cell and ROI fraction of short intervals (asterisk), representative of profile regions containing misaligned t-tubules. Two of such regions are outlined by ovals and marked by asterisks in A and B panels. There are also profile regions with INT exceeding 3 μ m (vertical dashed line) in length. Comparison of the figure panels A–C shows that appearance of such long INT is associated with the appearance of gaps in the regular sarcomeric organization of t-tubules (see arrows "1a-c" and "3" marking segments of ROI and its plot profile, where, respectively, one or three in row t-tubules are missed at their expected location). Subpanel "b" – Average INT distribution (same control rat as above, 8 fields, 48 cardiomyocytes). The smooth solid line represents the result of the best fit to the distribution of two Gaussian curves. Some of the fit or derived from the fit parameters are shown next to the marking of the respective peak arrows.



butions characterizing all cells studied within the given image (Fig. 1*C*, b) or given rat heart. Individual cardiomyocyte INT distributions were used to determine the fraction of long, exceeding an arbitrary value of 3 μ m INT (Fig. 1*C*, a, vertical dashed line), and averaged INT distributions were used to determine the parameters of their primary and secondary peaks. For the latter, the best fit procedure of INT distributions with two or three (as appropriate) independent Gaussian curves were employed (Fig. 1*C*, b; Origin 6.0, OriginLab, Northampton, Massachusetts, USA).

Prizm 4.5 (Graphpad Software Inc., San Diego, California, USA) software was used for statistical data analysis. Sample means were compared assuming normal data distri-



Fig. 2. Random blood glucose (A) and weight (B) of experimental animals on different days of the experiment before (day 0) and after STZ injection (Mean \pm SEM). Asterisks indicate a statistically significant difference between the given group and other groups' mean values (p < 0.05; comparisons for the selected day of the experiment).

bution using one- and two-way ANOVA followed by, respectively, Tukey and Bonferroni tests for multiple comparisons. Mean values were considered to be significantly different at p-value < 0.05.

RESEARH RESULTS

At the beginning of the experiment, the RG of animals was in the range of 5 to 6 mM (mean RG0 = 5.4 ± 0.1 mM; n = 16). Control group rats maintained this level of RG throughout the entire experiment. All 4 rats injected with 45 mg/kg STZ developed chronic diabetes. Their RG level exceeded the accepted in this work 11.1 mM diabetes definition threshold during all three tests (days 3, 14, and 28). These rats were designated as STZ-HG group rats. Of 8 animals that received 30 mg/kg STZ, one rat remained normoglycemic throughout the rest of the experiment, one developed acute, but transient diabetes (RG3 = 17.6), and the remaining 6 rats developed transient intermediate hyperglycemia (RG3 = 7-10 mM). Since on the last day of the experiment all of these animals maintained normoglycemia, they were assigned to the STZ-NG group. Mean RG levels of STZ-HG rats were significantly higher, compared to those measured for the same time points in control. However, by this parameter, the STZ-NG rats demonstrated no statistically significant difference from the control at any of the three studied time points (Fig. 2A). Weights of the control, STZ-NG, and STZ-HG rats did not differ at the beginning of the experiment. By the end of the experiment, the weight of STZ-HG, but not of STZ-NG rats, was significantly lower than that of the control animals (Fig. 2B).

Such indexes of cardiac/ventricular hypertrophy/atrophy as relative heart weight or measurements of cardiac myocyte area, length of width had not revealed any significant differences between studied groups of rats (Table 1).

In sharp contrast with the stability of the indexes above, compared to control (Figs. 1*B*, b and 3*B*, a), confocal sections of a subepicardial myocardium of LV of STZ-NG rats and even more frequently of STZ-HG (Figs. 3*A*, b and 3*A*, c) contained cardiomyocytes demonstrating signs of impairment of normally regular sarcomeric organization of T-sys-

Index	Control $(n = 4)$	STZ-NG (n=8)	STZ-HG (<i>n</i> = 4)						
	(n - 4)	(n - 8)							
	Heart								
Weight, g/100g body weight	0.45 ± 0.03	0.47 ± 0.03	0.51 ± 0.06						
Cardiomyocyte									
Length, µm	114 ± 5	114 ± 4	116 ± 7						
Width, µm	21 ± 1	22.1 ± 0.7	21.5 ± 0.9						
Area, μm^2	1864 ± 152	1979 ± 61	1975 ± 82						

Table 1. Indexes of cardiac/ventricular hypertrophy/atrophy (Mean \pm SEM)

tem. This impairment manifested itself in a decreased density of detectable t-tubular profiles, which, in some of the myocytes of STZ-HG rats, produced a picture of "moth-eaten" damage to a normally regular network of t-tubular profiles (Fig. 3A, c). Analysis of longitudinal INT frequency distributions has confirmed these differences by demonstrating an increased, compared to control, number and height of secondary peaks in INT distributions of STZ-NG and STZ-HG rats (Figs. 3B, a-c and 3C, a). The total fraction of cardiac myocytes with abnormally long INT was also increased above that in control in the hearts of STZ-NG and STZ-HG rats (Fig. 3C, b, c). Abnormally long INT was defined in this study as INT exceeding 3 μ m – valley separating primary and secondary peaks in INT distributions. In control hearts, an average myocyte had 9% of its INTs abnormal, according to this criterion. Respectively, cells with a deficient T-system were defined as cells in which the fraction of abnormal INT is higher than 21% (mean + 2SD; Fig. 3C, b). Only $4 \pm 3\%$ of the control heart cardiomyocytes (274 cells, 4 rats) could be considered as deficient, according to this definition. However, in the hearts of STZ-NG and STZ-HG rats, the fractions of such cardiomyocytes were statistically significantly higher than those in control (Fig. 3C, c): $48 \pm 13\%$ (STZ-NG, 8 rats, 573 cells) and 76 $\pm 8\%$ (STZ-HG, 4 rats, 247 cells).

DISCUSSION

In various animal models of cardiac failure structural reorganization of T-system consisting of a decrease in t-tubular density, their dilatation and misalignment with sarcomeric Z-discs start before signs of CF become apparent [12, 13]. Changes in the structural integrity of the T-system also develop in the hearts of rodents on advanced stages (8 or more weeks) of experimental DM [14–17]. The major finding of our study consists of providing evidence of the early beginning of the reorganization of T-system in rats with STZ-induced T1DM – 4 weeks of chronic hyperglycemia. Furthermore, first-time evidence was provided that t-tubular remodeling may be detected in the left ventricle myocytes of hearts of rats that, after injection with STZ, developed transient or no hyperglycemia at all. This latter finding suggests the possibility of hyperglycemia-independent structural changes in the myocardium, which may change our understanding of the pathogenesis of DCM in subjects with prediabetes.

STZ-HG rats

These rats represent the classical model of acute insulin-dependent DM [24]. As expected for such animals, they developed and maintained severe hyperglycemia and displayed a net weight loss (Fig. 2). We found no signs of gross morphological heart abnormalities, such as changes in heart/body weight index or myocyte width or length (Table 1), which might be because of the short-term (4 weeks) the disease state was studied in our work [17, 19, 23]. Even at this early term, confocal image analysis demonstrated clear signs



of disorganization of the LV cardiomyocyte T-system. Thus, in control (Figs. 1 and 3), the major peak in INT distributions was found at 2 μ m, which is well within the range of 1.7–2.2 μ m reported for rat cardiomyocyte sarcomere length and consistent with the fact that normally t-tubules are arranged in the regular networks aligned with Z-discs of mammalian myocyte sarcomeres [17, 27]. There was also a secondary peak at about 4 μ m (~8% of INT), suggesting the existence of a small fraction of sarcomeres missing any t-tubule over 1 μ m (selected ROI width) cross-sectional profile. On average, no more than 21% (mean + 2 SD) of control myocytes were deficient in this regard. Compared to control, INT distributions of

Fig. 3. The regularity of the T-system of left ventricle cardiomyocytes of control, STZ-NG, and STZ-HG rats.

A. – Representative examples confocal sections of control, STZ-NG, and STZ-HG rat myocytes (sub-panels a, b, and c, respectively) overplayed with black and white masks of the same images processed to detect cross-sectional t-tubular profile (black dots). Yellow, 5-pixel in width lines are ROI selection lines used to determine the regularity of sarcomeric alignment of the t-tubular network. Arrows point to the ROI segments with one or more (number of arrows) sequential sarcomeres lacking expected t-tubule profile.

B. – Average INT distributions of control, STZ-NG, and STZ-HG rat myocytes (sub-panels a, b, and c, respectively). Shown in plots, solid smooth lines are a result of the best fit to the distribution of two or three Gaussian curves. Number next to the peak indicates the percentage of INT belonging to the respective peak in the distribution calculated from the best fit procedure parameter results.

C. – Analysis of a degree of irregularity in longitudinal T-system organization. Sub-panel "a" shows the first secondary peak areas (group mean \pm SEM; based on results of the multi-Gaussian best-fit procedure, see panel B). This parameter describes the occurrence of stand-along sarcomeres missing corresponding t-tubule profile (panel A, single arrow). Sub-panel "b" shows the frequency distribution of the control hearts LV myocytes according to their INT right-hand tail area. This graph shows that most of the cells in control (96%, mean + 2SD, vertical dashed line) have >21% occurrence of long INT according to this parameter. Sub-panel "c" shows the group means (\pm SEM) of frequencies of cells deficient in this parameter in the hearts of control, STZ-NG, and STZ-HG rats. Asterisks indicate a statistically significant difference (p < 0.05) between the given group and control group mean values.

cardiomyocytes of STZ-HG rats were different, demonstrating a prominent right-hand tail composed of two or more secondary peaks. X values of these secondary peaks appeared as multiples of X value of the major peak of respective INT distribution (see, for example, Fig. 3B, c: 2.0, 3.9 and 6.3 μ m – X values for the main and first and second secondary peaks, respectively), which may be interpreted as an increase in the occurrence of situations when 1, 2, 3, etc. consecutive sarcomeres have corresponding t-tubule missing. This phenomenon may be attributed to the sealing-off and vesiculation of some segments of t-tubules, leading to an inability of membrane-impermeable dyes to reach and stain the membrane of these t-tubular vesicles, which is observed during osmotic detubulation of cardiac myocytes [28, 29]. Alternatively or in addition to the mechanism above, structural disorganization, consisting in a loss of the uniform, transverse T-tubule pattern, with a higher proportion of tubules present in the longitudinal direction may also explain the observed increase in the fraction of "t-tubule-depleted" sarcomeres in myocytes of diabetic rats [12]. Integrity and regularity of T-system is a critical condition ensuring depolarization of myocyte by an action potential, the synchronicity of calcium-induced calcium release and the cell contractility [11]. Therefore, regardless of the exact mechanisms of early disorganization of the T-system of STZ-HG rat cardiomyocytes observed in our work, this disorganization undoubtedly contributes to the pathogenesis of impaired contractility of cardiomyocytes isolated from hearts of STZ-diabetic rats [11, 17].

STZ-NG rats

Rats classified in this work as STZ-NG rats developed no chronic, but transient hyperglycemia or remained normoglycemic after STZ injection. Previously, it was shown that in the second week of the experiment, STZ-NG rats are moderately insulinopenic and thus mimic the state of early insulin-dependent prediabetes. However, during the subsequent two weeks (by a total 4-week term), putatively due to the regeneration of insulin-producing β -cells, these animals recover to the normal insulin level [30]. A similar dynamic in pancreatic injury and insulin production might well explain transient RG changes observed for STZ-NG rats in our study (Fig. 2). If this suggestion were confirmed, we would need to conclude that even a short-lived prediabetic state may leave a lasting imprint on the structural organization of rat heart LV myocyte T-system. Indeed, deficiency of the T-system of cardiomyocytes of 4-week STZ-NG rats was revealed in this study by both measured parameters: area of the first secondary peak in INT distribution and % of cells with the above-threshold occurrence of abnormally long INT (Fig. 3).

Possible mechanisms of T-system injury

Chronic hyperglycemia is considered as a trigger for all major, including DCM, complications of DM [18]. Our finding of a decrease in t-tubular density in rats from the STZ-NG group is, however, challenging this view, suggesting instead that factors other than overt chronic hyperglycemia are likely to be responsible for the observed phenomena.

The direct toxic effect of STZ on rodent heart cardiomyocytes cannot be ruled out but seems to be very unlikely for at least two reasons. First, selective toxicity of STZ toward pancreatic beta cells is explained by intracellular uptake STZ via GLUT2 isoform of the glucose transporter [31]. Rat cardiomyocytes, however, do not express this isoform of glucose transporter [32]. Second, functional as well as structural cardiac consequences of STZ-injection can be prevented or corrected by insulin therapy [2, 18].

Previously, two weeks-STZ-NG rats were introduced as a model of early prediabetes, in which the progression of selected signs of diabetic neuropathy (deep muscle and visceral evoked pains) was directly attributed to moderate insulinopenia. In particular, it was suggested that regulation of systemic blood glucose and fat metabolism and regulation of pain control pathways might have different requirements in the maintained activity of insulin-controlled cellular pathways [24, 30, 33]. A tentatively similar explanation may be applied to the case of the integrity of the T-tubular system in the hearts of prediabetic and overtly diabetic subjects. However, to accept this explanation, we need to suggest that transient hyperglycemia and/or insulinopenia may have a relatively long-term effect on the structural integrity of the T-system of LV cardiomyocytes.

Therefore, further studies in animal models of diabetes and prediabetes, employing both the battery of glucose metabolism tests (random and fasting glucose measurements and glucose tolerance test) and plasma insulin measurements are needed.

FUNDING

This work was supported by Russian Foundation for Basic Research, award N_{2} 19-015-00139, and by Institute of Evolutionary Biochemistry and Physiology, Russian Academy of Sciences Government basic research program N_{2} 075-00776-19-02. The confocal microscope Leica TCS SP5 MP was provided by the Research Resource Center (Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, RAS).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ms. Tatiana Dobretsova for her help with editing this manuscript.

AUTOR CONTRIBUTIONS

I.V. Kubasov – this author contributed to the study design and participated in confocal microscopy experiments and the manuscript editing. D.E. Bobkov – this author conducted confocal imaging experiments and participated in the data analysis and manuscript editing. A.V. Stepanov – this author helped conducting experiments, data analysis and manuscript writing. I.B. Sukhov and O.V. Chistyakova – these authors contributed equally to the rat model development and monitoring, data discussion and manuscript editing and preparation for submission. M.G. Dobretsov is the principle investigator in this study who contributed to the study design, the data analysis, discussion and interpretation, and the drafting and preparation of the final version of the manuscript.

REFERENCES

- 1. *Riehle C., Bauersachs J.* Of mice and men: models and mechanisms of diabetic cardiomyopathy. Basic Res. Cardiol. 114(2): 2. 2019.
- Dubo S., Gallegos D., Cabrera L., Sobrevia L., Zuniga L., González M. Cardiovascular Action of Insulin in Health and Disease: Endothelial L-arginine transport and cardiac voltage-dependent potassium channels. Front. Physiol. 7: 74. 2016.
- 3. *Singh R. M., Waqar T., Howarth F. C., Adeghate E., Bidasee K., Singh J.* Hyperglycemia-induced cardiac contractile dysfunction in the diabetic heart. Heart Fail. Rev. 23: 37–54. 2018.
- Celentano A., Vaccaro O., Tammaro P., Galderisi M., Crivaro M., Oliviero M., Imperatore G., Palmieri V., Iovino V., Riccardi G., de Divitiis O. Early abnormalities of cardiac function in noninsulin-dependent diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. Am. J. Cardiol. 76: 1173– 1176. 1995.
- Ren J., Sowers J.R., Walsh M.F., Brown R.A. Reduced contractile response to insulin and IGF-I in ventricular myocytes from genetically obese Zucker rats. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 279: H1708–H1714. 2000.
- 6. Castagno D., Baird-Gunning J., Jhund P.S., Biondi-Zoccai G., MacDonald M.R., Petrie M.C., Gaita F., McMurray J.J. Intensive glycemic control has no impact on the risk of heart failure in type 2 diabetic patients: evidence from a 37,229 patient meta-analysis. Am. Heart J. 162: 938–948. 2011.
- 7. *Grundy S.M.* Pre-diabetes, metabolic syndrome, and cardiovascular risk. J. Am. Coll. Cardiol. 59: 635–643. 2012.
- 8. Nunes S., Soares E., Fernandes J., Viana S., Carvalho E., Pereira F.C., Reis F. Early cardiac changes in a rat model of prediabetes: Brain natriuretic peptide overexpression seems to be the best marker. Cardiovasc. Diabetol. 12: 1–11. 2013.
- Tadic M., Celic V., Cuspidi C., Ilic S., Pencic B., Radojkovic J., Ivanovic B., Stanisavljevic D., Kocabay G., Marjanovic T. Right heart mechanics in untreated normotensive patients with prediabetes and type 2 diabetes mellitus: A two- and three-dimensional echocardiographic study. J. Am. Soc. Echocardiogr. 28(3): 317–327. 2015.
- 10. *Huang Y., Cai X., Mai W., Li M., Hu Y.* Association between prediabetes and risk of cardiovascular disease and all-cause mortality: systematic review and meta-analysis. Br. Med. J. 355: i5953. 2016.
- 11. *Ibrahim M., Gorelik J., Yacoub M.H. Terracciano C.M.* The structure and function of cardiac t-tubules in health and disease. Proc. Biol. Sci. 278: 2714–2723. 2011.
- 12. Louch W.E., Sejersted O.M., Swift F. There goes the neighborhood: pathological alterations in t-tubule morphology and consequences for cardiomyocyte Ca²⁺ handling. J. Biomed. Biotechnol. 2010: 503906. 2010.
- 13. Crossman D.J., Jayasinghe I.D., Soeller C. Transverse tubule remodelling: a cellular pathology driven by both sides of the plasmalemma? Biophys. Rev. 9: 919–929. 2017.
- McGrath K.F., Yuki A., Manaka Y., Tamaki H., Saito K., Takekura H. Morphological characteristics of cardiac calcium release units in animals with metabolic and circulatory disorders. J. Muscle Res. Cell Motil. 30: 225–331. 2009.
- Stølen T.O., Høydal M.A., Kemi O.J., Catalucci D., Ceci M., Aasum E., Larsen T., Rolim N., Condorelli G., Smith G.L., Wisløff U. Interval training normalizes cardiomyocyte function, diastolic Ca²⁺ control, and SR Ca²⁺ release synchronicity in a mouse model of diabetic cardiomyopathy. Circ. Res. 105: 527–536. 2009.
- Cagalinec M., Waczulíková I., Uličná O., Chorvat D. Morphology and contractility of cardiac myocytes in early stages of streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. Physiol. Res. 62: 489–501. 2013.
- Ward M.L., Crossman D.J. Mechanisms underlying the impaired contractility of diabetic cardiomyopathy. World J. Cardiol. 6: 577–584. 2014.
- Dallak M., Al-Ani B., Kader D.H.A., Eid R.A., Haidara M.A. Insulin suppresses type 1 Diabetes Mellitus—induced ventricular cardiomyocyte damage associated with the inhibition of biomarkers of inflammation and oxidative stress in rats. Pharmacology. 104: 157–165. 2019.
- 19. Jourdon P., Feuvray D. Calcium and potassium currents in ventricular myocytes isolated from diabetic rats. J. Physiol. (Lond). 470: 411–429. 1993.
- Shimoni Y., Ewart H.S., Severson D. Type I and II models of diabetes produce different modifications of K currents in rat heart: role of insulin. J. Physiol. 507: 485–496. 1998.
- Shimoni Y., Ewart H.S., Severson D. Insulin stimulation of rat ventricular K⁺ currents depends on the integrity of the cytoskeleton. J. Physiol. 514: 735–745. 1999.
- 22. Casis O., Gallego M., Iriarte M., Sunchez-Chapula J.A. Effects of diabetic cardiomyopathy on regional electrophysiologic characteristics of rat ventricle. Diabetologia. 43: 101–109. 2000.
- 23. Nygren A., Olson M.L., Chen K.Y., Emmett T., Kargacin G., Shimoni Y. Propagation of the cardiac impulse in the diabetic rat heart: reduced conduction reserve. J. Physiol. 580: 543–560. 2007.

- Dobretsov M., Backonja M.M., Romanovsky D., Stimers J.R. Animal models of diabetic neuropathic pain. In: Ma C., Zhang J. M. (eds) Animal models of pain. Neuromethods. V. 49. Humana Press. Totowa. NJ. 147–169. 2011.
- 25. Kubasov I.V., Stepanov A., Bobkov D., Radwanski P.B., Terpilowski T.A., Dobretsov M., Gyorke S. Sub-cellular electrical heterogeneity revealed by loose patch recording reflects differential localization of sarcolemmal ion channels in intact rat hearts. Front. Physiol. 9: 61. 2018.
- Кубасов И.В., Бобков Д.Е. Оптические и электрические ответы кардиомиоцитов в изолированном сердце крысы при развитии гипоксии. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 104(6): 670–675. 2018. [Kubasov I.V., Bobkov D.E. Optical and electrical responses of cardiomyocytes in isolated rat heart during development of hypoxia. Russ. J. Physiol. 104(6): 670– 675. 2018. (In Russ)].
- Bub G., Camelliti P., Bollensdorff C., Stuckey D.J., Picton G., Burton R.A., Clarke K., Kohl P. Measurement and analysis of sarcomere length in rat cardiomyocytes in situ and in vitro. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 298: H1616–H1625. 2010.
- Moench I., Meekhof K.E., Cheng L.F., Lopatin A.N. Resolution of hypo-osmotic stress in isolated mouse ventricular myocytes causes sealing of t-tubules. Exp. Physiol. 98: 1164–1177. 2013.
- Ferrantini C., Coppini R., Sacconi L., Tosi B., Zhang M. L., Wang G. L., de Vries E., Hoppenbrouwers E., Pavone F, Cerbai E., Tesi C., Poggesi C., Henk E.D.J.ter Keurs. Impact of detubulation on force and kinetics of cardiac muscle contraction. J. Gen. Physiol. 143: 783–797. 2014.
- 30. *Romanovsky D., Wang J., Al-Chaer E.D., Stimers J.R., Dobretsov M.* Comparison of metabolic and neuropathy profiles of rats with streptozotocin-induced overt and moderate insulinopenia. Neuroscience. 170: 337–347. 2010.
- 31. *Hosokawa M., Dolci W., Thorens B.* Differential sensitivity of GLUT1- and GLUT2-expressing β cells to streptozotocin. Biochem. Biophys. Res. Com. 289: 1114–1117. 2001.
- Szablewski L. Glucose transporters in healthy heart and in cardiac disease Int. J. Cardiol. 230: 70–75. 2017.
- Dobretsov M., Romanovsky D., Stimers J.R. Early diabetic neuropathy: Triggers and mechanisms. World J. Gastroenterol. 13(2): 175–191. 2007.

TO CITE THIS ARTICLE:

Kubasov I.V., Bobkov D.E., Stepanov A.V., Sukhov I.B., Chistyakova O.V., Dobretsov M.G. Evaluation of the T-System of Rat Cardiomyocytes during Early Stages of Streptozotocin-Induced Diabetes. Russian Journal of Physiology. 106(9): 1098–1108.

DOI: 10.31857/S0869813920090046

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 9, с. 1109-1121

= ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ —

ВЛИЯНИЕ ROUX-EN-Y ГАСТРОШУНТИРОВАНИЯ И ПРОДОЛЬНОЙ РЕЗЕКЦИИ ЖЕЛУДКА НА МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ И ГОРМОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ И ГИПОТАЛАМИЧЕСКИЙ СИГНАЛИНГ У КРЫС С ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

© 2020 г. О. В. Корнюшин¹, К. В. Деркач², И. Б. Сухов^{1, 2}, А. С. Полозов^{1, 3}, Е. В. Савочкина^{1, 3}, В. В. Маслей¹, А. Э. Егорова⁴, А. А. Бахтюков², А. О. Шпаков^{2, *}

¹НМИЦ им. В.А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

²Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

³Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

⁴Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: alex_shpakov@list.ru

Поступила в редакцию 06.03.2020 г. После доработки 16.04.2020 г. Принята к публикации 05.05.2020 г.

Бариатрические операции широко используются для коррекции метаболических нарушений при сахарном диабете 2 типа (СД2), но механизмы их действия до конца не выяснены. Целью работы было изучить влияние Roux-en-Y гастрошунтирования (ГШ) и продольной резекции желудка (ПРЖ) на метаболические и гормональные показатели, а также на экспрессию гипоталамических генов, кодирующих факторы, регулирующие аппетит, и компоненты сигнальных систем, контролирующих энергетический обмен, у самцов крыс с СД2 без явного ожирения. СД2 вызывали 20-недельной высокожировой диетой и обработкой крыс 20 мг/кг стрептозотоцина (СТЗ) на 12-й неделе эксперимента. Операции проводили через 3 нед. после обработки СТЗ, на 19-й нед. оценивали чувствительность к глюкозе и гормональные показатели, на 20-й нед. забирали ткани гипоталамуса для оценки экспрессии генов. У крыс с СД2 обе операции уменьшали потребление пищи, снижали постпрандиальный уровень глюкозы, нормализовали уровень лептина, снижали значительно повышенный при СД2 уровень грелина в крови. Операция ПРЖ, которая в сравнении с ГШ в меньшей степени влияла на глюкозный гомеостаз и уровень грелина, более эффективно снижала потребление пищи и, в отличие от ГШ, восстанавливала сниженный при СД2 уровень глюкагоноподобного пептила-1 (ГПП-1). ГШ снижала повышенную при СД2 экспрессию орексигенных генов, кодирующих агути-подобный пептид и рецептор грелина, повышала экспрессию анорексигенных генов, кодирующих МС3- и МС4-меланокортиновые, 5-HT_{2C}-серотониновый и лептиновый рецепторы и про-опиомеланокортин. Наибольший вклад в эффекты ПРЖ вносит значительное повышение экспрессии гена рецептора ГПП-1 в гипоталамусе, ассоциированное с повышением уровня ГПП-1 в крови. Таким образом, ГШ и ПРЖ могут быть эффективны для коррекции метаболических и функциональных нарушений при СД2 без ожирения, причем значительный вклад в эти эффекты вносит восстановление баланса между орексигенными и анорексигенными путями в гипоталамусе.

Ключевые слова: бариатрическая хирургия, продольная резекция желудка, Roux-en-Y гастрошунтирование, гипоталамическая система, грелин, глюкагоноподобный пептид-1, агути-подобный пептид

DOI: 10.31857/S0869813920070031

Бариатрические операции (БО) в настоящее время широко применяются для нормализации пишевого поведения и коррекции метаболических и гормональных нарушений у пациентов с сахарным диабетом 2 типа (СД2), метаболическим синдромом и тяжелыми формами ожирения [1, 2]. Среди БО наиболее часто используют продольную резекцию желудка (ПРЖ) и Roux-en-Y гастрошунтирование (ГШ). Операция ПРЖ обеспечивает сохранение общей протяженности желудочно-кишечного тракта и предотвращает развитие осложнений, обусловленных снижением всасывания питательных веществ. Операция ГШ, сочетающая рестриктивный и шунтирующий компоненты, обеспечивает выключение большей части желудка и начальных отделов тонкой кишки, результатом чего является снижение времени и площади соприкосновения содержимого желудочно-кишечного тракта со слизистой тонкой кишки. Обе БО показаны для пациентов с СД2, имеющих отчетливо выраженное ожирение и нарушенный липидный и углеводный обмен [1, 3, 4], в то время как их терапевтический эффект при лечении пациентов с СД2 без явного ожирения и дислипидемии остается мало изученным [5, 6]. Еще в 2010-2012 годы появилась серия клинических работ, авторы которых использовали ГШ по Roux-en-Y и лапароскопическую операцию мини-гастрошунтирования для лечения пациентов с СД2 без явного ожирения (индекс массы тела ниже 35 кг/м²) и добивались стабильного и устойчивого во времени улучшения чувствительности к инсулину и восстановления ряда метаболических и гормональных показателей [7–10]. Так, проведение ГШ по Roux-en-Y пациентам с СД2 и массой тела близкой к норме нормализовало у них уровни глюкозы и гликированного гемоглобина, восстанавливало липидный обмен, уменьшало до контрольных значений показатели артериального давления, снижало риски развития сердечно-сосудистых заболеваний, и все эти эффекты сохранялись на протяжении многих лет после оперативного вмешательства [7]. Китайские медики в 2017 г. сообщили, что эффективность ГШ по Roux-en-Y в группах пациентов с СД2 с ожирением и без такового является сходной как в отношении восстановления глюкозного и липидного обмена, так и в отношении предотвращения артериальной гипертензии [11]. Все это указывает на определяющую роль в терапевтическом эффекте БО не вызываемого этими операциями снижения массы тела, а изменения баланса секретируемых желудочно-кишечным трактом инкретинов и их регуляторного влияния на функции поджелудочной железы и гипоталамическую регуляцию пищевого поведения [6, 7, 9, 11].

Имеются убедительные свидетельства того, что БО подавляют аппетит и тем самым уменьшают поступление избыточного количества калорий в условиях, характерных для СД2, сниженного энергетического обмена и нарушенной чувствительности к глюкозе и инсулину [3, 12]. В то же время механизмы, лежащие в основе анорексигенных влияний БО, исследованы недостаточно [13]. Получены данные о положительном влиянии БО на гипоталамические пути, ответственные за контроль пищевого поведения и регуляцию энергетического обмена на периферии, у грызунов с сильно выраженным ожирением [12, 14]. Ранее нами при изучении крыс с тяжелой декомпенсированной формой СД2, имеющих небольшой дефицит массы тела, сильно выраженную гипергликемию и ослабленную инсулин-продуцирующую функцию поджелудочной железы, было показано, что в гипоталамусе БО снижают повышенную экспрессию гена *Адгр*, кодирующего орексигенный агути-подобный пептид (АПП), и нормализуют экспрессию генов рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1) и негативных регуляторов лептинового и инсулинового сигналинга – фосфотирозин-специфичной фосфатазы 1В и супрессора-3 цитокинового сигналинга (SOCS3) [15]. Однако данные о влиянии БО на контролирующие энергетический обмен гипоталамические пути при умеренно выраженном СД2 с нормальной или в небольшой степени повышенной массой тела отсутствуют. В этой связи необходимо отметить, что такие формы СД2 соответствуют ранним стадиям этого заболевания, когда БО являются наиболее эффективными и могут быть использованы для лечения и профилактики тяжелых форм диабетической патологии.

Целью работы было изучить, как ГШ и ПРЖ влияют на пищевое поведение, метаболические и гормональные показатели и экспрессию гипоталамических генов, кодирующих сигнальные и эффекторные белки, регулирующие аппетит и периферический энергетический обмен, у самцов крыс с умеренно выраженным СД2 без явных признаков ожирения.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для индукции СД2 использовали двухмесячных самцов крыс линии Вистар SPF-статуса, для чего животные в течение 20 недель получали обогащенную жирами диету, включающую 22% жира, 18% белка и 38% углеводов. Через 12 недель им однократно внутрибрюшинно в дозе 20 мг/кг вводили стрептозотоцин (СТЗ) в 0.1 М цитратном буфере (pH 4.5). Через 2 недели отбирали крыс с концентрацией постпрандиальной глюкозы в крови не ниже 8 мМ и рандомизировали их на три группы – ложнооперированные диабетические (группа ЛО-Д, n = 6) и диабетические с ГШ (ГШ-Д, n = 6) и ПРЖ (ПРЖ-Д, n = 6). Контрольных крыс (К, n = 6) содержали на стандартном рационе и вместо СТЗ однократно вводили цитратный буфер.

БО проводили, как описано ранее [16, 17] с нашими модификациями [18]. В ходе проведения операции ГШ осуществляли "выключение" большей части желудка и начальных отделов тонкой кишки, уменьшая площадь и время контакта содержимого со слизистой тонкой кишки, в то время как операцию ПРЖ проводили путем удаления большой кривизны желудка с формированием из оставшейся части узкой трубки.

Содержание глюкозы в крови оценивали с помощью тест-полосок One Touch Ultra (США), уровни инсулина, лептина, ГПП-1 и грелина – с помощью ИФА-наборов Rat Insulin ELISA (Mercodia, Швеция), ELISA kit for Leptin, ELISA kit for Glucagon like Peptide-1 (GLP-1), ELISA kit for Ghrelin (Ghrl) (Cloud-Clone Corp., США). В крови животных исследовали уровни глюкозы натощак, а также постпрандиальной глюкозы – через 120 мин после приема пищи или через 120 мин после глюкозной нагрузки в глюкозотолерантном тесте (ГТТ), в ходе которого крысам внутрибрюшинно вводили глюкозу в дозе 2 г/кг. В конце эксперимента, спустя 5 нед. после БО, крыс наркотизировали изофлюраном, декапитировали и забирали ткани гипоталамуса для оценки эксперссии целевых генов. Все процедуры проводили в соответствии с утвержденным Комиссией по контролю содержания и использования лабораторных животных протоколом-заявкой НМИЦ им. В.А. Алмазова и ИЭФБ РАН и требованиями, предусмотренными European Communities Council Directive 1986 и изложенными в Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010.

Для исследования экспрессии генов использовали количественную RT-ПЦР, для чего, как описано ранее [19, 20], выделяли тотальную PHK из гипоталамуса крыс с помощью TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Амплификацию осуществляли в инкубационной смеси, содержащей 100 нг ПЦР-продукта, 0.4 мкМ каждого праймера, среду qPCRmix-HS SYBR+LowROX (Евроген, Россия), детектируя амплификационный сигнал с помощью прибора 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc., США). В работе использовали праймеры для АПП (ген *Agrp*), про-опиомеланокортина (ПОМК) (ген *Pomc*), нейропептида Y (НПY) (ген *Npy*), рецептора инсулина (ген *InsR*), рецептора лептина (ген *LepR*), рецептора НПY (ген *NpyR*), рецептора ГПП-1 (ген *Glp1R*), рецептора грелина (ген *GhsR*),

Таблица 1.	Последователы	ности прямых	и обратных	праймеров,	используемых	для ампли-
фикации т	ранскриптов цел	евых генов				

Table 1.	The sequences of	of the forward (F	For) and reve	rse (Rev) prim	ers used for am	plification of tran-
scripts c	of target genes					

No	Ген Gene	Локализация Localization	Праймер Primer
1	Agen	For 5' 3'	TGAAGAAGACAGCAGCAGACC
1.	Agrp	1015 - 3 Rev 5'-3'	TGAAGAAGAGGGCAGTAGCAC
2	Domo	For 5' 3'	
۷.	Tome	Por 5' = 5	GTCAAGGCTGTTCATCTCC
3	Mm	$\text{Kev} \ 5 = 5$ For 5' = 3'	
5.	түру	$P_{01} 5' - 5'$	GGACATTTTCTGTGCCTTTCTCTCATTA
4	IncD	$\text{Kev} \ 5 = 5$	CTGGAGAACTGCTCGGTCATT
4.	INSK	FOI 5 = 5 Pov 5' 2'	GGCCATAGACACGGAAAAGAAG
5	I on D	$\text{Kev} \ 5 = 5$	GCATGCAGAATCAGTGATATTTCG
5.	Lepĸ	$FOI \ 5 = 5$	CAACCTCTATCCACACTCATTTCTTC
6	Mar. D	$\text{Kev} \ 5-5$	
0.	мрук	$FOI \ 5 = 5$	
7	Cl., 1D	$\text{Kev} \ 5 - 5$	
7.	GIPTK	For $5-3$	
0		Rev 5-3	GUILGILLAILALAAGG
8.	GhsR	For $5^{\circ}-3^{\circ}$	GAGAICGCICAGAICAGCCAGIAC
	16.00	Rev $5^{\circ}-3^{\circ}$	TAATCCCCAAACTGAGGTTCTGC
9.	Mc3R	For $5^{\circ}-3^{\circ}$	GICACCAICACCAICCIGCIGGG
		Rev $5^{\circ}-3^{\circ}$	CAGGTAGGTGTTGAAGTGCGCCG
10.	Mc4R	For 5'-3'	ACCCTCTCATTTATGCCCTGCGG
		Rev 5'-3'	CACTCTGTCCCCACTTAATACCTGCC
11.	Ht2cR	For 5'-3'	CGAGTCCGTTTCTCGTCTAGCT
		Rev 5'-3'	TTGGCCTATGCTTGCAGGTA
12.	D2R	For 5'-3'	GCAGCAGTCGAGCTTTCAGA
		Rev 5'-3'	CGCCTGTTCACTGGGAAACT
13.	Ptp 1b	For 5'-3'	CAACCGAGGAGGAACAAAAGG
		Rev 5'-3'	CAGTCTGTCAGTGAAAACATACCCG
14.	Socs3	For 5'-3'	GGGACCAAGAACCTACGC
		Rev 5'-3'	GCTGCTCCTGAACCTCAAA

МС3-меланокортинового рецептора (МКЗР) (ген *Mc3R*), МК4Р (ген *Mc4R*), 5-HT_{2C}-серотонинового рецептора (ген *Ht2cR*), D₂-дофаминового рецептора (ген *D2R*), тирозиновой фосфатазы 1В (ген *Ptp1b*), ингибитора цитокинового сигналинга SOCS3 (ген *Socs3*). Последовательности прямых и обратных праймеров приведены в табл. 1. В качестве референсных использовали гены β-актина (*Actb*) и 18S rRNA. Анализ результатов проводили с использованием порогового метода $\Delta\Delta C_t$. Значения RQ рассчитывали по отношению к контрольной группе крыс.

Статистический анализ данных осуществляли с использованием программы Microsoft Office Excel 2007. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения двух выборок с нормальным распределением использовали *t*-критерий Стьюдента. Данные представляли как $M \pm SEM$, статистически значимыми считали отличия при p < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Крысы с СД2, индуцированным 20-недельной высокожировой диетой и однократной обработкой низкой дозой СТЗ, имели повышенную массу тела, избыточное потребление пищи (из расчета в калориях), повышенные уровни глюкозы через 120 мин после приема пищи (постпрандиальная) или глюкозной нагрузки при

8 51	0			
Показатель Parameters	K C	ЛО-Д Sham-D	ГШ-Д RYGB-D	ПРЖ-Д SG-D
Macca тела, г Body weight, g	405 ± 9	$440\pm11~^{a}$	$383\pm17~^{\rm b}$	$393\pm10^{\text{ b}}$
Потребление пищи, ккал/крысу/день* Food intake, kcal/rat/day*	65.0 ± 2.1	$83.3\pm2.1~^{\rm a}$	74.7 ±1.3 ^{a, b}	$68.8 \pm 2.2^{\text{ b, c}}$
Глюкоза (тощ.), ммоль/л Glucose (fasting), mmol/L	4.4 ± 0.2	$6.1\pm0.4~^{a}$	$4.9\pm0.2^{\text{ b}}$	$5.4\pm0.2~^{a}$
Глюкоза (постпранд.), ммоль/л Glucose (postprandial), mmol/L	5.3 ± 0.3	$8.9\pm0.5~^{a}$	$6.7 \pm 0.3^{a, b}$	$7.9\pm0.6~^{a}$
Глюкоза (120 мин, ГТТ), ммоль/л Glucose (120 min), mmol/L	5.2 ± 0.2	$10.4\pm0.6~^{a}$	7.1 ± 0.6 ^{a, b}	$7.6 \pm 0.6^{a, b}$
Инсулин, нг/мл Insulin, ng/mL	0.74 ± 0.09	0.69 ± 0.08	0.71 ± 0.05	0.72 ± 0.08
Лептин, нг/мл Leptin, ng/mL	0.83 ± 0.10	$1.17\pm0.10~^{a}$	$0.85\pm0.08\ ^{\text{b}}$	0.92 ± 0.09
ГПП-1, пг/мл GLP-1, pg/mL	1.62 ± 0.15	1.05 ± 0.08 ^a	0.99 ± 0.07 ^a	$1.54 \pm 0.17^{\text{ b, c}}$
Грелин, пг/мл Ghrelin, pg/mL	276 ± 38	879 ± 72^{a}	337 ± 36^{b}	$519 \pm 41^{a, b, c}$

Таблица 2. Масса тела, потребление пищи, уровни глюкозы и гормонов у крыс с СД2 и влияние на них Roux-en-Y гастрошунтирования и продольной резекции желудка **Table 2.** The body weight, food intake, the glucose and hormones levels in rats with DM2 and the effect of Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy on them

^а – различия между группами К и ЛО-Д статистически значимы при p < 0.05; ^b – различия между группой ЛО-Д и группами ГШ-Д и ПРЖ-Д статистически значимы при p < 0.05. $M \pm$ SEM. * – усредненное по-

a^a – the differences between the groups C and Sham-D are statistically significant at p < 0.05; ^b – the differences between the group Sham-D and the groups RYGB-D and SG-D are statistically significant at p < 0.05. $M \pm$ SEM. * – the average food intake for six days, expressed in the kilocalories.

проведении ГТТ (120-ГТТ). В крови крыс группы ЛО-Д в сравнении с контролем были повышены уровни грелина и, в меньшей степени, лептина, а также снижен уровень ГПП-1 (табл. 2). Эти данные свидетельствуют в пользу развития у животных умеренно выраженного СД2 без явного ожирения, с нарушенной толерантностью к глюкозе, а также с характерными для СД2 изменениями продукции лептина, грелина и ГПП-1. Обе БО снижали массу тела, подавляли аппетит, улучшали показатели глюкозного гомеостаза и гормональные показатели. В отношении влияния на массу тела, показатели глюкозного гомеостаза и уровни лептина и грелина, ГШ была более эффективной в сравнении с ПРЖ. В то же время ПРЖ в большей степени снижала потребление пищи. Наряду с этим, в группе ПРЖ-Д уровень ГПП-1 в крови, сниженный при СД2, повышался до контрольных значений, в то время как в группе ГШ-Д он не отличался от такового в группе ЛО-Д (табл. 2).

В гипоталамусе исследовали экспрессию генов, кодирующих факторы пищевого поведения и их рецепторы, рецепторы моноаминов, грелина и ГПП-1 и компоненты лептинового и инсулинового сигнальных путей. В группе ЛО-Д экспрессия гена орексигенного фактора АПП в значительной степени повышалась, а экспрессия генов *Pomc* и *Npy* менялась незначительно (рис. 1). В этой группе также отмечали снижение экспрессии генов МКЗР и МК4Р, являющихся мишенями АПП (антагониста) и генерируемых из ПОМК анорексигенных меланокортиновых пептидов (агонистов), при сохранении экспрессии гена рецептора НПҮ. Операция ГШ приводила к значительному снижению экспрессии гена *Agrp* и повышению, хотя и слабо выраженному, экспрессии гена *Pomc*, не влияя при этом на экспрессию гена орексигенного фактора НПҮ. Наряду с этим, в группе ГШ-Д восстанавливалась экспрессия гена *Mc3R*. Операция ПРЖ статисти-



Рис. 1. Влияние Roux-en-Y гастрошунтирования и продольной резекции желудка на экспрессию генов анорексигенных и орексигенных факторов и их рецепторов в гипоталамусе крыс с СД2. Уровень экспрессии целевых генов нормирован по уровню экспрессии генов *Actb* и *18S rRNA*. ^а – различия между группами К и ЛО-Д статистически значимы при p < 0.05; ^b – различия между группой ЛО-Д и пруппами ГШ-Д и ПРЖ-Д статистически значимы при p < 0.05; ^c – различия между группами ГШ-Д и ПРЖ-Д статистически значимы при p < 0.05; ^c – различия между группами ГШ-Д и ПРЖ-Д статистически значимы при p < 0.05; ^c – различия между группами ГШ-Д и ПРЖ-Д статистически значимы при p < 0.05; ^c – различия между группами ГШ-Д и ПРЖ-Д статистически значимы при p < 0.05. Данные представлены в виде $M \pm SEM$. n = 6. **Fig. 1.** The effect of Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy on the expression of the genes of the anorexigenic and orexigenic factors and their receptors in the hypothalamus of rats with DM2. The level of expression of target genes is normalized by the level of gene expression of *Actb* and *18S rRNA*.

^a – the differences between the groups C and Sham-D are statistically significant at p < 0.05; ^b – the differences between the group Sham-D and the groups RYGB-D and SG-D are statistically significant at p < 0.05; ^c – the differences between the groups RYGB-D and SG-D are statistically significant at p < 0.05. The data are presented as $M \pm \text{SEM}$. n = 6.

чески значимо снижала экспрессию *Agrp*, но в значительно меньшей степени, чем $\Gamma Ш$, и слабо влияла на экспрессию генов *Pomc*, *Npy*, *Mc3R*, *Mc4R* и *NpyR* (рис. 1).

В гипоталамусе крыс группы ЛО-Д экспрессия генов рецепторов ГПП-1 и грелина в значительной степени повышалась, в то время как экспрессия генов рецепторов лептина и инсулина не отличалась от таковых в контроле. В группе ЛО-Д повышалась экспрессия генов негативных регуляторов лептинового и инсулинового сигналинга – SOCS3 и фосфатазы 1В, но достоверные различия отмечали только для гена *Socs3* (рис. 2). В группе ГШ-Д при сохранении высокого уровня экспрессии гена *Glp1R* отмечали снижение экспрессии генов рецепторов грелина и фосфатазы 1В, а также повышение, по сравнению с контрольной группой, экспрессии гена лептинового рецептора. В группе ПРЖ-Д отмечали еще более выраженное повышение экспрессии гена *Glp1R*, а также тенденцию к снижению экспрессии генов *Socs3* и *Ptp1b*, но различия с группой ЛО-Д не были статистически значимыми (рис. 2). Экспрессия генов 5-HT_{2C}-серотонинового и D2-дофаминового рецепторов в группе ЛО-Д снижалась. При проведении операции ГШ отмечали восстанов-



Рис. 2. Влияние Roux-en-Y гастрошунтирования и продольной резекции желудка на экспрессию генов рецепторов инсулина, лептина, инкретинов и моноаминов и негативных регуляторов лептинового и инсулинового сигналинга в гипоталамусе крыс с СД2.

Уровень экспрессии целевых генов нормирован по уровню экспрессии генов Actb и 18S rRNA.

^а – различия между группами К и ЛО-Д статистически значимы при p < 0.05; ^b – различия между группой ЛО-Д и группами ГШ-Д и ПРЖ-Д статистически значимы при p < 0.05; ^c – различия между группами ГШ-Д и ПРЖ-Д статистически значимы при p < 0.05. Данные представлены в виде $M \pm \text{SEM}$. n = 6.

Fig. 2. The effect of Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy on the expression of the genes of the insulin, leptin, incretins and monoamines receptors and the negative regulators of insulin signaling in the hypothalamus of rats with DM2.

The level of expression of target genes is normalized by the level of gene expression of Actb and 18S rRNA.

^a – the differences between the groups C and Sham-D are statistically significant at p < 0.05; ^b – the differences between the group Sham-D and the groups RYGB-D and SG-D are statistically significant at p < 0.05; ^c – the differences between the groups RYGB-D and SG-D are statistically significant at p < 0.05. The data are presented as $M \pm \text{SEM}$. n = 6.

ление экспрессии гена Ht_{2cR} , в то время как ПРЖ существенного влияния на экспрессию генов Ht_{2cR} и D2R не оказывала (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Имеются многочисленные свидетельства того, что БО приводят к снижению массы тела и жировой ткани, нормализации углеводного и липидного обмена, восстановлению чувствительности к глюкозе и инсулину как у экспериментальных животных, так и у пациентов с СД2 [1–4]. Положительное влияние БО на метаболические и гормональные показатели может выявляться не только при СД2 с сильно выраженным ожирением и дислипидемией, но и при СД2 без явных признаков ожирения. В пользу этого свидетельствуют полученные нами ранее результаты о влиянии операций ПРЖ, ГШ и илеотранспозиции на метаболический статус крыс с тяжелой формой СД2 и небольшим дефицитом массы тела [15], а также данные ряда авторов о положительном влиянии БО на метаболические и функциональные показатели у пациентов с СД2 без явного ожирения [5–11]. На основании этого мы предположили, что вызываемая БО нормализация метаболических и гормональных показателей при СД2 без ожирения обусловлена не только снижением всасывания питательных веществ в желудочно-кишечном тракте, но и изменениями инкретинового статуса и активности гипоталамических сигнальных систем, контролирующих аппетит, пищевое поведение и энергетический обмен. В пользу этого свидетельствует то, что операция ПРЖ, после которой всасывание питательных веществ в желудочно-кишечном тракте меняется слабо, по эффективности при СД2 сопоставима, а по некоторым параметрам и превосходит другие БО [1, 4, 21]. Результаты проведенного нами исследования, в ходе которого изучали влияние ГШ и ПРЖ не только на метаболические и гормональные показатели, но и на экспрессию "пищевых" и "метаболических" генов в гипоталамусе крыс с СД2 без явного ожирения подтвердили это предположение.

Операция ГШ снижала повышенную при СД2 экспрессию гена орексигенного АПП, восстанавливала сниженную при СД2 экспрессию гена МК4Р и в небольшой степени повышала экспрессию гена анорексигенного ПОМК. Необходимо отметить, что ПОМК является прекурсором α-меланоцитстимулирующего гормона и других меланокортиновых пептидов, эндогенных агонистов МК4Р и МК3Р, функционирующих как факторы снижения аппетита [22, 23], в то время как АПП наделен активностью функционального антагониста МК4Р [24]. Операция ГШ также нормализовала уровень грелина в крови — полипептидного гормона, синтезируемого клетками желудочно-кишечного тракта. Одна из главных функций грелина состоит в стимуляции аппетита и реализуется как вследствие повышения моторики желудка и усиления секреции желудочного сока, так и путем активации орексигенных гипоталамических путей при его связывании с грелиновыми рецепторами, расположенными на поверхности гипоталамических нейронов [25, 26]. Нами показано, что повышенная при СД2 экспрессия гена GshR в гипоталамусе крыс группы ГШ-Д снижалась до контрольного уровня, что в сочетании со снижением уровня грелина в крови ведет к ослаблению орексигенного влияния грелина на пищевое поведение как на уровне желудочно-кишечного тракта, так и через гипоталамические механизмы. Вызываемое БО снижение повышенного при СД2 уровня грелина в крови показано и другими авторами [27, 28]. Восстановление нарушенного при СД2 баланса между орексигенными и анорексигенными путями в гипоталамусе при проведении ГШ хорошо согласуется со снижением массы тела и потребления пищи и нормализацией глюкозного гомеостаза у крыс группы ГШ-Д.

В сравнении с ГШ, ПРЖ была менее эффективной в отношении восстановления таких показателей у крыс с СД2, как масса тела, уровни постпрандиальной глюкозы, лептина и грелина в крови. В меньшей степени она влияла и на экспрессию гипоталамических генов АПП, ПОМК, меланокортиновых рецепторов и рецептора грелина. В то же время в группе ПРЖ-Д отмечали более выраженное снижение потребления пищи в сравнении с группой ГШ-Д. Как можно полагать, это обусловлено повышением уровня ГПП-1 в крови и, как следствие, усилением сигнальных путей ГПП-1 в гипоталамусе. ГПП-1, вырабатываемый преимущественно L-клетками кишечника и α-клетками поджелудочной железы, повышает секрецию инсулина панкреатическими β-клетками в условиях повышения уровня глюкозы в крови, а также снижает аппетит, являясь функциональным антагонистом грелина [29–31]. Анорексигенный эффект ГПП-1 и его аналогов обусловлен не только его влиянием на желудочно-кишечный тракт, в основе чего лежит замедление опорожнения желудка и снижение моторики кишечника, но и непосредственным воздействием на гипоталамические нейроны, ответственные за достижение чувства сытости, на поверхности которых локализованы рецепторы ГПП-1 [29]. Нами показано, что в группе ПРЖ-Д уровень ГПП-1 в крови достигал такового в контроле и превышал уровни ГПП-1 в группах ЛО-Д и ГШ-Д на 47 и 56% соответственно. В дополнение к этому в гипоталамусе крыс группы ПРЖ-Д экспрессия гена рецептора ГПП-1 была в три раза выше, чем в контроле и достоверно превышала таковую в группе ЛО-Д. Повышая уровень ГПП-1 в крови и нормализуя гипоталамические ГПП-1-зависимые пути при СД2, БО не только усиливают анорексигенные ГПП-1-зависимые влияния, но также препятствуют развитию нейродегенеративных изменений в гипоталамусе и других отделах мозга, улучшая тем самым центральную регуляцию пищевого поведения и энергетического баланса [32].

Выявленные различия во влиянии ГШ и ПРЖ на пищевое поведение и экспрессию контролирующих его гипоталамических генов могут быть обусловлены особенностями этих БО. Так, при ГШ значительная часть желудка и тонкой кишки выключаются из процесса всасывания пищи, в то время как при ПРЖ этого не происходит. В случае ПРЖ общая протяженность желудочно-кишечного тракта не претерпевает существенных изменений, что модифицирует всасывающую способность, но не приводит к ее снижению. Вероятно в связи с этим, при проведении ПРЖ на первый план выходит восстановление у крыс с СД2 уровня ГПП-1 и активности его сигнальных путей, в то время как нормализация других механизмов, направленных на снижение потребления пищи и достижение чувства сытости, в этом случае не столь критична, как при ГШ.

В этой связи необходимо отметить, что ПРЖ также не влияла на ослабленную при СД2 экспрессию генов 5- HT_{2C} -серотонинового и D_2 -дофаминового рецепторов, в то время как ГШ достоверно повышала экспрессию гена 5- HT_{2C} -серотонинового рецептора. Имеются данные, что в условиях метаболических расстройств экспрессия этих рецепторов и регулируемые ими каскады в различных отделах мозга претерпевают значительные изменения, что влияет на мотивацию к потреблению пищи и на достижение чувства сытости [33, 34]. Наряду с этим серотонинергические и дофаминергические системы в гипоталамусе влияют на функциональную активность меланокортиновых, лептиновых, грелиновых и НПҮ-зависимых путей [19, 35].

Нами показано, что экспрессия генов орексигенного фактора НПҮ и его рецептора, играющих важную роль в контроле пищевого поведения [36], как в группе ЛО-Д, так и в группах ГШ-Д и ПРЖ-Д менялась незначительно. В связи с этим можно предположить, что НПҮ и его сигнальная система непосредственно не вовлечены в нормализацию пищевого поведения, вызываемую ГШ и ПРЖ при СД2 без ожирения. Однако в гипоталамусе НПҮ-сигнальная система является важным связующим звеном между грелиновой и меланокортиновой системами [37] и тем самым может опосредованно участвовать в реализации эффектов ГШ и ПРЖ на аппетит и метаболические показатели при СД2. Так, показано, что у крыс линии Sprague–Dawley с сильно выраженным ожирением ПРЖ не только нормализовала экспрессию НПҮ в гипоталамусе, но и одновременно с этим нормализовала уровень грелина в крови и усиливала экспрессию гена ПОМК в гипоталамусе [38].

Известно, что в регуляцию аппетита и энергетического обмена вовлечены гипоталамические лептиновая и инсулиновая системы, причем, нами и другими авторами показано, что при СД2 и МС они претерпевают существенные изменения [19, 20, 35, 39]. БО, в первую очередь ГШ, ослабляют гиперлептинемию и гиперинсулинемию у экспериментальных животных и пациентов с СД2 и сильно выраженным ожирением [3, 40, 41]. Однако нами установлено, что у крыс с СД2 без ожирения изменения уровней инсулина и лептина в крови, а также изменения экспрессии генов, кодирующих рецепторы лептина и инсулина и негативные регуляторы их сигнальных путей в гипоталамусе, либо отсутствуют, либо слабо выражены. Операции ГШ и ПРЖ вызывали нормализацию уровня лептина, в небольшой степени повышенного в группе ЛО-Д, а в гипоталамусе крыс группы ГШ-Д отмечали достоверное, хотя и слабо выраженное усиление экспрессии гена лептинового рецептора и ослабление экспрессии гена фосфатазы 1В, негативного регулятора лептинового и инсулинового сигналинга. Это может указывать на вызываемое ГШ усиление гипоталамической лептиновой сигнализации у крыс с СД2.

Таким образом, нами впервые показано, что ГШ и ПРЖ приводят к снижению потребления пищи и нормализации ряда метаболических и гормональных показателей у крыс с СД2 без явного ожирения, в том числе, к улучшению нарушенного при диабетической патологии гликемического гомеостаза, нормализации уровня лептина и снижению значительно повышенного при СД2 уровня грелина. Операция ПРЖ, которая в сравнении с ГШ в меньшей степени влияла на глюкозный гомеостаз и уровень грелина, была более эффективной в отношении снижения потребления пищи и, в отличие от ГШ, восстанавливала сниженный при СД2 уровень ГПП-1. При проведении ГШ отчетливо снижалась повышенная при СД2 экспрессия орексигенных генов (АПП, рецептор грелина) и повышалась экспрессия анорексигенных генов до ее уровня в контроле (МКЗР, МК4Р, 5-HT_{2C}-серотониновый рецептор) или выше (ПОМК, рецептор лептина). Значительный вклад в вызываемые ПРЖ снижение аппетита и улучшение метаболических показателей вносят нормализация уровня ГПП-1 в крови и повышение экспрессии гена рецептора ГПП-1 в гипоталамусе. Полученные данные указывают на перспективы применения ГШ и ПРЖ для коррекции метаболических и функциональных нарушений при СД2 без ожирения, а также на вклад в восстанавливающие эффекты этих БО гипоталамических механизмов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом РНФ (№ 17-75-30052).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры по уходу и использованию животных выполняли в соответствии с требованиями Этических комитетов ИЭФБ РАН и НМИЦ им. В.А. Алмазова Минздрава России, European Communities Council Directive 1986 (86/609/EEC) и "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals". Статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследования.

Авторы данной статьи сообщает об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Nguyen N.T., Varela J.E.* Bariatric surgery for obesity and metabolic disorders: state of the art. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 14(3): 160–169. 2017. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.170
- Stewart J., Allen S., Weidman-Evans E. Bariatric surgery and type 2 diabetes. JAAPA. 33(1):28– 32. 2020.
 - https://doi.org/10.1097/01.JAA.0000615484.77430.1b
- Gonzalez-Campoy J.M., Richardson B., Richardson C., Gonzalez-Cameron D., Ebrahim A., Strobel P., Martinez T., Blaha B., Ransom M., Quinonez-Weislow J., Pierson A., Gonzalez Ahumada M. Bariatric endocrinology: principles of medical practice. Int. J. Endocrinol. 2014:917813. 2014. https://doi.org/10.1155/2014/917813
- 4. *Aminian A*. Bariatric procedure selection in patients with type 2 diabetes: choice between Roux-en-Y gastric bypass or sleeve gastrectomy. Surg. Obes. Relat. Dis. pii: S1550-7289(19)31114-1. 2019. https://doi.org/10.1016/j.soard.2019.11.013
- Osman Abouzeid T.A., Ain Shoka A.A., Abd Elsamee Atia K.S. From diabetes remedy to diabetes remission; could single-anastomosis gastric bypass be a safe bridge to reach target in non-obese patients? Asian J. Surg. 42(1): 307–313. 2019. https://doi.org/10.1016/j.asjsur.2018.04.002
- Rubio-Almanza M., Hervás-Marín D., Cámara-Gómez R., Caudet-Esteban J., Merino-Torres J.F. Does Metabolic Surgery Lead to Diabetes Remission in Patients with BMI <30 kg/m²? A Meta-analysis. Obes. Surg. 29(4): 1105–1116. 2019. https://doi.org/10.1007/s11695-018-03654-x
- 7. Shah S.S., Todkar J.S., Shah P.S., Cummings D.E. Diabetes remission and reduced cardiovascular risk after gastric bypass in Asian Indians with body mass index <35 kg/m(2). Surg. Obes.

Relat. Dis. 6(4): 332–338. 2010.

https://doi.org/10.1016/j.soard.2009.08.009

- Rubino F., Schauer P.R., Kaplan L.M., Cummings D.E. Metabolic surgery to treat type 2 diabetes: clinical outcomes and mechanisms of action. Annu. Rev. Med. 61: 393–411. 2010. https://doi.org/10.1146/annurev.med.051308.105148
- Cohen R.V., Pinheiro J.C., Schiavon C.A., Salles J.E., Wajchenberg B.L., Cummings D.E. Effects of gastric bypass surgery in patients with type 2 diabetes and only mild obesity. Diabetes Care. 35(7): 1420–1428. 2012. https://doi.org/10.2337/dc11-2289
- Reis C.E., Alvarez-Leite J.I., Bressan J., Alfenas R.C. Role of bariatric-metabolic surgery in the treatment of obese type 2 diabetes with body mass index <35 kg/m²: a literature review. Diabetes Technol. Ther. 14(4): 365–372. 2012. https://doi.org/10.1089/dia.2011.0127
- Zhang H., Han X., Yu H., Di J., Zhang P., Jia W. Effect of Roux-en-Y Gastric Bypass on Remission of T2D: Medium-Term Follow-up in Chinese Patients with Different BMI Obesity Class. Obes. Surg. 27(1): 134–142. 2017. https://doi.org/10.1007/s11695-016-2262-5
- Nilawera K.N., Speakman J.R. Regulation of intestinal growth in response to variations in energy supply and demand. Obes. Rev. 19(Suppl 1): 61–72. 2018. https://doi.org/10.1111/obr.12780
- Russel S.M., Valle V., Spagni G., Hamilton S., Patel T., Abdukadyrov N., Dong Y., Gangemi A. Physiologic Mechanisms of Type II Diabetes Mellitus Remission Following Bariatric Surgery: a Meta-analysis and Clinical Implications. J. Gastrointest. Surg. 24(3): 728–741. 2020. https://doi.org/10.1007/s11605-019-04508-2
- Sirohi S., Skripnikova E., Davis J.F. Vertical Sleeve Gastrectomy Attenuates Hedonic Feeding Without Impacting Alcohol Drinking in Rats. Obesity (Silver Spring). 27(4): 603–611. 2019. https://doi.org/10.1002/oby.22415
- Kornyushin O.V., Bakhtyukov A.A., Zorina I.I., Toropova Ya.G., Derkach K.V., Berko O.M., Todosenko M.N., Litvinova L.S., Shpakov A.O., Galagudza M.M. The effect of different types of bariatric surgery on metabolic and hormonal parameters in rats with a decompensated form of type II diabetes mellitus. Adv. Gerontol. 9(3): 336–342. 2019. https://doi.org/10.1134/S2079057019030081
- 16. Liu J.Y., Mu S., Zhang S.P., Guo W., Li Q.F., Xiao X.Q., Zhang J., Wang Z.H. Roux-en-Y gastric bypass surgery suppresses hypothalamic PTP1B protein level and alleviates leptin resistance in obese rats. Exp. Ther. Med. 14(3): 2536–2542. 2017. https://doi.org/10.3892/etm.2017.4801
- 17. Wang Q., Tang W., Rao W.S., Song X., Shan C.X., Zhang W. Changes of Ghrelin/GOAT axis and mTOR pathway in the hypothalamus after sleeve gastrectomy in obese type-2 diabetes rats. World J. Gastroenterol. 23(34): 6231–6241. 2017. https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i34.6231
- 18. Корнюшин О.В., Торопова Я.Г., Неймарк А.Е., Берко О.М., Глистенкова Д.Д., Карелли Л.Г., Полозов А.С., Галагудза М.М. Хирургическая коррекция метаболического синдрома в эксперименте на крысах: методические аспекты. Бюл. Сибирск. медицины. 17(1): 59– 74. 2018. [Kornyushin O.V., Toropova Ya.G., Neimark A.E., Berko O.M., Glistenkova D.D., Carelli L.G., Polozov A.S., Galagudza M.M. Surgical correction of metabolic syndromes in rats: methodological aspects. Bull. Siberian Medicine. 17(1): 59–74. 2018. (In Russ)]. https://doi.org/10.20538/1682-0363-2018-1-59-74
- Romanova I.V., Derkach K.V., Mikhrina A.L., Sukhov I.B., Mikhailova E.V., Shpakov A.O. The leptin, dopamine and serotonin receptors in hypothalamic POMC-neurons in normal and obese rodents. Neurochem. Res. 43(4): 821–837. 2018. https://doi.org/10.1007/s11064-018-2485-z
- 20. Derkach K., Zakharova I., Zorina I., Bakhtyukov A., Romanova I., Bayunova L., Shpakov A. The evidence of metabolic-improving effect of metformin in Ay/a mice with genetically-induced melanocortin obesity and the contribution of hypothalamic mechanisms to this effect. PloS One. 14(3): e0213779. 2019.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213779

- Abdel-Rahim M.M., Magdy M.M., Mohamad A.A. Comparative study between effect of sleeve gastrectomy and mini-gastric bypass on type 2 diabetes mellitus. Diabetes Metab. Syndr. 12(6):949–954. 2018. https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.06.001
- 22. Baldini G., Phelan K.D. The melanocortin pathway and control of appetite-progress and thera-
- peutic implications. J. Endocrinol. 241(1): R1–R33. 2019. https://doi.org/10.1530/JOE-18-0596
- Heyder N., Kleinau G., Szczepek M., Kwiatkowski D., Speck D., Soletto L., Cerdá-Reverter J.M., Krude H., Kühnen P., Biebermann H., Scheerer P. Signal Transduction and Pathogenic Modifications at the Melanocortin-4 Receptor: A Structural Perspective. Front. Endocrinol. (Lausanne). 10: 515. 2019. https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00515

- Han Y., Xia G., Wu Q. Functional Interrogation of the AgRP Neural Circuits in Control of Appetite, Body Weight, and Behaviors. Adv. Exp. Med. Biol. 1090: 1–16. 2018. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1286-1
- 25. Al Massadi O., López M., Tschöp M., Diéguez C., Nogueiras R. Current Understanding of the Hypothalamic Ghrelin Pathways Inducing Appetite and Adiposity. Trends Neurosci. 40(3):167–180. 2017. https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.12.003
- 26. Sanger G.J., Broad J., Callaghan B., Furness J.B. Ghrelin and Motilin Control Systems in GI Physiology and Therapeutics. Handb. Exp. Pharmacol. 239: 379–416. 2017. https://doi.org/10.1007/164_2016_104
- Yardimci E., Bozkurt S., Cengiz M.B., Malya F.U. Comparison of Weight Loss, Ghrelin, and Leptin Hormones After Ligation of Left Gastric Artery and Sleeve Gastrectomy in a Rat Model. Med. Sci. Monit. 23: 1442–1447. 2017. https://doi.org/10.12659/msm.901003
- 28. Yavuz Y., Kumral Z.N., Memi G., Çevik Ö.D., Yeğen C., Yeğen B.Ç. Serum Leptin, Obestatin, and Ghrelin Levels and Gastric Emptying Rates of Liquid and Solid Meals in Non-obese Rats with Roux-en-Y Bypass Surgery or Prosthesis Placement: Implications for the Role of Vagal Afferents. Obes. Surg. 27(4): 1037–1046. 2017. https://doi.org/10.1007/s11695-016-2420-9
- Shah M., Vella A. Effects of GLP-1 on appetite and weight. Rev. Endocr. Metab. Disord. 15(3): 181–187. 2014.
- https://doi.org/10.1007/s11154-014-9289-5
- Lu K., Chen X., Yan J., Li X., Huang C., Wan Q., Deng X., Zou Q. The Effect of Feeding Behavior on Hypothalamus in Obese Type 2 Diabetic Rats with Glucagon-like Peptide-1 Receptor Agonist Intervention. Obes. Facts. 11(3): 181–194. 2018. https://doi.org/10.1159/000486316
- Nonogaki K., Kaji T. Liraglutide, a GLP-1 Receptor Agonist, Which Decreases Hypothalamic 5-HT2A Receptor Expression, Reduces Appetite and Body Weight Independently of Serotonin Synthesis in Mice. J. Diabetes Res. 2018: 6482958. 2018. https://doi.org/10.1155/2018/6482958
- Keshava H.B., Mowla A., Heinberg L.J., Schauer P.R., Brethauer S.A., Aminian A. Bariatric surgery may reduce the risk of Alzheimer's diseases through GLP-1 mediated neuroprotective effects. Med. Hypotheses. 104: 4–9. 2017. https://doi.org/10.1016/j.mehy.2017.05.002
- Salahpour A., Caron M.G. Food for thought: the physiological relevance of ghrelin and dopamine D2 receptor heterodimerization in the regulation of appetite. Neuron. 73(2): 210–211. 2012. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.01.004
- 34. D'Agostino G., Lyons D., Cristiano C., Lettieri M., Olarte-Sanchez C., Burke L.K., Greenwald-Yarnell M., Cansell C., Doslikova B., Georgescu T., Martinez de Morentin P.B., Myers M.G. Jr, Rochford J.J., Heisler L.K. Nucleus of the Solitary Tract Serotonin 5-HT_{2C} Receptors Modulate Food Intake. Cell. Metab. 28(4): 619–630.e5. 2018. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.07.017
- 35. Shpakov A.O., Derkach K.V., Berstein L.M. Brain signaling systems in the type 2 diabetes and metabolic syndrome: promising target to treat and prevent these diseases. Future Science OA (FSO). 1(3): FSO25. 2015. https://doi.org/10.4155/fso.15.23
- 36. Shende P., Desai D. Physiological and Therapeutic Roles of Neuropeptide Y on Biological Functions. Adv. Exp. Med. Biol. 1237: 37–47. 2020. https://doi.org/10.1007/5584_2019_427
- https://doi.org/10.1007/5584_2019_427
 37. Yu C.H., Chu S.C., Chen P.N., Hsieh Y.S., Kuo D.Y. Participation of ghrelin signalling in the reciprocal regulation of hypothalamic NPY/POMC-mediated appetite control in amphetaminetreated rats. Appetite. 113: 30–40. 2017. https://doi.org/10.1016/j.appet.2017.02.010
- Kawasaki T., Ohta M., Kawano Y., Masuda T., Gotoh K., Inomata M., Kitano S. Effects of sleeve gastrectomy and gastric banding on the hypothalamic feeding center in an obese rat model. Surg. Today. 45(12):1560–1566. 2015. https://doi.org/10.1007/s00595-015-1135-1
- 39. Izquierdo A.G., Crujeiras A.B., Casanueva F.F., Carreira M.C. Leptin, Obesity, and Leptin Resistance: Where Are We 25 Years Later? Nutrients. 11(11). pii: E2704. 2019. https://doi.org/10.3390/nu11112704
- 40. Ramos A.P., de Abreu M.R., Vendramini R.C., Brunetti I.L., Pepato M.T. Decrease in circulating glucose, insulin and leptin levels and improvement in insulin resistance at 1 and 3 months after gastric bypass. Obes. Surg. 16(10): 1359–1364. 2006. https://doi.org/10.1381/096089206778663706
- Netto B.D., Bettini S.C., Clemente A.P., Ferreira J.P., Boritza K., Souza Sde F., Von der Heyde M.E., Earthman C.P., Dâmaso A.R. Roux-en-Y gastric bypass decreases pro-inflammatory and thrombotic biomarkers in individuals with extreme obesity. Obes. Surg. 25(6): 1010–1018. 2015. https://doi.org/10.1007/s11695-014-1484-7

The Effect of Roux-en-Y Gastric Bypass and Sleeve Gastroectomy and on the Metabolic and Hormonal Parameters and the Hypothalamic Signaling in Non-Obese Rats with Type 2 Diabetes Mellitus

O. V. Kornyushin^a, K. V. Derkach^b, I. B. Sukhov^{a, b}, A. S. Polozov^{a, c}, E. V. Savochkina^{a, c}, V. V. Masley^a, A. E. Egorova^d, A. A. Baktyukov^b, and A. O. Shpakov^b, *

^aAlmazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia ^bSechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg, Russia ^cPavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg, Russia ^dPavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia *e-mail: alex shpakov@list.ru

Bariatric surgery is widely used to correct the metabolic dysfunctions in type 2 diabetes mellitus (T2DM), but the mechanisms of its action are not fully understood. The aim of the work was to study the effect of Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) and sleeve gastrectomy (SG) on the metabolic and hormonal parameters and on the expression of the hypothalamic genes encoding appetite-regulating factors and the components of signaling systems controlling an energy metabolism in male rats with T2DM without obesity. The T2DM was induced by a 20-week high-fat diet and treatment of rats with 20 mg/kg of streptozotocin (STZ) at the 12th week of the experiment. The operations were performed 3 weeks after STZ treatment. The glucose sensitivity and the hormonal parameters were evaluated at the 19th week, and the hypothalamic tissues were taken at the 20^{th} week to evaluate the gene expression. In rats with T2DM, both operations reduced the food intake, decreased the postprandial glucose levels, normalized the leptin levels, and lowered the plasma ghrelin levels in T2DM. The SG, which, in comparison with RYGB, had a lesser effect on the glucose homeostasis and the ghrelin level, reduced the food intake more effectively and, unlike RYGB, restored the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) level decreased in T2DM. The RYGB led to a decrease in the expression of orexigenic genes, encoding agouti-like peptide and ghrelin receptor, increased in T2DM, and to an increase in the expression of anorexigenic genes, encoding the MC3- and MC4-melanocortin, the 5-HT_{2C}-serotonin and leptin receptors and pro-opiomelanocortin. The largest contribution to the effects of SG is made by a significant increase in the hypothalamic expression of the GLP-1 receptor gene, associated with an increase in the plasma GLP-1 level. Thus, the RYGB and SG can be effective to correct the metabolic and functional dysfunctions in non-obese T2DM, and the restoration of the balance between the hypothalamic orexigenic and anorexigenic pathways makes a significant contribution to these effects.

Keywords: bariatric surgery, sleeve gastrectomy, Roux-en-Y gastric bypass, hypothalamic system, ghrelin, glucagon-like peptide-1, agouti-like peptide

ЦИТИРОВАТЬ:

Корнюшин О.В., Деркач К.В., Сухов И.Б., Полозов А.С., Савочкина Е.В., Маслей В.В., Егорова А.Э., Бахтюков А.А., Шпаков А.О. Влияние Roux-en-Y гастрошунтирования и продольной резекции желудка на метаболические и гормональные показатели и гипоталамический сигналинг у крыс с диабетом 2 типа. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 106(7): 1109—1121.

DOI: 10.31857/S0869813920070031

TO CITE THIS ARTICLE:

Kornyushin O.V., Derkach K.V., Sukhov I.B., Polozov A.S., Savochkina E.V., Masley V.V, Egorova A.E., Baktyukov A.A., Shpakov A.O. The Effect of Roux-en-Y Gastric Bypass and Sleeve Gastroectomy and on the Metabolic and Hormonal Parameters and the Hypothalamic Signaling in Non-Obese Rats with Type 2 Diabetes Mellitus. Russian Journal of Physiology. 106(7): 1109–1121.

DOI: 10.31857/S0869813920070031

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 9, с. 1122–1131

— ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ —

РОЛЬ ТКАНЕВОГО ЭРИТРОПОЭТИНА И МЕХАНИЗМОВ ОБРАТНОЙ СВЯЗИ В ЛОКАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ЭРИТРОПОЭЗА

© 2020 г. Н. В. Тишевская^{1, *}, С. А. Шевяков¹

¹Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия *E-mail: natalya-tishevskaya@yandex.ru

> Поступила в редакцию 12.02.2020 г. После доработки 17.05.2020 г. Принята к публикации 05.07.2020 г.

Эритробластические островки (ЭО) костного мозга крысы культивировали 24, 48 или 72 ч вместе с эритроцитами разной степени зрелости, моделируя в системе in vitro состояние гипер- или гипорегенерации эритрона. В контрольных и опытных культурах ЭО определяли концентрацию эритропоэтина методом двухсайтового твердофазного иммуноферментного анализа. При добавлении ретикулоцитов/молодых эритроцитов (модель гиперрегенерации эритрона) в дозе 30 или 60 клеток/1 ЭО через 24 ч культивирования концентрация эритропоэтина в культуральной среде увеличилась на 37% по сравнению с контрольными культурами. В культурах с 120/1 ЭО ретикулоцитами/молодыми эритроцитами концентрация эритропоэтина к 48 ч снижалась на 25%. Добавление зрелых/старых эритроцитов (модель гипорегенерации эритрона) вызывало торможение синтеза эритропоэтина в культуре ЭО. К 48 ч содержание этого гормона в культивационной среде достоверно уменьшилось во всех сериях эксперимента: в культурах с 30 клеток/1 ЭО – на 18%, а в культурах с большой эритроцитарной нагрузкой – на 28%. В 72-часовых культурах, содержащих 30, 60 или 120 эритроцитов/1 ЭО, концентрация эритропоэтина снизилась на 26, 40 и 53% соответственно по сравнению с контролем. Нами установлено, что локальная регуляция эритропоэза напрямую связана с синтезом эритропоэтина в ЭО и зависит от количества и степени зрелости клеток, продуцируемых красным костным мозгом. Полученные данные позволяют утверждать, что именно тканевой эритропоэтин является важнейшим звеном в реализации механизмов обратной связи, обеспечивающих адекватный ответ центрального звена эритрона на кислородный запрос в физиологических условиях и поддерживающих эритропоэз при патологических состояниях, сопровождающихся недостаточной продукцией эритропоэтина в почках.

Ключевые слова: эритропоэз, эритробластический островок, эритропоэтин **DOI:** 10.31857/S0869813920090071

Эритропоэз в костном мозге млекопитающих происходит в специализированных гемопоэтических нишах – эритробластических островках (ЭО), представляющих собой ассоциации макрофагальных (центральные макрофаги ЭО) и эритроидных клеток [1–4]. Эти многоклеточные ассоциации формируются и развиваются только в присутствие эритропоэтина (ЭПО) [5, 6]. Ранее в нашей лаборатории было установлено, что в регуляции функций центрального звена эритрона большую роль играют механизмы положительной и отрицательной обратной связи [7]. Добавление к культивируемым ЭО небольшого количества молодых эритроцитов (ретикулоцитов) приводило к усилению эффекта экзогенного ЭПО и стимулировало процесс формирования ЭО *de novo* (положительная обратная связь). В то же время присутствие в культуре ЭО избыточного количества молодых или зрелых эритроцитов (эритроциты крыс с посттрансфузионной полицитемией) угнетало развитие эритроидных клеток в ЭО и подавляло процесс новообразования островков (отрицательная обратная связь). Также были получены данные о том, что культивационная среда культур ЭО, однократно стимулированных одинаковой дозой рекомбинантного ЭПО, не является однозначно активной по своим эритропоэтическим свойствам. Добавленная в виде супернатанта к другим культурам островков она может как стимулировать, так и угнетать эритропоэз, причем направленность эффекта зависит не только от возраста культуры ЭО, из которой был получен супернатант, но и от количества продуцируемых этой культурой ретикулоцитов [8].

Физиологический ход эритропоэза в ЭО характеризует постоянство количественного и качественного состава островков в единице объема кроветворной ткани. Однако дифференцировка и созревание эритроидных клеток в "короне" ЭО связаны не только с интенсивностью продукции почечного ЭПО (в системе *in vivo*) или количеством добавленного в культуру гормона (в системе *in vitro*), но и от функционального состояния самих клеток ЭО, в частности, от их способности синтезировать гемопоэтические цитокины.

В настоящей работе мы исследовали, как именно интенсивность синтеза ЭПО клетками ЭО зависит от числа и степени зрелости эритроцитов, окружающих развивающиеся островки, оценили непосредственный вклад тканевого ЭПО в реализацию механизмов положительной и отрицательной обратной связи, регулирующих эритропоэз. Для достижения поставленной цели нормально развивающиеся ЭО культивировали, искусственно увеличивая в их окружении количество эритроцитов разной степени зрелости, т.е. фактически в каждом отдельном культуральном сосуде создавали экспериментальные модели гипер- или гипорегенерации эритрона, оценивая при этом динамику концентрации ЭПО в культивационной среде.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 30 белых беспородных крысах обоего пола массой 120–180 г, костный мозг которых использовался для культивирования, и 30 белых беспородных крысах массой 200–350 г, из крови которых получали эритроциты. Исследование проведено в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями о соблюдении биоэтических норм этического комитета ФГБОУ ВО "Южно-Уральский государственный медицинский университет" Минздрава России. Животные содержались в экспериментально-биологической клинике Южно-Уральского государственного медицинского университета в соответствии с правилами СП 2.2.1.3218 и Директивой 2010/63/ЕU по охране животных, используемых в научных целях. Все манипуляции с животными производили под эфирным наркозом, эвтаназию грызунов осуществляли путем цервикальной дислокации, также проводимой под эфирным наркозом.

ЭО выделяли из костного мозга бедренных костей здоровых интактных крыс и далее культивировали по методике, разработанной и используемой в нашей лаборатории [9, 10]. Костный мозг получали в результате промывания канала бедренной кости 1.5 мл препаративной среды, аналогичной по составу среде для культивирования, но без 2-меркаптоэтанола и эритропоэтина. В суспензии костного мозга, разведенной в 2 раза препаративной средой, с помощью камеры Горяева подсчитывали количество ЭО. Суспензию разливали в отдельные стерильные пластиковые чашки Петри диаметром 35 мм (Corning-Costar, США) из расчета 3500 ЭО/чашку. Для отделения взвеси костномозговых клеток чашки Петри на 30 мин помещали в

мультигазовый инкубатор (МСО-18М, SANYO, Япония) при температуре 37°С, относительной влажности 95% и содержании СО₂ 4.5%. По окончании инкубации с помощью шприца монослой островков отмывали от неадгезировавшихся клеток, используя для этого среду RPMI-1640. Каждую чашку Петри с адгезировавшимися ЭО заполняли 3 мл культуральной среды. 100 мл готовой культуральной среды содержали: среду RPMI-1640 – 62 мл, эмбриональную телячью сыворотку – 30 мл, гепарина – 1.3 мл (6500 ЕД), бензилпенициллина калиевую соль – 1 мл (5000 ЕД), стрептомицина – 1 мл (5 мг), 2-меркаптоэтанола – 1 мл маточного раствора, L-глютамина – 1 мл (14.6 мг), бикарбоната натрия – 2.7 мл 7.5% раствора. Перед добавлением в чашки культуральную среду пропускали через стерильные шприцевые насадки с диаметром пор 0.22 мкм.

Перед началом культивирования в каждую чашку Петри вносили рекомбинантный ЭПО (Рекормон, Рош Диагностикс ГмбХ, Германия) в дозе 500 мЕ/мл, поскольку ранее было установлено, что именно эта доза ЭПО поддерживает эритропоэз в культуре ЭО на физиологическом уровне [11]. Культивирование ЭО производилось в мультигазовом инкубаторе при температуре 37° С, относительной влажности 95% и содержании CO₂ 4.5%.

Для моделирования в системе *in vitro* двух разных состояний периферического и центрального звеньев эритрона перед началом культивирования в опытные чашки Петри добавляли эритроциты разной степени зрелости.

Модель 1 — гиперрегенерация эритрона. Эритроцитарная взвесь, состоящая преимущественно из ретикулоцитов и молодых эритроцитов, была получена у крыс, которым внутрибрюшинно вводили солянокислый фенилгидразин в дозе 60 мг/кг. Кровь у этих анемизированных животных забирали на 5-е сутки после введения гемолитика, когда количество ретикулоцитов в их крови составляло не менее $65 \times 10^9/л$.

Модель 2 — гипорегенерация эритрона. Эритроцитарная взвесь, состоящая преимущественно из зрелых и старых эритроцитов, была получена у крыс с экспериментальной посттрансфузионной полицитемией, для создания которой животным-реципиентам внутрибрюшинно в объеме 7% от массы тела была произведена однократная трансфузия 80%-ной взвеси отмытых эритроцитов крыс-доноров. Кровь у этих полицитемичных крыс-реципиентов забирали на 5-сутки после трансфузии, когда количество ретикулоцитов в их крови не превышало 1 × 10⁹/л.

Кровь забирали из задней полой вены и стабилизировали гепарином, после чего эритроциты трижды отмывали стерильным 9%-ным раствором NaCl. Все манипуляции производились в стерильных условиях. Отмытые эритроциты с помощью микродозатора вносили в культуральные сосуды с адгезированными ЭО из расчета 30, 60 или 120 клеток на 1 ЭО. Указанные дозы были выбраны неслучайно. В физиологических условиях в здоровом организме 1 ЭО за один свой цикл продуцирует примерно 30 эритроцитов, при компенсационном эритропоэзе (после кровопотери) – в 2 раза больше (60 эритроцитов). Доза 120 клеток/1 ЭО моделировала избыточное количество эритроцитов, находящееся в кровотоке при миелопролиферации эритроидного ростка кроветворения, например, при истинной полицитемии.

ЭО культивировали в течение 24, 48 или 72 ч. Контролем служили 24-, 48- и 72-часовые культуры ЭО без добавления эритроцитов. По окончании культивирования клетки фиксировали и окрашивали по Паппенгейму (фиксатор-краситель Май– Грюнвальда и краситель Романовского). Всего в работе было проанализировано 126 культур. Количество ЭО на поверхности чашек Петри подсчитывали по методу Автандилова с помощью морфометрической сетки. Содержание ЭПО в культуральной среде определяли методом двухсайтового твердофазного иммуноферментного анализа с помощью набора реактивов Biomerica EPO ELISA (Германия),

Доза эритроцитов Red blood cell dose	Количество ЭО в культуре The number of EI in culture	Концентрация ЭПО (мЕ/мл) EPO concentration, (mU/ml)							
	24 ч культивирования (24 h cultivation)								
Контроль (The control)	3173 ± 106	157 ± 11							
30/1 O((30/1 EI)	3214 ± 76	$213 \pm 11^{*}$							
60/1 O (60/1 EI)	3255 ± 81	$215 \pm 32^{*}$							
120/1 O((120/1 EI)	2935 ± 93	185 ± 22							
4	48 ч культивирования (48 h cultiva	ation)							
Контроль (The control)	2293 ± 99	285 ± 15							
30/1 O((30/1 EI)	2302 ± 87	288 ± 21							
60/1 O (60/1 EI)	2101 ± 95	244 ± 22							
120/1 OO (120/1 EI)	2198 ± 92	$215 \pm 20*$							
	72 ч культивирования (72 h cultiva	ation)							
Контроль (The control)	1619 ± 88	257 ± 30							
30/1 O((30/1 EI)	1455 ± 70	220 ± 25							
60/1 O (60/1 EI)	1523 ± 71	$184 \pm 15^{*}$							
120/1 O(120/1 EI)	1546 ± 86	$196 \pm 11^{*}$							

Таблица 1. Динамика концентрации эритропоэтина (ЭПО) в модели гиперрегенерации эритрона *in vitro*

Table 1.	Erythropoietin	(EPO)	concentration	dynamics	in	an i	in vitro	erythron	hyperregeneratio	n
model										

* Отмечено наличие достоверных различий между показателями контрольных и опытных культур (p < 0.05). *The presence of significant differences between control and experimental cultures (p < 0.05).

включающего биотинилированные и конъюгированные с пероксидазой хрена мышиные моноклональные антитела к определенным участкам человеческого ЭПО. Поскольку в ходе эксперимента по мере созревания ЭО их число в культурах уменьшалось, нами было рассчитано удельное содержание ЭПО, т.е. количество мЕ ЭПО в пересчете на 1 ЭО (удельное содержание = количество ЭПО в 3 мл культуральной среды/число ЭО в культуре).

Статистическая обработка результатов исследований проводилась с использованием программы STATISTICA 6.0. Рассчитывали среднее значение (М), стандартную ошибку (m). Для проверки гипотезы о наличии или отсутствии различий между опытными и контрольными группами использовали непараметрический критерий интегральных различий Колмогорова—Смирнова. Различия считались достоверными при 95%-м уровне значимости (p < 0.05).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При изучении динамики концентрации ЭПО в контрольных культурах были получены данные, аналогичные представленным ранее результатам [12]. Если перед началом культивирования содержание ЭПО в культуральной среде составляло 500 мЕ/мл, то через 24 ч данный показатель достоверно снизился более чем в 3 раза (табл. 1) за счет интенсивного связывания молекул гормона рецепторами эритроидных клеток островков. Через 48 ч концентрация гормона в культуральной среде возросла на 82% и сохранилась на этом уровне до 72 ч. Поскольку рекомбинантный ЭПО был добавлен в культуральную среду только в начале эксперимента, выявленный рост содержания гормона в ходе развития ЭО, несомненно, был обусловлен продукцией эндогенного ЭПО клетками островков.

При добавлении в культуру ЭО ретикулоцитов/молодых эритроцитов (модель гиперрегенерации эритрона) в дозе 30 или 60 клеток/1 ЭО концентрация эритропоэтина в культуральной среде через 24 ч увеличилась на 37% по сравнению с контрольными культурами (табл. 1). Однако, когда количество внесенных в чашку Петри

Доза эритроцитов (Red blood cell dose)	Количество ЭО в культуре The number of EI in culture	Концентрация ЭПО (мЕ/мл) EPO concentration, (mU/ml)			
24 ч	tion)				
Контроль (The control)	3173 ± 106	157 ± 11			
30/1 O((30/1 EI)	3157 ± 100	167 ± 19			
60/1 OO (60/1 EI)	3167 ± 101	166 ± 28			
120/1 O(120/1 EI)	3111 ± 88	140 ± 20			
48 ч	культивирования (48 h cultiva	tion)			
Контроль (The control)	2293 ± 99	285 ± 15			
30/1 OO (30/1 EI)	2228 ± 82	$234 \pm 23*$			
60/1 OO (60/1 EI)	2176 ± 86	$206 \pm 23^{*}$			
120/1 O((120/1 EI)	2236 ± 80	$207 \pm 20*$			
72 ч	культивирования (72 h cultiva	tion)			
Контроль (The control)	1619 ± 88	257 ± 30			
30/1 OO (30/1 EI)	1556 ± 75	$188 \pm 21^{*}$			
60/1 O (60/1 EI)	1518 ± 73	$154 \pm 13^{*}$			
120/1 O((120/1 EI)	1424 ± 84	$200 \pm 14^{*}$			

Таблица 2. Динамика концентрации эритропоэтина (ЭПО) в модели гипорегенерации эритрона *in vitro*

- r r										
Table 2.	Erythropoietin	(EPO)	concentration	dynamics	in	an i	n vitro	erythron	hyporegenerati	on
model										

*Отмечено наличие достоверных различий между показателями контрольных и опытных культур (p < 0.05). *The presence of significant differences between control and experimental cultures (p < 0.05).

молодых эритроидных клеток в 4 раза (120 клеток/1 ЭО) превышало число эритроцитов, формируемых одним островком в физиологических условиях, концентрация ЭПО в культуральной среде через 24 ч не изменилась, а через 48 ч снизилась на 25%. К 72 ч достоверно меньше ЭПО регистрировалось не только в культурах, содержащих 120 клеток/1 ЭО, но и в культурах, к которым добавляли 60 клеток/1 ЭО. Таким образом, относительно небольшая ретикулоцитарная нагрузка на культуру (30 или 60 клеток/1 ЭО) к концу первых суток вызывала увеличение продукции ЭПО в островках. В то же время присутствие в культуре избыточного количества молодых эритроцитов/ретикулоцитов, так же как и увеличение длительности сокультивирования, приводили к снижению синтеза ЭПО клетками ЭО.

Присутствие в микроокружении ЭО зрелых эритроцитов (модель гипорегенерации эритрона) сопровождалось явным торможением эритропоэтиновой продуктивности клеток островков (табл. 2). Если через 24 ч синтез ЭПО оставался на исходном уровне, то к 48 ч содержание гормона в культуральной среде достоверно уменышилось во всех сериях эксперимента: в культурах с малым количеством внесенных зрелых эритроцитов (30 клеток/1 ЭО) – на 18%, а в культурах с большой эритроцитарной нагрузкой – на 28%. В 72-часовых культурах, содержащих 30, 60 или 120 эритроцитов/1 ЭО, количество ЭПО оказалось меньше контрольных значений на 26, 40 и 53% соответственно. Таким образом, в присутствии зрелых эритроидных клеток, выделенных из крови полицитемичных животных, культивируемые ЭО снижали продукцию эндогенного ЭПО тем заметнее, чем больше эритроцитов их окружало.

Поскольку формирование ЭО происходит на основе контактов макрофагов с уже коммитированными клетками, островки фактически представляют собой конечную стадию в развитии центрального звена эритрона. Эритроидные клетки, теряя ядро, дифференцируются до состояния ретикулоцитов и деадгезируются. Если центральный макрофаг в этот момент не присоединяет к себе новую КОЕ-Э или проэритробласты, то этот ЭО прекращает свое существование. В условиях *in vitro* островки также созревают, и ассоциации клеток распадаются, поэтому число ЭО в культуре неуклон-



Рис. 1. Удельное содержание эритропоэтина (мЕ/1 ЭО) в модели гиперрегенерации эритрона *in vitro* (*отмечено наличие достоверных различий между контрольными и опытными показателями, p < 0.05). **Fig. 1.** The specific content of erythropoietin (mU/1 EI) in an in vitro erythron hyporegeneration model (*the presence of significant differences between the control and experimental results, p < 0.05).

но уменьшается. По этой причине мы сочли целесообразным оценить удельное содержание ЭПО, то есть рассчитать, сколько мЕ ЭПО приходится на 1 ЭО.

При анализе динамики удельного содержания ЭПО стало очевидным, что через 24 ч после внесения в культуру ретикулоцитов/молодых эритроцитов (модель гиперрегенерации эритрона) каждый ЭО начал продуцировать больше ЭПО, чем 1 островок контрольных культур (рис. 1). Через 48 ч продукция ЭПО в культурах, получивших 30 или 60 молодых эритроцитов/1 ЭО, была на уровне контрольных значений, но в культурах с избыточной эритроцитарной нагрузкой синтез ЭПО достоверно снизился. К 72 ч торможение синтеза ЭПО наблюдалось не только в указанной серии чашек Петри, но и в культурах, получивших по 60 эритроцитов/1 ЭО.

Островки, нагруженные эритроцитами полицитемичных животных (модель гипорегенерации эритрона), независимо от количества добавленных клеток достоверно снизили продукцию ЭПО через 48 ч культивирования (рис. 2). К 72 ч эксперимента наблюдалась отчетливая зависимость между удельным содержанием гормона и количеством добавленных в культуру клеток: чем больше зрелых эритроцитов находилось в культуре, тем меньше ЭПО синтезировал каждый островок.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на то, что ЭПО могут синтезировать и сами эритроидные клетки [13], несомненно, что в костном мозге основным источником этого гормона являются макрофаги, ЭПО-продуктивность которых была доказана многими авторами [14–16]. Rich с соавт. [14] обнаружил, что в супернатантах первичных культур эмбриональных печеночных макрофагов мыши в первые 7 сут. заметно нарастает продукция ЭПО: общая эритропоэтическая активность клеток каждые сутки увеличивалась на 25 мЕ/мл культуральной среды. Присутствие в макрофагальном микроокружении других клеток, например, апоптотических нейтрофилов, в условиях *in vitro* стимулировало продукцию ЭПО в 2–11 раз [17].

Способность клеток ЭО секретировать ЭПО имеет большое значение для поддержания костномозгового эритропоэза после кровопотери и при некоторых гематологических заболеваниях. Увеличение функциональной активности центральных макро-



Рис. 2. Удельное содержание эритропоэтина (мЕ/1 ЭО) в модели гипорегенерации эритрона *in vitro* (*отмечено наличие достоверных различий между контрольными и опытными показателями, p < 0.05). **Fig. 2.** The specific content of erythropoietin (mU/1 EI) in an in vitro erythron hyporegeneration model (* the presence of significant differences between the control and experimental results, p < 0.05).

фагов ЭО (повышение их эритропоэтических и фагоцитарных свойств, усиление способности формировать гемопоэтическое микроокружение) [18] обеспечивает высокий темп пролиферации и дифференцировки эритроидных клеток как в условиях *in vivo* (в поздние сроки после кровопотери), так и в услових *in vitro* (при длительном культивировании ЭО). По всей видимости, эти же механизмы поддерживают эритропоэз при эритропоэтиндефицитной анемии и при анемии, сопровождающей многие онкологические процессы, поскольку в указанных случаях наблюдается чрезвычайно низкая продукция почечного ЭПО, неадекватная тяжести анемического синдрома [19].

Наши исследования показали, что продукция ЭПО культурой ЭО зависит от количества и степени зрелости эритроцитов, находящихся в окружении островков, а также от длительности их совместного культивирования. Небольшие дозы (30 или 60 клеток/1 ЭО) молодых эритроцитов/ретикулоцитов стимулируют синтез эндогенного ЭПО, что доказывается увеличением концентрации гормона в культуральной среде, особенно через 24 ч эксперимента. Дальнейшее увеличение числа внесенных в культуру клеток, а также увеличение длительности контакта молодых эритроцитов/ретикулоцитов с ЭО приводит к достоверному снижению продукции ЭПО клетками ЭО. Эритроциты полицитемичных крыс тормозят продукцию ЭПО клетками островков, и этот эффект усиливается пропорционально количеству зрелых эритроцитов в культуре.

Ранее нами была высказана гипотеза о существовании механизмов положительной и отрицательной обратной связи в регуляции эритропоэза. Эта гипотеза основана на выявленной способности молодых эритроцитов/ретикулоцитов ускорять формирование новых ЭО, а зрелых и старых – подавлять процесс присоединения колониеобразующих единиц эритроцитарных (КОЕ-Э) к центральным макрофагам ЭО [7]. До недавнего времени было неясно, с чем связаны такие функциональные различия между клетками, по сути являющимися одними и теми же представителями заключительной стадии развития эритроидного ряда. Однако после открытия механизма экзосомного транспорта стало очевидно, что они по-разному могут участвовать в информационном межклеточном обмене [20]. Экзосомы ретикулоцитов содержат регуляторные не кодирующие белок молекулы – микроРНК, среди которых находится микроРНК-451. Вероятно, именно с этой микроРНК
связан стимулирующий эритропоэз эффект, возникающий при добавлении ретикулоцитов в культуру ЭО. Показано, что в процессе дифференцировки CD34+ клеток уровень экспрессии данной микроРНК в развивающихся эритроидных клетках к 7-м суткам культивирования увеличивался в 3 раза, а к 21-м суткам — в 35 раз по сравнению с исходными значениями [21]. Кроме того, доказана связь экспрессии микроРНК-451 с продукцией макрофагальными клетками интерлейкина-6 [22], который стимулирует пролиферацию эритроидных клеток-предшественниц и усиливает адгезивные свойства центральных макрофагов в ЭО.

В экзосомах зрелых эритроцитов были обнаружены микроРНК, имеющие отношение к процессу торможения эритропоэза: микроРНК-221 и микроРНК-222 [23]. В физиологических условиях эти микромолекулы подавляют пролиферацию и дифференцировку эритроидных клеток-предшественниц, одновременно ускоряя созревание эритробластов [24]. Кроме того, экзосомы зрелых эритроцитов индуцируют секрецию фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- α) в клетках моноцитарного ряда [25], что, несомненно, может иметь место и в костномозговых макрофагах, формирующих вокруг себя эритроидную "корону". Роль ФНО- α в регуляции эритропоэза доказана достаточно давно: связывание этого цитокина со специфическим рецептором на молодых эритроидных клетках приводит к торможению их выхода из фазы G0 в S-фазу клеточного цикла [26], а увеличение концентрации ФНО- α тормозит эритропоэз в культуре ЭО [27].

Не исключено также, что микроРНК ретикулоцитов и зрелых эритроцитов модулируют функциональные (в том числе и эритропоэтические) свойства макрофагальных и эритроидных клеток ЭО не напрямую, а опосредованно через лимфоциты, входящие в состав островков [20, 28]. В частности, было показано, что РНК лимфоидных клеток здоровых доноров и больных истинной полицитемией стимулирует эритропоэз в культурах ЭО костного мозга интактных крыс и крыс с угнетенным красным ростком кроветворения [29].

Таким образом, в настоящей работе мы установили, что локальная регуляция эритропоэза напрямую связана с синтезом тканевого ЭПО в ЭО и зависит от количества и степени зрелости эритроцитов, продуцируемых красным костным мозгом. Полученные результаты позволяют утверждать, что именно тканевой, локально синтезирующийся в эритроидной ткани ЭПО, является важнейшим звеном в реализации механизмов обратной связи, обеспечивающих адекватный ответ центрального звена эритрона на кислородный запрос в физиологических условиях и поддерживающих эритропоэз при патологических состояниях, сопровождающих-ся недостаточной продукцией эритропоэтина в почках.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Chasis J.A., Mohandas N.* Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. Blood. 112(3): 470–478. 2008.
- 2. *Hom J., Dulmovits B.M., Mohandas N., Blanc L.* The erythroblastic island as an emerging paradigm in the anemia of inflammation. Immunol. Res. 63(1–3): 75–89. 2015.
- 3. Yeo J.H., Cosgriff M.P., Fraser S.T. Analyzing the formation, morphology, and integrity of erythroblastic islands. Methods Mol. Biol. 1698: 133–152. 2018.
- 4. Elvarsdottir E.M., Mortera-Blanco T., Dimitriou M., Bouderlique T., Jansson M., Hofman I.J.F., Conte S., Karimi M., Sander B., Douagi I., Woll P.S., Hellstrum-Lindberg E. A three-dimensional in vitro model of erythropoiesis recapitulates erythroid failure in myelodysplastic syndromes. Leukemia. 34(1): 271–282. 2020.
- 5. Тишевская Н.В., Шевяков С.А., Захаров Ю.М. Влияние эритропоэтина и макрофагального колониестимулирующего фактора на пролиферативную активность эритроидных клеток в культурах эритробластических островков. Мед. акад. журн. 3(3): 67–72. 2003. [*Tishevskaya N.V., Shevyakov S.A., Zakharov Yu.M.* The effect of erythropoietin and macrophage colony stimulating factor on the proliferative activity of erythroid cells in cultures of erythroblastic islets. Med. akad. zhurn. 3(3): 67–72. 2003. [In Russ)].
- 6. Eggold J.T., Rankin E.B. Erythropoiesis, EPO, macrophages, and bone. Bone. 119: 36–41. 2019.

- Захаров Ю.М., Шевяков С.А. Влияние эритроцитов разной степени зрелости на пролиферативную активность эритроидных клеток "короны" эритробластических островков. Рос. физиол. журн. им. Сеченова. 90(7): 874–881. 2004. [Zakharov Yu.M., Shevyakov S.A. The influences of various stage maturity of erythrocytes on proliferation rate of erythroid cells in "crown" of erythroblastic islands. Russ. J. Physiol. 90(7): 874–881. 2004. [In Russ)].
- Шевяков С.А., Захаров Ю.М. Влияние супернатанта культур эритробластических островков костного мозга на эритропоэз in vitro. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 98(9): 1140–1148. 2012. [Shevyakov S.A., Zakharov Yu.M. Effect of supernatant of erythroblastic island bone marrow cultures on erythropoiesis in vitro. Russ. J. Physiol. 98(9): 1140–1148. 2012. (In Russ)].
- Tishevskaya N.V., Zakharov Yu.M., Golubotovskii E.V., Kolesnikov O.L., Trofimova N.V., Arkhipenko Yu.V., Sazontova T.G. Effects of fullerenol C60(OH)24 on erythropoiesis in vitro. Bull. Exp. Biol. Med. 157(1): 49–51. 2014.
- 10. Волчегорский И.А., Тишевская Н.В., Кузнецов Д.А. Влияние "средних молекул", выделенных из плазмы крови интактных и обожженных животных, на клеточный состав культур эритробластических островков костного мозга. Вестник Рос. академии мед. наук. 2: 30–36. 2002. [Volchegorsky I.A., Tishevskaya N.V., Kuznetsov D.A. Influence of "middle molecules", separated from the blood plasma of intact and burned animals, on the cell composition of cultures of erythroblastic islands of bone marrow. Ann. Russ. Acad. Med. Sci. 2: 30–36. 2002. [In Russ)].
- Тишевская Н.В., Болотов А.А., Захаров Ю.М. Математическое моделирование межклеточных взаимодействий в культуре эритробластических островков. Мед. акад. журн. 5(4): 50– 59. 2005. [Tishevskaya N.V., Bolotov A.A., Zakharov Yu.M. Mathematical modeling of intercellular interactions in the culture of erythroblastic islets. Med. Akad. zhurn. 5(4): 50–59. 2005. [In Russ)].
- Шевяков С.А., Захаров Ю.М. Исследование динамики концентрации эритропоэтина в культурах эритробластических островков. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 95(11): 1207–1215. 2009. [Shevyakov S.A., Zakharov Yu.M. The investigation of dynamic changes of erythropoietin content of the erythroblast island cultures. Russ. J. Physiol. 95(11): 1207–1215. 2009. (In Russ.)]
- 13. Sato T., Maekawa T., Watanabe S., Tsuji K., Nakahata T. Erythroid progenitors differentiate and mature in response to endogenous erythropoietin. J. Clin. Invest. 106(2): 263–270. 2000.
- 14. *Rich I.N., Heit W., Kubanek B.* Extrarenal erythropoietin production by macrophages. Blood. 60(4): 1007–1018. 1982.
- 15. Ohls R.K., Li Y., Trautman M.S., Christensen R.D. Erythropoietin production by macrophages from preterm infants: implications regarding the cause of the anemia of prematurity. Ped. Res. 35(2): 169–170. 1994.
- Chernykh E.R., Shevela E.Y., Sakhno L.V., Tikhonova M.A., Petrovsky Y.L., Ostanin A.A. The generation and properties of human M2-like macrophages: potential candidates for CNS repair? Cell. Therapy Transplant. 2(6): 1–7. 2010.
- 17. Sakhno L.V., Shevela E.Y., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Lykov A.P., Poveshchenko O.V. Effect of apoptotic neutrophils on the production of erythropoietin, MMP-9, and TIMP-1 in cultures of human macrophages. Bull. Exp. Biol. Med. 167(6): 755–758. 2019.
- 18. Тишевская Н.В., Шевяков С.А., Захаров Ю.М. Влияние гуморальных факторов на фагоцитарную активность центральных макрофагов в культуре эритробластических островков. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 88(9): 1191–1198. 2002. [Tishevskaya N.V., Shevyakov S.A., Zakharov Yu.M. The effect of humoral factors on phagocytic activity of central macrophages in the erythroblast islet culture. Russ. J. Physiol. 88(9): 1191–1198. 2002. 2009. (In Russ)].
- 19. *Means R.T.* Recent development in the anemia of chronic disease. Curr. Haematol. Rep. 2(2): 116–121. 2003.
- Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Козлова Н.И. Современный взгляд на роль Т-лимфоцитов в регуляции эритропоэза. Успехи соврем. биологии. 136(1): 83–96. 2016. [*Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M., Kozlova N.I.* A modern view of the role of T-lymphocytes in regulation of erythropoiesis. Uspekhi Sovrem. Biologii. 136 (1): 83–96. 2016. (In Russ)].
- 21. *Merkerova M., Belickova M., Bruchova H.* Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages. Eur. J. Haematol. 81(4): 30–43. 2008.
- Okamoto M., Fukushima Y., Kouwaki T., Daito T., Kohara M., Kida H., Oshiumi H. MicroRNA-451a in extracellular, blood-resident vesicles attenuates macrophage and dendritic cell responses to influenza whole-virus vaccine. J. Biol. Chem. 293(48): 18585–18600. 2018.
- 23. Sangokoya C., LaMonte G., Chi J.T. Isolation and characterization of microRNAs of human mature erythrocytes. Methods Mol. Biol. 667: 193–203. 2010.
- 24. Felli N., Fontana L., Pelosi E., Botta R., Bonci D., Facchiano F., Liuzzi F., Lulli V., Morsilli O., Santoro S., Valtieri M., Calin G., Liu C., Sorrentino A., Croce C., Peschle C. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102(50): 18081–18086. 2005.
- Danesh A., Inglis H.C., Jackman R.P., Wu S., Deng X., Muench M.O., Heitman J., Norris P. Exosomes from red blood cell units bind to monocytes and induce proinflammatory cytokines, boosting T-cell responses in vitro. Blood. 123(5): 687–696. 2014.

- Zhang X. Harada A., Bluethmann H. Tumor necrosis factor is a physiologic regulator of hematopoietic progenitor cells. Blood. 86(8): 2930–2938. 1995.
- 27. Шевяков С.А., Захаров Ю.М. Исследование роли фактора некроза опухоли-альфа в регуляции эритропоэза в культуре эритробластических островков. Рос. физиол. журн. им. Сеченова. 99(8): 993–1001. 2013. [Shevyakov S.A., Zakharov Yu.M. Studying of the role of tumor necrosis factor-alpha in regulation of erythropoiesis in erythroblastic islands cultures. Russ. J. Physiol. 99(8): 993–1001. 2013. (In Russ)].
- Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Козлова Н.И. Роль Т-лимфоцитов в гормональной регуляции морфогенетических процессов. Успехи соврем. биологии. 135(2): 189–202. 2015. [Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M., Kozlova N.I. The role of T-lymphocytes in hormonal regulation of morphogenetic processes. Uspekhi Sovrem. Biologii. 135(2): 189–202. 2015. (In Russ)].
- 29. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Головкина Л.Л., Муратова И.А., Рагимов А.А. О стимулирующих эритропоэз свойствах суммарной РНК лимфоцитов периферической крови при эритремии. Клин. и эксперим. морфология. 1(13): 33–37. 2015. [Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskava N.V., Golovkina L.L., Muratova I.A., Ragimov A.A. Erythropoiesis-stimulating properties of total RNA from peripheral blood lymphocytes during erythremia. Klin. and Eksperim. morfologiya. 1(13): 33–37. 2015. (In Russ)].

The Role of Tissue Erythropoietin and Feedback Mechanisms in Local Regulation of Erythropoiesis *in vitro*

N. V. Tishevskaya^{*a*}, * and S. A. Shevyakov^{*a*}

^aSouth Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia *e-mail: natalya-tishevskaya@yandex.ru

Erythroblastic islets (EI) of rat bone marrow were cultured for 24, 48, or 72 h together with various erythrocytes, simulating the state of erythron hyper- or hyporegeneration in the in vitro system. The concentration of erythropoietin was determined in the control and experimental cultures of EI by two-site enzyme-linked immunosorbent assay. With the addition of reticulocytes/young red blood cells (erythron hyperregeneration model) at a dose of 30 or 60 cells/1 EI, after 24 h of cultivation, the concentration of ervthropoietin in the culture medium increased by 37% compared to control cultures. In cultures with 120/1 EI reticulocytes/young red blood cells, the concentration of erythropoietin decreased by 25% by 48 h. The addition of mature/old red blood cells (an erythron hyporegeneration model) caused inhibition of erythropoietin synthesis in EI culture. By 48 h, the content of this hormone in the cultivation medium significantly decreased in all series of the experiment: in cultures with 30 cells/1 EI – by 18%, and in cultures with a large erythrocyte load – by 28%. In 72-h cultures containing 30, 60, or 120 red blood cells/1 EI, the concentration of erythropoietin decreased by 26, 40, and 53%, respectively, compared with the control. We found that local regulation of erythropoiesis is directly related to the synthesis of erythropoietin in EI and depends on the number and maturity of cells produced by red bone marrow. The data obtained suggest that it is tissue erythropoietin that is the most important link in the implementation of feedback mechanisms that provide an adequate response of the erythron to an oxygen demand in physiological conditions and support erythropoiesis in pathological conditions accompanied by small production of erythropoietin in the kidneys.

Keywords: erythropoiesis, erythroblastic islet, erythropoietin

ЦИТИРОВАТЬ:

Тишевская Н.В., Шевяков С.А. Роль тканевого эритропоэтина и механизмов обратной связи в локальной регуляции эритропоэза. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 106(9): 1122–1131. DOI: 10.31857/S0869813920090071

TO CITE THIS ARTICLE:

Tishevskaya N.V., Shevyakov S.A. The Role of Tissue Erythropoietin and Feedback Mechanisms in Local Regulation of Erythropoiesis in Vitro. Russian Journal of Physiology. 106(9): 1122–1131. DOI: 10.31857/S0869813920090071 РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 9, с. 1132–1143

= ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ =

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО ФИБРИН-МОНОМЕРА НА ГЕМОСТАТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ И ОБРАЗОВАНИЕ ФИБРИНА В ОБЛАСТИ ДОЗИРОВАННОЙ ТРАВМЫ ПЕЧЕНИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

© 2020 г. В. М. Вдовин^{1, 3,} *, А. П. Момот^{1, 2, 3}, Д. А. Орехов⁴, И. П. Бобров¹, Д. А. Момот¹, И. И. Шахматов^{1, 3}, В. О. Красюкова¹, В. Е. Чернусь¹, В. В. Теряев¹, Н. А. Лычёва³, С. В. Москаленко¹

¹Алтайский государственный медицинский университет, Барнаул, Россия ²Алтайский филиал ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр гематологии, Барнаул, Россия

³Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия ⁴Алтайский краевой кардиологический диспансер, Барнаул, Россия

*E-mail: erytrab@gmail.com

Поступила в редакцию 17.03.2020 г. После доработки 14.04.2020 г. Принята к публикации 05.05.2020 г.

В работе изучен гемостатический потенциал крови и морфологическая картина раны печени при профилактическом в/в введении фибрин-мономера (ФМ) в дозах 0.25 и 2.5 мг/кг на модели дозированной травмы у кроликов породы Шиншилла. Установлено, что обе дозы ФМ приводили в равной степени к снижению посттравматической кровопотери, однако, усиление гемостатического потенциала в системной циркуляции было присуще лишь дозе 2.5 мг/кг (по увеличению уровня D-димера и уплотнению сгустка по данным тромбоэластометрии). При этом усиления генерации тромбина в кровотоке на обеих дозах ФМ отмечено не было. В ходе морфологических исследований выявлен феномен многократного усиления фибринообразования в области раны, более выраженный при использовании высокой дозы ФМ.

Ключевые слова: фибрин-мономер, калиброванная тромбография, тромбоэластометрия, уровень D-димера, травма печени, гемостатический эффект, морфология раны печени

DOI: 10.31857/S0869813920070092

Фибрин-мономер (дез-ААВВ-фибриноген, ΦM), хорошо известен как продукт действия тромбина на фибриноген и источник фибрина [1–3], он рассматривается и как регуляторная молекула, способная влиять на агрегационную активность тромбоцитов [4–8] и эритроцитов [9].

В наших ранее проведенных исследованиях показано, что ФМ способен минимизировать посттравматическое кровотечение при его профилактическом внутривенном введении [10, 11]. Данные эксперименты были направлены на поиск эффективных гемостатических доз ФМ (в диапазоне от 0.1 до 5.0 мг/кг), по результатам которых дозировка 0.25 мг/кг была определена как терапевтическая (не влияющая на показатели системы гемостаза по результатам исследования плазмы венозной крови). Использование доз ФМ от 2.5 мг/кг и выше влекло за собой тромботические события, включая летальные исходы, связанные с внутрисосудистым свертыванием крови. Эти дозы были определены как токсические. Уменьшение кровопотери на фоне применения ток-



Fig. 1. Design of the experiment. FM – fibrin monomer.

сических доз ФМ в 6.7 раза (в % объема циркулирующей крови – ОЦК) по сравнению с плацебо вполне прогнозируемо, однако близкая по результатам эффективность терапевтической дозы изучаемого производного фибриногена (0.25 мг/кг) пока не нашла своего объяснения. На наш взгляд, дополнительную информацию о механизмах последнего явления могут предоставить сравнительные исследования результатов применения разных доз ФМ с помощью современных интегральных методов исследования системы гемостаза и оценка морфологической картины, а также особенностей тромбообразования в месте нанесения дозированной травмы печени.

Учитывая изложенное, целью настоящего исследования явилось изучение особенностей гемостатического потенциала в системной циркуляции, а также морфологических проявлений последствий применения терапевтической и токсической доз фибрин-мономера при его внутривенном введении перед дозированной травмой печени в эксперименте.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования были проведены на 67 здоровых половозрелых кроликах-самцах породы Шиншилла массой 3.0–4.5 кг, эти животные являются наиболее подходящим видом биологических объектов для данного рода исследований [12]. Экспериментальные животные были получены из вивария Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (г. Новосибирск) и до начала эксперимента содержались в стандартных условиях в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев).

При помощи генератора случайных чисел методом простой рандомизации из животных были сформированы 3 экспериментальные группы (дизайн исследования – см. рис. 1).

Животным группы 1 (n = 21) в краевую вену уха (внутривенно, в/в) при помощи иглы-катетера Cathy (фирма HMD) вводили водный раствор плацебо (4.0 М раствор мочевины, соответствующий ее концентрации в растворе ФМ), объемом 0.5 мл. Животным группы 2 (n = 25) и 3 (n = 21) аналогичным образом вводили водный раствор ФМ (фирма Технология-Стандарт, Россия) в дозах 0.25 и 2.5 мг/кг соответственно.

Спустя один час после в/в введения ФМ или плацебо предварительно наркотизированным животным (общая анестезия препаратом Телазол, фирма Зоэтис, Россия, внутривенно в дозе 10 мг/кг) наносилась дозированная травма печени в соответствии с имеющимися рекомендациями [13]. Затем с помощью стерильных марлевых салфеток оценивался характер паренхиматозного кровотечения — по расчетному объему кровопотери в % от ОЦК с учетом массы тела животного [14] и темпу кровопотери в единицу времени (мг/с) [12]. Животных выводили из эксперимента после прекращения кровотечения из раны путем введения анестетика в летальной дозе (в 3–4 раза превышающей терапевтическую) [15].

Для исследования системы гемостаза кровь получали из краевой вены уха (самотеком) после флеботомии [13]. Эту процедуру проводили дважды: непосредственно перед в/в введением препаратов, а также спустя 55 мин после инъекции ФМ или плацебо – перед нанесением дозированной травмы печени (см. рис. 1). Кровь помещали в полистироловые центрифужные градуированные пробирки с полихлорвиниловыми крышками, содержащими 0.11 М (3.8%) раствор цитрата натрия (соотношение крови и стабилизатора 9:1), в объеме 5.0 мл, при этом первые 3–4 капли крови отбрасывали. Часть стабилизированной крови отбирали для проведения тромбоэластометрии, остальную порцию крови центрифугировали при 1200 g в течение 15 мин для получения обедненной тромбоцитами плазмы крови.

Эксперименты на животных проводили в соответствии с принципами Базельской декларации, Европейской конвенции и директивами по охране позвоночных животных, используемых в эксперименте 86/609/EEC, а также Хельсинской декларацией и Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных [16]. Работа была одобрена локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО Алтайский государственный медицинский университет МЗ РФ (протокол № 12 от 12.11.2015 г.).

Исследование системы гемостаза включало в себя определение уровня D-димера в плазме крови при помощи тест-системы NycoCard[®] D-Dimer (фирма Axis-Shield PoC AS, Норвегия) и анализатора-рефлектометра NycoCard Rader II. В число использованных интегральных методов исследования системы гемостаза вошли:

 Оценка генерации тромбина методом калиброванной автоматизированной тромбографии по Hemker с использованием планшетного флуориметра Fluoroskan Ascent при длине волны 390 нм (фирма ThermoFisher SCIENTIFIC, Финляндия), с программным обеспечением Thrombinoscope[™] 3.0.0.26 и наборами реагентов фирмы Thrombinoscope[®] bv (Нидерланды) (PPP-Reagent, Thrombin Calibrator, FluCa-Kit). Исследование плазмы крови осуществлялась в 96-луночном планшете типа Immulon 2HB (фирма ThermoFisher SCIENTIFIC, США).

2) Тромбоэластометрия стабилизированной цитратом крови на приборе тромбоэластометре ROTEM® Gamma (фирма Pentapharm GmbH, Германия), с реагентом Startem в режиме Natem.

После остановки кровотечения для гистологического исследования у животных забиралась ткань печени, включая всю раневую часть и фрагмент неповрежденной поверхности. Материал помещали в гистологические кассеты, маркировали и фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина по Лилли. Проводку материала осуществляли по изопропиловому спирту с помощью автомата проводки карусельного типа TISSUE-TEK VI РТМ6 (фирма Sakkura, Япония), заливали материал в парафин (фирма BiOvitrum, Россия) при помощи станции парафиновой заливки TISSUE-TEK TEC 5 (фирма Sakkura, Япония). Гистологические срезы толщиной 4-5 мкм получали с использованием полуавтоматического роторного микротома Accu-Cut SRM (фирма Sakkura, Япония), окрашивали препараты гематоксилином и эозином в автомате для автоматической окраски микропрепаратов TISSUE-TEK Prisma (фирма Sakkura, Япония), заключали препараты под пленку в автомате для автоматического заключения микропрепаратов TISSUE-TEK Film (фирма Sakkura, Япония). Для определения фибрина срезы окрашивали по Маллори. Морфометрические измерения проводили с помощью лицензионного пакета морфометрических программ ВидиоТест – Морфология 5.2 (фирма ВидиоТест, Россия).



Рис. 2. Сравнительный анализ параметров кровопотери у экспериментальных животных после дозированной травмы печени. Значения представлены в виде медианы — горизонтальной линии внутри прямоугольника, включающего 50% полученных значений и значений, соответствующих 2.5 и 97.5 перцентилей — нижний и верхний вертикальные бары.

Fig. 2. Comparative analysis of blood loss parameters in experimental animals after dosed liver injury. The values are represented as a median – a horizontal line inside the rectangle, including 50% of the obtained values and values corresponding to 2.5 and 97.5 percentiles – lower and upper vertical bars.

Распределение признаков в выборках оценивали по критерию Шапиро–Уилки. В зависимости от распределения признаков применяли *t*-критерий Стьюдента, U-критерий Манна–Уитни или W-критерий Вилкоксона. Различия считали статистически значимыми при $p \le 0.05$. Обработку экспериментальных данных проводили с использованием статистической программы MedCalc Version 17.9.7 (лицензия BU556-P12YT-BBS55-YAH5M-UBE51). Результаты представлены в виде медианы (Me), 25-го и 75-го перцентилей (Q): Me [Q25–Q75].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При исследовании гемостатических свойств препаратов было установлено, что объем кровопотери в группах животных после в/в введения ФМ в дозе 0.25 мг/кг (группа 2) и ФМ в дозе 2.5 мг/кг (группа 3) оказался в 5.6 раза (1.8 [1.0–3.5] в % ОЦК) и в 6.7 раза (1.5 [1.0–3.0] по тому же показателю меньше в сравнении с группой плацебо (группа 1) (10.1 [4.3–16.3] (рис. 2*A*).

Аналогичная динамика наблюдалась и с показателем темпа кровопотери (рис. 2*B*), который снижался в группе 2 в 3.6 раза (7.1 [4.7–12.5] мг/с) и в 5.5 раз в группе 3 (4.7 [3, 8, 8, 9] мг/с) по сравнению с группой 1 (25.7 [7.1–36.5] мг/с).

Полученные данные при оценке системы гемостаза у животных приведены в табл. 1–3.

Как видно из табл. 1, изменений показателей генерации тромбина после введения плацебо или сопоставляемых доз ФМ в сравнении с исходными значениями (до введения препаратов ФМ) найдено не было.

В то же время, по данным тромбоэластометрии крови, введение ΦM в дозе 2.5 мг/кг (группа 3) сопровождалось гиперкоагуляционным сдвигом (по показателю CT), а также умеренным, но статистически значимым повышением плотност-

	Группа 1 Group 1		Груг Gro	ппа 2 лир 2	Группа 3 Group 3	
Показатели Indicators	до введения плацебо (_{1a)} before the introduction of placebo (_{1a)}	после введения плацебо (16) after the introduction of placebo (1b)	до введения $\Phi M_{(2a)}^{(2a)}$ before the introduction of FM $_{(2a)}^{(2a)}$	после введения $\Phi M_{(26)}$ after the introduction of $FM_{(2b)}$	до введения $\Phi M_{(3a)}^{(3a)}$ before the introduction of FM $_{(3a)}^{(3a)}$	после введения $\Phi M_{(36)}$ after the introduction of $FM_{(3b)}$
Lagtime, мин	2.2	2.0	2.3	2.2	2.0	2.1
(min)	[2.0-2.7]	[1.8-2.7]	[2.0-2.4]	[2.0-2.7]	[1.8 - 2.1]	[1. 8. 2. 2]
	252.0	$p_{1a-16} = 0.068$	421.0	$p_{2a-26} = 0.208$	122 ($p_{3a-36} = 0.293$
ETP,	3/3.9	484.8	421.8	423.4	422.6	435.3
(nmol min)	[558.7-500.4]	[300.0-022.3]	[400.4-401.3]	[380.3-431.9]	[3/2.2-440.8]	[383.0-470.3]
Peak thrombin	76.2	$p_{1a-16} = 0.224$	78.3	$p_{2a-26} = 0.702$	58.1	$p_{3a-36} = 0.017$
нмоль (nmol)	[40.7-90.9]	[34.3-138.8]	[55.2-103.9]	[58.5-91.2]	[49.6-67.4]	[50.0-82.6]
		$p_{1a-16} = 0.128$		$p_{2a-26} = 0.540$		$p_{3a-36} = 0.309$
ttPeak, мин	5.8	5.4	4.9	5.8	4.5	5.0
(min)	[5.0-7.3]	[4.6-6.3]	[4.5-6.3]	[4.6-7.3]	[3.8–5.3]	[4.3-5.8]
		$p_{1a-16} = 0.143$		$p_{2a-26} = 0.299$		$p_{3a-36} = 0.158$
V, НМОЛЬ/МИН	25.3	26.8	26.5	23.3	21.1	23.4
(mnoi/min)	[9.2-29.1]	[/.8-02.2]	[1/.0-40.9]	[13.0-30.3]	[1/.9-29.0]	[12.7-33.0]
		$p_{1a-16} = 0.102$		$p_{2a-26} = 0.534$		$p_{3a-36} = 0.831$

Таблица 1. Изменения показателей тромбограммы у групп животных на фоне введения ФМ и плацебо

Table 1.	Changes	in thrombogram	n indicators	in animal	groups	against	the	background	of introd	luc-
tion of FI	M and pla	acebo								

Lagtime — время инициации образования тромбина; ETP — эндогенный тромбиновый потенциал; Peak thrombin — пиковая концентрация тромбина; ttPeak — время достижения пиковой концентрации тромбина; V — скорость образования тромбина.

Lagtime – thrombin initiation time; ETP – endogenous thrombin potential; Peak thrombin – peak thrombin concentration; ttPeak – time of reaching peak thrombin concentration; V – thrombin formation speed.

ных характеристик фибринового сгустка (по показателям MCF и A10), что не было свойственно для животных, получивших плацебо (группа 1) или ФМ в дозе 0.25 мг/кг (группа 2) (табл. 2). Отметим, что такое повышение плотности кровяного сгустка в группе 3 сочеталось с 7.5-кратным увеличением уровня D-димера в плазме крови животных (табл. 3).

Для оценки морфологических проявлений последствий использования терапевтической и токсической доз ФМ при его внутривенном введении были исследованы срезы раневой поверхности печени, полученной после спонтанной остановки посттравматического кровотечения.

В группе плацебо (группа 1) при макроскопическом анализе ткани печени (рис. 3*A*) определялись тонкие, гладкие, розоватого цвета, блестящие тромботические массы. При микроскопическом исследовании (рис. 3*B*) тромботические отложения были представлены в виде тонких нитей фибрина и большого количества неизмененных эритроцитов. Эти отложения характеризовались тонкими розового цвета нитями фибрина, располагавшимися преимущественно параллельно поверхности печени, образуя редкие анастомозы. При морфометрическом анализе толщина волокон фибрина варьировала от 0.09 до 1.50 мкм (табл. 4).

У животных, получавших ФМ в дозе 0.25 мг/кг (группа 2) морфологическая картина места повреждения печени имела значительные отличия от предыдущей – см. рис. 4. Макроскопически найдены массивные "бугристые" тромботические наложения буроватого цвета (рис. 4*A*). При микроскопии тромботические массы состояли из нитей фибрина, включающих в свой состав большое количество преимущественно ге-

	Группа 1		Груг	тпа 2	Группа 3	
	Group 1		Gro	up 2	Group 3	
Показатели Indicators	до введения плацебо (_{1а)} before the introduction of placebo _(1а)	после введения плацебо $_{\rm (16)}$ after the introduction of placebo $_{\rm (1b)}$	до введения $\Phi M_{(2a)}^{(2a)}$ before the introduction of FM $_{(2a)}$	после введения $\Phi M_{(26)}_{(2b)}$ after the introduction of $FM_{(2b)}$	до введения $\Phi M_{(3a)}^{(3a)}$ before the introduction of FM $_{(3a)}$	после введения $\Phi M_{(36)}$ after the introduction of $F M_{(3b)}$
CT, c (s)	605.5	628.0	636.5	472.5	602.0	470.0
	453.8–801.5]	[479.0-856.0]	[440.3–799.8]	[380.3–727.5]	[431.8-772.8]	[344.0–665.5]
		$p_{1a-16} = 0.980$		$p_{2a-26} = 0.150$		$p_{3a-36} = 0.033 \Delta + 22\%$
угол α, град.	57.0	55.0	53.0	54.0	53.5	53.0
(angle α, gr.)	[46.5–62.0]	[49.0–65.0]	[45.5–62.8]	[46.8–61.0]	[46.8–57.3]	[47.5–67.0]
		p = 0.207		$p_{2a-26} = 0.958$		$p_{3a-36} = 0.135$
CFT, c (s)	182.5	206.0	240.5	206.0	227.0	202.0
	[148.8–269.3]	[146.0-254.0]	[141.0-285.5]	[157.5–271.3]	[183.3–274.3]	[122.0–279.5]
		$p_{1a-16} = 0.288$		$p_{2a-26} = 0.749$		$p_{3a-36} = 0.205$
MCF, мм	59.5	58.0	56.5	59.5	59.0	63.0
(mm)	[56.0–64.3]	[54.0–64.0]	[51.5–63.8]	[53.3–62.8]	[55.0–60.0]	[53.5–67.5]
		$p_{1a-16} = 0.956$		$p_{2a-26} = 0.808$		$p_{3a-36} = 0.012 \Delta + 7\%$
A10, мм (mm)	44.0	43.0	42.0	45.0	43.5	45.0
	[40.8–52.5]	[39.0–50.0]	[34.8–51.3]	[38.5–51.0]	[37. 3–49. 5]	[40.5–58.5]
		$p_{1a-16} = 0.422$		$p_{2a-26} = 0.563$		$p_{3a-36} = 0.015 \Delta + 4\%$

Таблица 2. Изменения показателей тромбоэластограммы у животных на фоне введения ФМ и плацебо

Table 2.	Changes in thromboelastogram indicators in animals against the background of introduction
of FM a	nd placebo

CT – время начала коагуляции; угол α – амплитуда сгустка; CFT – время образования сгустка; MCF – максимальная твердость сгустка; A10 – амплитуда сгустка через 10 минут; здесь, а также в табл. 3 и 4 Δ – разница показателей.

CT – coagulation time; angle α – clot amplitude; CFT – clot formation time; MCF – maximum clot firmness; A10 – clot amplitude after 10 minutes; here and in Tabl. 3 and 4, Δ – differences of indicators.

Таблица З.	Особенности содержания в плазме	крови D-димера у	у животных на фоне	введения
ФМ и плац	цебо			

 Table 3. Features of D-dimer blood plasma content in animals against the background of introduction of FM and placebo

	Группа 1		Группа 2		Группа 3	
	Group 1		Group 2		Group 3	
Показатели Indicators	до введения плацебо (_{1а)} before the introduction of placebo (_{1a)}	после введения плацебо (16) after the introduction of placebo (1b)	до введения $\Phi M_{(2a)}$ before the introduction of FM (2a)	после введения $\Phi M_{(26)}$ after the introduction of FM (2b)	до введения $\Phi M_{(39)}$ before the introduction of FM $_{(3a)}$	после введения ФМ (36) after the introduction of FM (3b)
Уровень	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	750.0
D-димера, нг/мл	[100.0–100.0]	[100.0–200.0]	[100.0-100.0]	[100.0–200.0]	[100.0–200.0]	[425.0–1250.0]
(Level D-dimer, ng/ml)		$p_{1a-16} = 0.201$		$p_{2a-26} = 0.201$		$p_{3a-36} = 0.00001$ Δ B 7.5 pa3



Рис. 3. Морфологическая картина раны печени кролика группы 1 (плацебо) после остановки кровотечения (описание в тексте). A – окраска гематоксилином и эозином, увеличение ×40. B – окраска на фибрин по Маллори, увеличение ×400. Здесь, а также на рис. 4 и 5 обозначение "F" – фибрин. **Fig. 3.** Morphological pattern of the wound of the rabbit liver in group 1 (placebo) after bleeding stop (description in the text). A – staining with haematoxylin and eosin, zoom ×40. B – Mallory's fibrin staining, zoom ×400. Here, as well as in Fig. 4 and 5 the symbol "F" is fibrin.

молизированных эритроцитов (рис. 4*B*). Толщина тромботических наложений значимо превышала (в 4.8 раза) аналогичный показатель в группе плацебо (табл. 4).

Нити фибрина располагались в различных направлениях и, как правило, имели вид развитых сетей с характерными многочисленными анастомозами. Толщина нитей фибрина в 2 раза превышала аналогичный показатель группы № 1, с пределами колебаний толщины от 0.65 до 4.1 мкм (табл. 4).

В группе животных 3, получавших ФМ в дозе 2.5 мг/кг, определяли аналогичную макроскопическую картину, что и в группе 2 (рис. 5*A*). Однако толщина тромботических масс уже в 5 раз превышала аналогичный показатель, определенный в группе 1. При этом статистически значимых отличий по сравнению с группой 2 получено не было (табл. 4). При микроскопии отмечалось наличие толстых, грубых нитей фибрина на фоне большого количества гемолизированных эритроцитов (рис. 5*B*). Нити фибрина располагались в различных направлениях, были видны их значительные утолщения и анастомозы. Толщина нитей в 1.6 раза превышала аналогичный показатель в группе 2 и в 3.2 раза отличалась от группы 1.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Обе использованные дозы ФМ (терапевтическая и токсическая) приводили к снижению показателей кровопотери примерно в равной степени, однако усилению ге-

F			
Показатели Indicators	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа 3 Group 3
Толщина тромботических масс, мкм	66.2 [62.7-83.5]	314.4 [284.8-348.3]	328.8 [221.6-425.0]
of thrombotic masses, μm		$p_{1-2} = 0.0007; \Delta \times 4.8$	$p_{1-3} = 0.0007; \Delta \times 5.0$ $p_{2-3} = 0.794$
Толщина нитей фибрина, мкм	0.83 [0.72-0.93]	1.68 [1.16-2.21]	2.63 [1.95-3.65]
Thickness of fibrin strands, µm		$p_{1-2} = 0.000004; \Delta \times 2.0$	$p_{1-3} = 0.000004; \Delta \times 3.2$ $p_{2-3} = 0.0003; \Delta \times 1.6$

Таблица 4. Показатели морфометрического исследования тромботических масс Table 4. Indicators of morphometric study of thrombotic masses



Рис. 4. Морфологическая картина раны печени кролика группы 2 (ФМ 0.25 мг/кг) после остановки кровотечения (описание в тексте). A – окраска гематоксилином и эозином, увеличение ×40. B – окраска на фибрин по Маллори, увеличение ×400.

Fig. 4. Morphological pattern of the wound of the rabbit liver in group 2 (FM 0.25 mg/kg) after bleeding stop (description in the text). A – staining with haematoxylin and eosin, zoom ×40. B – Mallory's fibrin staining, zoom ×400.



Рис. 5. Морфологическая картина раны печени кролика группы 3 (Φ M 2.5 мг/кг) после остановки кровотечения (описание в тексте). *А* – окраска гематоксилином и эозином, увеличение ×40. *B* – окраска на фибрин по Маллори, увеличение ×400.

Fig. 5. Morphological pattern of the wound of the rabbit liver in group 3 (FM 2.5 mg/kg) after bleeding stop (description in the text). A – staining with haematoxylin and eosin, zoom ×40. B – Mallory's fibrin staining, zoom ×400.

мостатического потенциала в системной циркуляции способствовала лишь доза 2.5 мг/кг. Последнее иллюстрировалось гиперкоагуляционным сдвигом и увеличением плотности фибринового сгустка (по данным тромбоэластометрии), а также многократным ростом уровня D-димера — маркера состоявшегося образования фибрина и сопутствующего фибринолиза. Интересно, что при использовании как низкой, так и высокой доз ФМ не было найдено усиление генерации тромбина в тесте калиброванной тромбографии. Следовательно, полученные гемостатические эффекты не были связаны с усилением тромбинообразования, и их можно отнести на счет локальных неферментативных реакций конечного этапа свертывания крови, а именно — полимеризации/самосборки вводимого извне ФМ (дез-ААВВ-фибриногена) на раневой поверхности печени. Эти соображения подтверждаются приростом толщины тромботических масс в 4.8 раза (использование ФМ в дозе 0.25 мг/кг) и в 5.0 раз (ФМ в дозе 2.5 мг/кг) по сравнению с плацебо, где остановка кровотечения была опосредована лишь известными системными реакциями превращения фибриногена в фибрин. Кроме того, обращает на себя внимание разница в толщине волокон фибрина, которая была по медиане в 2.0–3.2 раза больше в группах животных, получивших экзогенный ФМ. Данный факт согласуется с ранее выполненными исследованиями, где описана обратная связь между толщиной фибриновых волокон и концентрацией тромбина. Так, Wolberg в экспериментах *in vitro* показала, что концентрация тромбина оказывает значительное влияние на структуру формирующегося фибрина при взаимодействии фибриногена и тромбина [17]. В частности, при добавлении низких концентраций тромбина к фибриногену образуются массы, состоящие преимущественно из толстых фибриновых волокон, увеличивающих пористость геля. Напротив, в присутствии высоких концентраций тромбина сгустки состоят из тонких и коротких волокон фибрина, относительно устойчивых к фибринолизу [17–20].

Возникает вопрос — насколько значительна создаваемая концентрация экзогенного ФМ при введении его в дозе 0.25 мг/кг, обуславливающая увеличение в 4.8 раза толщину тромботических отложений в области травмы и обеспечение критического снижения объема кровопотери (в 5.6 раза)?

Как известно, в условиях физиологической нормы ФМ присутствует в плазме крови человека в концентрации до 7.0 мкг/мл и может увеличиваться до 50 и более мкг/мл при внутрисосудистом свертывании крови [3, 21].

Учитывая среднюю величину объема циркулирующей крови и уровень гематокрита у животных [14], можно рассчитать, что после в/в введения ФМ в дозе 0.25 мг/кг его концентрация в плазме крови животного составит от 5.6 до 8.9 мкг/мл.

Данное обстоятельство свидетельствует о том, что вводимый ФМ сам по себе вряд ли способен формировать основу кровяного сгустка в месте травмы при свободном распределении в кровотоке.

Исходя из сказанного возникает следующий вопрос — каким образом экзогенный ФМ (в дозе 0.25 мг/кг) накапливается в месте повреждения для обеспечения эффективного тромбообразования?

При ответе можно отметить, что представления о механизмах реализации гемостатических реакций в последние годы претерпели значительные изменения в свете развития современной теории клеточной модели свертывания крови [22–27]. Данная теория описывает взаимодействие клеток крови и факторов свертывания в процессе образования кровяного сгустка. В частности, имеются работы, указывающие на способность ΦM усиливать агрегационную активность тромбоцитов [4–8], а также эритроцитов [9]. Как известно, ФМ имеет схожую структуру с фибриногеном, отличаясь от последнего отсутствием четырех фибринопептидов (2A и 2B) [1]. При этом локусы связывания фибриногена с рецептором тромбоцитов GP IIb/IIIa после действия тромбина на молекулу данного белка остаются неизменными в самой молекуле ФМ и находятся на С-конце у-цепи (консервативная последовательность Лиз-Глн-Ала-Гли-Асп-Вал в положении 400–411) [1, 28] и а-цепи (трипептид Арг-Гли-Асп в положении 572–574) [1, 29, 30]. Таким образом, ФМ потенциально способен образовывать фибриноподобные мостики между тромбоцитами, стимулируя их прямые функции. Кроме того, известно, что в присутствии тромбина и коллагена тромбоциты способны "отдавать" в плазму крови микровезикулы, содержащие рецептор IIb/IIIa, взаимодействующий с фибрином, фибриногеном и фибронектином [31, 32].

Учитывая и суммируя сказанное можно отметить, что ФМ, как и фибриноген, может образовывать связи с тромбоцитами, которые, вероятно, способны транспортировать данный белок к месту повреждения тканей. Следует также учесть, что поврежденный эндотелий кровеносных сосудов активно экспрессирует на своей поверхности интегрин, схожий по строению с тромбоцитарным GP IIb/IIIa, участвующий не только в адгезии тромбоцитов в области травмы, но и в связывании с фибриногеном, и, возможно, с ФМ [26, 33]. Интерполируя эти данные, можно констатировать, что отчетливый гемостатический эффект ФМ, проанализированный в настоящей работе, реализуется на фоне низкой генерации тромбина как в системной циркуляции (по данным теста генерации тромбина), так и в ране (по морфологическим признакам, описывающим толщину нитей фибрина), что открывает дополнительные пути при создании принципиально новых гемостатических препаратов системного действия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты продемонстрировали усиление гемостатического потенциала в системной циркуляции ФМ, взятого в дозе 2.5 мг/кг (токсической) и отсутствие такого эффекта в случае использования дозы ФМ в 0.25 мг/кг (терапевтической) при сходных достижениях по уменьшению посттравматической кровопотери. При морфологических исследованиях выявлен феномен усиления фибринообразования в ране без признаков повышенной (по сравнению с плацебо) генерации тромбина. Остается вопрос о механизмах накопления экзогенного ФМ в области травмы печени, ответ на который может быть найден в ходе дальнейших экспериментов с фармакологическим подавлением функции тромбоцитов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (в рамках гранта на реализацию научного проекта № 18-415-220001 конкурса р_а – Конкурс проектов 2018 г. фундаментальных научных исследований) и ФГБОУ ВО Алтайский государственный медицинский университет Минздрава России (г. Барнаул).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Зубаиров Д.М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. Казань. Фэн. 2000. [Zubairov D.M. Molekulyarnie osnovi svertivaniya krovi i tromboobrazovaniya [Molecular basis of blood clotting and thrombus formation]. Kazan. Fen. 2000. (In Russ)].
- 2. Weisel J.W., Litvinov R.I. Fibrin Formation, Structure and Properties. Subcell. Biochem. 82: 405–456. 2017.
- 3. *Refaai M.A., Riley P., Mardovina T., Bell P.D.* The Clinical Significance of Fibrin Monomers. Thromb. Haemost. 118(11): 1856–1866. 2018.
- 4. *Larrieu M.J.* Action of fibrinogen degradation products and fibrin monomer soluble complexes on platelet aggregation. Scand. J. Haematol. Suppl. 13: 273–279. 1971.
- 5. Пасторова В.Е., Ляпина Л.А., Кудряшов Б.А., Луговской Э.В. Агрегация тромбоцитов, вызываемая фибрин-мономером, и влияние комплексных соединений гепарина с адреналином или плазмином на этот процесс. Гематология и трансфузиология. 7: 5–7. 1990. [Pastorova V.E., Ljapina L.A., Kudrjashov B.A., Lugovskoj Je. V. Platelet aggregation caused by fibrin monomer and the effect of complex compounds of heparin with adrenaline or plasmin on this process. Hematol. and Transfusiol. 7: 5–7. 1990. (In Russ)].
- Момот А.П., Суханова Г.А. Агрегация тромбоцитов, индуцированная фибрин-мономером, и ее нарушения при внутрисосудистом свертывании крови. Гематология и трансфузиология. 11: 25–26. 1991. [Momot A.P., Suhanova G.A. Platelet aggregation induced by fibrin monomer and its disorders in intravascular blood clotting. Hematol. and Transfusiol. 11: 25–26. 1991. (In Russ)].
- 7. Васильева Т.М., Петрухина Г.Н., Макаров В.А., Момот А.П., Баркаган З.С. Агрегация тромбоцитов человека in vitro при одновременном воздействии фибрин-мономера и некоторых проагрегантов. Проблемы гематологии и переливания крови. 2: 23–26. 2002. [Vasil'eva T.M., Petruhina G.N., Makarov V.A., Momot A.P., Barkagan Z.S. Human platelet aggregation in vitro with simultaneous exposure to fibrin monomer and some proaggregants. Hematology and Blood Transfusion Probl. 2: 23–26. 2002. (In Russ)].
- Левин Г.Я., Егорихина М.Н., Тараненко И.А., Момот А.П. Влияние фибрин-мономера на спонтанную агрегацию тромбоцитов. Клин. лаб. диагностика. 3: 39–42. 2011. [Levin G.Ja., Egorihina M.N., Taranenko I.A., Momot A.P. Effect of fibrin monomer on spontaneous platelet aggregation. Clin. Lab. Diagnostics. 3: 39–42. 2011. (In Russ)].
- 9. *Levin G.Y., Egorihina M.N.* Aggregation of erythrocytes in burn disease. Int. J. Burns. Trauma. 1(1): 34–41. 2011.
- Момот А.П., Вдовин В.М., Шахматов И.И., Толстокоров И.Г., Орехов Д.А., Шевченко В.О., Лычёва Н.А., Кудинов А.В., Белозерская Г.Г., Киселёв В.И. Системные гемостатические и про-

тромботические эффекты фибрин-мономера в эксперименте при дозированной травме печени. Сибирск. научн. мед. журн. 39(1): 6–12. 2019. [Momot A.P., Vdovin V.M., Shahmatov I.I., Tolstokorov I.G., Orekhov D.A., Shevchenko V.O., Lycheva N.A., Kudinov A.V., Belozerskaja G.G., Kiseljov V.I. Systemic hemostatic and prothrombotic effects of fibrin monomer in the experiment with dosed injury of the liver. Siberian Scientific Med. J. 39(1): 6–12. 2019. [In Russ]].

- 11. Вдовин В.М., Момот А.П., Орехов Д.А., Толстокоров И.Г., Шевченко В.О., Красюкова В.О., Шахматов И.И., Лычёва Н. А. Белозерская Г.Г. Время-зависимые системные гемостатические эффекты фибрина-мономера при дозированной травме печени в эксперименте. Казанский мед. журн. 100(2): 257–263. 2019. [Vdovin V.M., Momot A.P., Orekhov D.A., Tolstokorov I.G., Shevchenko V.O., Krasyukova V.O., Shakhmatov I.I., Lycheva N.A., Belozerskaya G.G. Time-dependent systemic hemostatic effects of fibrin monomer in case of a controlled liver injury. Kazan Med. J. 100(2): 257–263. 2019. (In Russ)].
- Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Ред. А.Н. Миронов. М. Гриф и К. 2012. [Rukovodstvo po provedeniu doklinicheskih issledovaniy lekarstvenih sredstv [Guidelines for preclinical drug trial]. Part 1. Red. A.N. Mironov. Moscow. Grif and K. 2012. (In Russ)].
- Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Ред. *Р.У. Хабриев*. М. Медицина. 2005. [Rukovodstvo po eksperimentalnomu (doklinicheskomu) izucheniyu niovih farmakologicheskih veshchestv [Guidelines for experimental (preclinical) study of new pharmacological substances] Ed. *R.U. Habriev*. Moscow. Meditsina. 2005. (In Russ)].
- 14. Справочник. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. Ред. В.Г. Макаров. СПБ. ЛЕМА. 2013. [Spravochnik. Fiziologicheskie, biohimicheskie i biometricheskie pokazateli normi experimentalnih givotnih [Resource guide. Normal physiological, biochemical and biometric parameters in experimental animals]. Red. V.G. Makarov. St. Petersburg. LEMA. 2013. (In Russ)].
- 15. *Копаладзе Р.А.* Методы эвтаназии экспериментальных животных. Этика, эстетика, безопасность персонала. Успехи физиол. наук. 31(3): 79–90. 2000. [*Kopaladze R.A.* Methods of euthanasia of experimental animals. Ethics, esthetics and personnel safety. Achievements Physiol. Sci. 31(3): 79–90. 2000. (In Russ)].
- 16. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasburg. Council of Europe. 1986.
- 17. Wolberg A.S. Thrombin generation and fibrin clot structure. Blood Rev. 21(3): 131–142. 2007.
- 18. Carr M.E. Jr, Hermans J. Size and density of fibrin fibers from turbidity. Macromolecules. 11(1): 46–50. 1978.
- Blombäck B., Carlsson K., Hessel B., Liljeborg A., Procyk R., Aslund N. Native fibrin gel networks observed by 3D microscopy, permeation and turbidity. Biochim. Biophys. Acta. 997(1-2): 96– 110. 1989.
- 20. Blombäck B., Carlsson K., Fatah K., Hessel B., Procyk R. Fibrin in human plasma: gel architectures governed by rate and nature of fibrinogen activation. Thromb. Res. 75(5): 521–538. 1994.
- 21. Петрова О.П., Тарасов Д.Г., Никулина Д.М., Бирюкова Л.А., Мартьянова Ю.Б., Панова Е.В., Мартиросов М.Ю., Грачева Н.П., Жукова Е.Р., Кадыкова А.В. D-димер и фибрин-мономер как маркеры эффективности использования новых оральных антикоагулянтов. Клин. и эксп. хир. журн. им. акад. Б.В. Петровского. 6(3): 64–69 2018. [Petrova O.P., Tarasov D.G., Nikulina D.M., Birjukova L.A., Mart'janova Ju.B., Panova E.V., Martirosov M.Ju., Gracheva N.P., Zhukova E.R., Kadykova A.V. D-dimer and fibrin monomer as markers of efficiency of using new oral anticoagulants. Clin. Exp. Surgery. Petrovsky J. 6(3): 64–69 2018. [In Russ]].
- 22. Hoffman M., Monroe D.M. A Cell-based Model of Hemostasis. Thromb. Haemost. 85: 958–965. 2001.
- 23. *Hoffman M*. Remodeling the blood coagulation cascade. J. Thromb. Thrombolysis. 16(1–2): 17–20. 2003.
- 24. Папаян Л.П. Новое в представлении процесса свертывания крови. Трансфузиология. 5(1): 7–22. 2004. [*Papaian L.P.* New in the idea of the blood clotting process. Transfusiology. 5(1): 7–22. 2004. (In Russ)].
- 25. *Hoffman M., Monroe D.M.* Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. Hematol. Oncol. Clin. North Am. 21(1): 1–11. 2007.
- 26. Кузник Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии. Чита. Экспресс-издательство. 2010. [Kuznik B.I. Kletochnye i molekuljarnye mehanizmy reguljacii sistemy gemostaza v norme i patologii [Cellular and molecular regulation mechanisms of hemostasis system in health and disease]. Chita. Ehkspress-izdatel'stvo. 2010. (In Russ)].
- 27. *Ho K.M., Pavey W.* Applying the cell-based coagulation model in the management of critical bleeding. Anaesth. Intensive Care. 45(2): 166–176. 2017.
- Pierschbacher M.D. Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. Nature. 309(5963): 30–33. 1984.
- 29. Farrell D.H., Thiagarajan P., Chung D.W., Davie E.W. Role of fibrinogen alpha and gamma chain sites in platelet aggregation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89(22): 10729–10732. 1992.

- Weisel J.W., Nagaswami C., Vilaire G., Bennett J.S. Examination of the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex and its interaction with fibrinogen and other ligands by electron microscopy. J. Biol. Chem. 267(23): 16637–16643. 1992.
- 31. Зубаиров Д.М., Зубаирова Л.Д. Микровезикулы в крови. Функции и их роль в тромбообразовании: монография. М. ГЭОТАР-Медиа. 2009. [Zubairov D.M., Zubairova L.D. Mikrovezikuly v krovi. Funkcii i ih rol' v tromboobrazovanii: monografija. [Microvesicles in the blood. Functions and their role in thromboformation: monograph]. GEOTAR-Media. 2009. (In Russ)].
- 32. Зубаиров Д.М., Щербатенко-Лушникова Л.А., Андрушко И.А., Габитов С.З., Литвинов Р.И., Кальбина А.В., Воронина И.Е. Циатностика тромбопластинемии при инфаркте миокарда. Терапевт. архив. 53(8): 29–30. 1981. [Zubairov D.M., Shherbatenko-Lushnikova L.A., Andrushko I.A., Gabitov S.Z., Litvinov R.I., Kal'bina A.V., Voronina I.E. Diagnosis of thromboplastinemia in myocardial infarction. Therap. Archive. 53(8): 29–30. 1981. [In Russ]].
- Шитикова А.С. Тромбоцитопатии, врожденные и приобретенные. Под ред. Л.П. Папаян, О.Г. Головиной. СПб. ИИЦ ВМА. 2008. [Shitikova A. S. Trombocitopatii, vrozhdennye i priobretennye [Thrombocytopathy, congenital and acquired]. Eds. L.P. Papajan, O.G. Golovinoj. SPb. IIC VMA. 2008. (In Russ)].

Influence of Exogenous Fibrin Monomer on Hemostatic Potential and Formation of Fibrin in the Area of Dosed Liver Injury in Experiment

V. M. Vdovin^{*a*, *c*, *, A. P. Momot^{*a*, *b*, *c*}, D. A. Orekhov^{*d*}, I. P. Bobrov^{*a*}, D. A. Momot^{*a*}, I. I. Shakhmatov^{*a*, *c*}, V. O. Krasyukova^{*a*}, V. E. Chernus^{*a*}, V. V. Terjaev^{*a*}, N. A. Lycheva^{*a*, *c*}, and S. V. Moskalenko^{*a*}}

^aAltai State Medical University, Barnaul, Russia ^bNational Research Center for Hematology, Barnaul, Russia ^cResearch Institute of Physiology and Fundamental Medicine of SB RAS, @, Russia ^dAltai Regional Cardiology Health Center, Barnaul, Russia *e-mail: erytrab@gmail.com

The research studied the hemostatic potential of blood and morphological pattern of liver wound in prophylactic i.v. introduction of fibrin monomer (FM) at doses of 0.25 mg/kg and 2.5 mg/kg in the dosed injury model on the rabbits of the Chinchilla breed. It was found that both doses of FM led equally to a decrease in post-traumatic blood loss; however, the increase of hemostatic potential in systemic circulation was inherent only in a dose of 2.5 mg/kg (according to an increase in the D-dimer level and clot densification according to thromboelastometry data). At the same time, there was no increase in the thrombin generation in the bloodstream at both doses of FM. In the course of morphological studies, the phenomenon of multifold fibrin formation increase in the wound area was revealed, more pronounced when using a high dose of FM.

Keywords: fibrin monomer, calibrated thrombography, thromboelastometry, D-dimer level, liver injury, hemostatic effect, morphological pattern

ЦИТИРОВАТЬ:

Вдовин В.М., Момот А.П., Орехов Д.А., Бобров И.П., Момот Д.А., Шахматов И.И., Красюкова В.О., Чернусь В.Е., Теряев В.В., Лычёва Н.А., Москаленко С.В. Влияние экзогенного фибрин-мономера на гемостатический потенциал и образование фибрина в области дозированной травмы печени в эксперименте. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(7): 1132–1143.

DOI: 10.31857/S0869813920070092

TO CITE THIS ARTICLE:

Vdovin V.M., Momot A.P, Orekhov D.A., Bobrov I.P., Momot D.A., Shakhmatov I.I., Krasyukova V.O., Chernus V.E., Terjaev V.V., Lycheva N.A., Moskalenko S.V. Influence of Exogenous Fibrin Monomer on Hemostatic Potential and Formation of Fibrin in the Area of Dosed Liver Injury in Experiment. Russian Journal of Physiology. 106(7): 1132–1143.

DOI: 10.31857/S0869813920070092

= ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ =

Посвящаю памяти проф., чл-корр. РАН И.Б. Козловской

ВЛИЯНИЕ РЕАЛЬНОЙ МИКРОГРАВИТАЦИИ НА МЫШЕЧНУЮ АРХИТЕКТУРУ И ФУНКЦИЮ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ ЧЕЛОВЕКА

© 2020 г. Ю. А. Коряк*

Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия *E-mail: yurikoryak@mail.ru

> Поступила в редакцию 23.04.2020 г. После доработки 22.06.2020 г. Принята к публикации 05.07.2020 г.

Исследовали влияние продолжительной микрогравитации на архитектуру и сократительные свойства трехглавой мышцы голени (ТМГ) у трех космонавтов. Определяли максимальную произвольную силу (МПС), максимальную силу (P_{0}) , время одиночного сокращения (ВОС), время полурасслабления (1/2 ПР), время развития напряжения и рассчитывали силовой дефицит (P_n). Ультразвуковые изображения (УЗИ) медиальной (МИМ), латеральной (ЛИМ) икроножных и камбаловидной (КМ) мышц определяли при изменении положения угла голеностопного сустава в диапазоне от -15° (тыльное сгибание) до $+30^{\circ}$ (подошвенное сгибание) и в положении коленного сустава с углом 180°. В каждом положении были получены продольные УЗИ с определением длины ($L_{\rm B}$) и угла наклона волокон ($\Theta_{\rm B}$) относительно апоневроза. После микрогравитации МПС и $P_{\rm O}$ ТМГ уменьшились на 26% и 18% соответственно, а Р_л увеличился на 30%. ВОС и 1/2 ПР уменьшились на ~5 и ~10% соответственно. Скорость развития произвольного сокращения ТМГ снизилась, но электрически вызванного сокращения не изменилась. При положении голеностопного сустава -15° L_в МИМ, ЛИМ и КМ уменьшалась с 45, 53 и 39 мм до 27, 43 и 27 мм, а при положении +30° - с 26, 33 и 27 до 18, 25 и 17 мм соответственно. При этом $\Theta_{\rm B}$ изменялся на 9°, 8°, 5° и на 11° , 10° и 8° соответственно. МИМ имела самые большие изменения $\Theta_{\rm B}$ в пределах от 31° до 45°. Изменения в функциях ТМГ предполагают, что невесомость изменяет не только периферические процессы, но также изменяет и координационные механизмы управления мышечным аппаратом. Различные $L_{\rm B}$ и $\Theta_{\rm B}$ мышц и их изменения могли быть связаны с различиями в способностях генерации силы этих мышц и упругих характеристик сухожилий и апоневрозов.

Ключевые слова: ультразвуковое исследование, угол наклона и длина волокон, трехглавая мышца голени, космический полет, произвольное и электрически вызванное сокращение

DOI: 10.31857/S0869813920090034

Принятые сокращения: ВОС – время одиночного сокращения, КМ – камбаловидная мышца, ЛИМ – латеральная икроножная мышца, МИМ – медиальная икроножная мышцы, МПС – максимальная произвольная сила, МСК – мышечно-сухожильный комплекс, 1/2 ПР – время полурасслабления, $P_{\rm A}$ – силовой дефицит, $P_{\rm O}$ – максимальная сила, УЗИ – ультразвуковое изображение, ТМ – толщина мышцы, ТМГ – трехглавая мышца голени, $L_{\rm B}$ – длина мышечных волокон, $\Theta_{\rm B}$ – угол наклона мышечных волокон.

Гравитационная нагрузка, по-видимому, необходима для сохранения сократительной функции скелетных мышц у человека [1–3]. Уменьшение нагрузки сопровождается снижением сократительных функций и размера (массы) скелетных мышц [1, 4, 5]. Следует отметить, что наибольшему воздействию в этом случае подвергается группа антигравитационных мышц – разгибателей колена и стопы [6–10]. Среди них подошвенный сгибатель стопы является наиболее затронутым [6, 7, 9–11], вероятно, из-за большей механической загруженности в нормальных гравитационных условиях.

Трехглавая мышца голени (ТМГ), являясь основным синергистом плантарной флексии, имеет первостепенное значение при локомоции и в контроле позы [12], поскольку активация ТМГ приводит к разгибанию стопы, что предохраняет переднее смещение центра подошвенного давления в пределах зоны опоры [12]. Следовательно, ТМГ играет важную роль не только в регулировании положения тела, в зависимости от положения центра массы, для поддержания постурального баланса, но и предопределяет переход из положения стоя до ходьбы или бега [13]. В этом контексте, с сугубо биомеханической точки зрения, любое изменение в силе подошвенного давления внутри зоны опоры или в ее передачи может привести к неблагоприятным изменениям в постуральном балансе и к увеличению риска падения [14]. Более того, медиальная (МИМ) и латеральная (ЛИМ) икроножные и камбаловидная (КМ) мышцы, образующие ТМГ, в целом, имеют разную внутреннюю архитектуру (длину мышц, длину и угол наклона волокон) [15].

Наиболее известный феномен воздействия разгрузки мышечного аппарата – это бо́льшая потеря силы мышцы по сравнению с ее размером [6, 16], что прямо указывает на существование других факторов кроме атрофии, которые вносят вклад в "слабость" мышц. Размер мышцы у человека традиционно оценивается в терминах площади поперечного сечения, и для оценки размера мышц используют метод магнитно-резонансной и компьютерной томографии [17–19], которые являются "золотым стандартом". Однако эти методы крайне дорогостоящие. В связи с этим одним из доступных и неинвазивных методов, позволяющих визуализировать структуру мышцы в условиях *in vivo* и определять изменения архитектуры мышц, может быть ультразвуковая эхография [19–21].

Действительно, с развитием ультразвуковой технологии, совершенствования ультразвукового оборудования и разработкой В-режима ультразвукового сканирования появилась возможность визуализации изображения мышц с количественной и качественной информацией об особенностях ее строения, т.е. появился альтернативный метод в реальном времени визуализировать мышцу и исследовать ее архитектуру [16, 19, 21]. В настоящее время метод В-режима ультразвукового сканирования мышц нашел широкое применение в различных областях и используется в клинике, в спортивной медицине и в возрастной физиологии [22–25].

Большинство скелетных мышц у человека являются перистыми [26–30], т.е. волокна которых размещаются под некоторым углом относительно оси действия мышцы. Угол наклона волокон один из важных архитектурных параметров мышцы, который влияет на способность мышцы генерировать силу [27–30]. Угол наклона волокна представляет собой вектор силы, действующий через волокна мышцы в горизонтальном и перпендикулярном направлениях к сухожилию, и, таким образом, влияет на передачу силы от волокон к кости [30].

Для перистой мышцы увеличенный угол наклона — это результат, во-первых, уменьшения длины волокон мышцы, что ставит под угрозу скорость укорочения и диапазон возвратно-поступательного движения, а во-вторых, позволяет большему количеству сократительного материала быть расположенным в волокне, это увеличивает способность мышцы генерировать силу [29, 31, 32]. Поэтому максимальная сила, продуцируемая при данной длине волокна мышцы в направлении волокон в перистой мышце, будет больше максимальной силы, произведенной в направлении волокон мышцей с параллельными волокнами с той же самой анатомической площадью и объемом. Следует отметить, что архитектура мышц исследована, главным образом, в опытах либо с неупотреблением (*disuse*), либо в условиях опорной разгрузки (постельный режим, "сухая" водная иммерсия) мышечного аппарата, моделирующей микрогравитацию [2, 16, 31], но полностью отсутствуют данные о влиянии реальной микрогравитации.

Вследствие этого цель данного исследования состояла, во-первых, в количественном описании отношений между суставным углом и мышечной архитектурой (длиной и углом наклона волокон МИМ, ЛИМ и КМ у человека в условиях *in vivo*), и, во-вторых, в количественной оценке степени изменения функциональных характеристик ТМГ у человека после продолжительного пребывания в условиях реальной микрогравитации. Было высказано предположение, что существенные структурные изменения в архитектуре (длине и угла наклона волокон) и сократительных функциях антигравитационных мышц связаны из-за уменьшения физической активности.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Протокол эксперимента был одобрен комитетом по биомедицинской этике Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Государственный научный центр РФ – Институт медико-биологических проблем РАН" и медицинским советом Государственного бюджетного учреждения "Научно-исследовательский испытательный центр подготовки космонавтов им. Ю.А. Гагарина" и выполнен в соответствии с Хельсинкской декларацией [33].

Обследуемые

В исследовании приняли участие мужчины-космонавты (n = 3), члены основных экипажей продолжительных космических полетов на Международной космической станции. Длительность космических полетов составляла 175.0 \pm 3 сут.

Ознакомление

Участники эксперимента были подробно проинформированы о целях и методах выполняемых исследований, ознакомлены с их процедурами, рисками и после этого подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Экспериментальный дизайн

Космонавты были проинформированы об экспериментальных процедурах за 50–60 дней до полета. Каждый космонавт выполнил две серии экспериментов за 30 дней до космического полета (сбор исходных данных) и через 3–5 дней после космического полета.

Процедура тестирования и измерения Ультразвуковое сканирование

Мышечная архитектура *in vivo* была исследована с помощью двумерного (2-D) УЗИ с использованием В-режима ультразвуковой системы Edge (модель Edge, SonoSite, Inc., США) электронным линейным датчиком 7.5 МГц и апертурой 60 мм. УЗИ 2-D обычно используется при исследовании мышечной архитектуры [например, 25, 34, 35, 36, 37] и включает прямое измерение угла наклона и длину мышечных волокон (пучков), а также толщину мышцы.

Мышечная архитектура измерялась в условиях *in vivo* в состоянии покоя. Измерения проводились на медицинской кровати в положении обследуемого лежа на животе под углом -6° с анатомическим положением голеностопного сустава, 0.5 длины голени "свисали" с края кровати. Стопа правой конечности обследуемого относительно жестко крепилась к специальной платформе устройства, закрепленного на медицинской кровати, позволяющей пассивно изменять угол в голеностопном суставе в диапазоне от -15° (подошвенное сгибание) до $+30^{\circ}$ (подошвенное разгибание). Визуализация МИМ, ЛИМ и КМ осуществлялась в реальном времени в условиях *in vivo* с использованием В-режима ультразвуковой системы Edge. Для лучшего акустического контакта и для того, чтобы не травмировать кожную поверхность мышцы, сканирующую поверхность датчика покрывали водорастворимым гелем, датчик ориентировали вдоль средне-сагиттальной плоскости мышцы. Датчик был выровнен в плоскости направления мышечного пучка так, чтобы можно было рассматривать всю видимую часть пучков в окне сканирования. Качество УЗИ мышечного пучка достигалось регулировкой усиления по глубине и яркости ультразвукового сигнала. По УЗИ оценивали длину и угол наклона волокон мышц.

УЗИ были получены на уровнях, соответствующих 30% (МИМ и ЛИМ) и 50% (КМ) расстояний между подколенной складкой и центром боковой лодыжки при нейтральном положении голеностопного сустава [38]. Каждый уровень соответствовал максимальной анатомической площади поперечного сечения соответствующей мышцы [39]. На этих уровнях помещался светоотражающий маркер (шириной ~1.2 мм), прикрепленный к коже. Ультразвуковой датчик помещался над маркером, который образовывал линию в окне УЗИ и являлся индикатором того, что датчик во время измерений длины и угла наклона мышечных волокон не смещался. Полученные УЗИ записывались на жесткий диск с формированием файла для дальнейшего анализа.

Визуализация мышц с измерением длины мышечных волокон (*L*_в) и угла их наклона ($\Theta_{\rm B}$) выполнялась после предварительного 20-минутного отдыха на специальной медицинской кровати для уравновешивания жидкостной среды организма [40]. Во время измерений космонавта инструктировали: – "полностью расслабить мышцы конечности".

Длина мышечного волокна ($L_{\rm B}$) определялась как линия между местом прикрепления волокна у поверхностного апоневроза до места вхождения в глубокие слои апоневроза мышцы [29, 31] (рис. 1). Визуализируя по ультрасонограмме пучки по их длине от поверхностного к глубокому апоневрозу, можно проверить правильность сканирования пучка [41], в противном случае длина пучка может быть оценена слишком завышенной, а угол пучка недооценен [29]. Длину пучка оценивали либо путем непосредственного измерения в видимой части окна, либо путем непосредственного измерения в видимой части окна, а затем в невидимой части. При этом ошибка линейной экстраполяции не превышает 2–7% [42].

Угол наклона мышечного волокон ($\Theta_{\rm B}$) определялся как угол, создаваемый линией, проведенной от точки прикрепления волокна у поверхностного слоя апоневроза к месту вхождения волокна в глубокие слои апоневроза и фасцией, отделяющей мышцы [29, 31] (рис. 1).

У каждого обследуемого измерялись параметры трех мышечных пучков. Полученные данные усреднялись и анализировались. Коэффициент вариации трех измерений находился в диапазоне 0-2%. УЗИ ($\Theta_{\rm B}$ и $L_{\rm B}$) обрабатывались с использованием пакета программ (Edge, Sono Site, Inc., США).

Толщина мышцы (ТМ) определялась по формуле:

$$TM = L_B x \sin \Theta_B$$
,

где $L_{\rm B}$ и $\Theta_{\rm B}$ – каждой мышцы определялись ультразвуком.



Рис. 1. Сагиттальные ультразвуковые изображения медиальной икроножной мышцы (МИМ; МG). Ультразвуковой датчик располагался над мышцей на уровне 30%-ного расстояния между подколенной складкой и центром боковой лодыжки. Длину волокна измеряли вдоль ультразвуковой сигнальной линии, проведенной параллельно волокну между глубоким и поверхностным апоневрозами. Угол наклона измеряли как угол, образованный линией, проведенной параллельно мышечному волокну между глубоким и поверхностным апоневрозами. Желтая линия, наложенная на ультразвуковое изображение, показывает путь волокна между поверхностным и глубоким апоневрозами. Представлен угол (Θ_B) наклона и длина (*L*_B) волокна между глубоким и поверхностным апоневрозами.

Верхняя панель - до полета; нижняя панель - после полета.

Fig. 1. Sagittal ultrasound images of the medialis gastrocnemius (MG) head. The ultrasound transducer was placed over the muscle at the level of 30% of the distance between the popliteal fold and the center of the lateral malleolus. The fiber length was measured along an ultrasound signal line drawn parallel to a fiber between the deep and superficial aponeuroses. The pennation angle was measured as an angle of the line drawn parallel to a fiber between the deep and superficial aponeuroses. A yellow line superimposed on the ultrasound image shows the path of a fiber between the superficial and deep aponeuroses. Θ_{f} , *pennation* angle; L_{f} fiber length; SF, subcutaneous fat; MG, medialis gastrocnemius.

Top panel - pre space flight; lower panel - pre space flight.

Измерение сократительных функций

Тендометрическая установка

Экспериментальная установка для регистрации электрически вызванных (непроизвольных) и произвольных сокращений (при волевом участии самого испытуемого) отдельной мышцы (например, ТМГ) у человека в условиях *in situ* была де-



Рис. 2. Экспериментальная установка (*левая панель*, верх) и схема принципа метода тендометрии (*левая панель*, внизу); пример тендограммы развития изометрического одиночного сокращения, электрически вызванного тетанического и произвольного сокращения отдельной мышцы (*правая панель*) с последующей схемой расчета параметров механических ответов мышечного сокращения.

Fig. 2. Experimental set-up and scheme the principle of tendometry method. Examples measurements of mechanical response parameters in isometric twitch contraction curve (*left panel*) and in electrically evoked tetanic tension and voluntary muscle tension development (*right panel*). TPT, a time-to-peak; 1/2 RT, a half-relaxation time; TCT, a total contraction time; P_t, a twitch force.

тально описана ранее [43]. Коротко, обследуемый удобно располагался на специальном стуле в стандартной позиции: угол в тазобедренном, коленном и голеностопном суставах составлял ~90° (рис. 2). Относительно жесткая фиксация бедренного, коленного и голеностопного суставов конечности обеспечивала изометрический режим сокращения мышцы. Позиция стула и фиксирующих устройств суставов конечности при проведении обследования для каждого космонавта подбиралась индивидуально и воспроизводилась при выполнении обследования после завершения космического полета. Все тестирующие процедуры выполнялись на правой конечности космонавта.



Рис. 2. Окончание

Динамометр, представляющий собой стальное кольцо с вмонтированными в него тензодатчиками, плотно прижимался к Ахиллову сухожилию мышцы. Степень давления датчика была постоянной для всех космонавтов и составляла 5 кг. Механическая деформация динамометра при сокращении мышцы преобразовывалась в электрический сигнал и после усиления усилителем (тип АНЧ-7м; СССР) регистрировался на светолучевом осциллографе (тип К-115, СССР).

Протокол испытаний сократительных функций ТМГ был идентичным у всех испытуемых.

Произвольное сокращение

Силовые свойства

Механические параметры произвольных и электрически вызванных сокращений ТМГ оценивали методом тендометрии с использованием тендометрического динамометра индивидуального выпуска [43].

Изометрические одиночные сокращения ТМГ вызывали электрическим раздражением *n. tiblalls*, используя прямоугольные импульсы длительностью 1 мс супрамаксимальной силы от универсального нейро-мышечного электростимулятора (тип ЭСУ-1, СССР) через изолирующую приставку. При тетанической стимуляции *n. tiblalls* использовали частоту 150 имп/с [44, 45].

При выполнении произвольного изометрического сокращения ТМГ космонавта инструктировали, как реагировать на звуковой сигнал "сократить максимально сильно". Космонавту сообщалась величина развиваемой произвольной силы (рис. 2) и разрешался зрительный контроль развиваемого усилия по стрелке динамометра. Каждый космонавт выполнял от 3 до 4 попыток с интервалом отдыха не менее 1 мин, и наибольшая величина принималась за показатель максимальной произвольной силы (МПС).

Скоростно-силовые свойства

При произвольном сокращении ТМГ космонавта тщательно инструктировали, как реагировать на звуковой сигнал — "сократить мышцу максимально быстро и сильно". Регистрируемое произвольное сокращение принимали как "взрывное" баллистическое сокращение (рис. 2). По тендограмме развития "взрывноео" сокращения оценивали время нарастания изометрического напряжения, или иначе относительные градиенты, до 25-, 50- и 75- и 90%-ных уровней от МПС [44, 45]. Точность измерения составляла 2 мс.

Электрически вызванное сокращение

Силовые свойства

Максимальная сила (P_0) сокращения ТМГ (рис. 2) определялась по тендограмме вызванного сокращения в ответ на электрическое тетаническое (частота 150 имп/с) раздражение *n. tibialis* [44, 45]. Общая длительность электрически вызванного сокращения мышцы составляла не более ~0.5 С.

Степень совершенства центрально-нервных координационных механизмов управления произвольным (мышечным) движением определяли по величине силового дефицита ($P_{\rm g}$), рассчитываемой по разнице между $P_{\rm o}$ и МПС, и выраженной в процентах от величины $P_{\rm o}$ [44, 45].

Скоростные свойства

Скоростные свойства ТМГ определяли по тендограмме развития изометрической P_{oc} в ответ на одиночный электрический импульс, приложенный к *n. tibialis* (рис. 2). Рассчитывали время от момента нанесения электрического стимула до пика P_{oc} (время одиночного сокращения — ВОС) и время от пика P_{oc} до половины расслабления (время 1/2 ПР) сокращения. Точность измерения составляла 2 мс.

Скоростно-силовые свойства

По тендограмме развития электрически вызванного сокращения при стимуляции *n. tibialis* с частотой 150 имп/с [44, 45] определяли время нарастания тетанического напряжения до 25-, 50- и 75- и 90%-ных уровней от МПС (рис. 2). Точность измерения составляла 2 мс.

Стимуляция

Для стимуляции *n. tibialis* использовали универсальный нейро-мышечный стимулятор (тип ЭСУ-1, СССР) с изолирующей приставкой. Для раздражения *n. tibialis* использовали монополярный электрод — активный (катод; \emptyset 1 см) устанавливали в подколенной ямке (место наименьшего сопротивления), а пассивный (анод; Ag/AgCl пластина размером 6 × 4 см) на нижней трети передней поверхности бедра. Положение стимулирующих электродов подбирали так, чтобы при некоторой минимальной силе раздражения регистрировать наибольший электромиографический ответ (М-ответ) *m. soleus*. В дальнейшем силу раздражения увеличивали в 1.5— 2 раза, что позволяло получить супрамаксимальную силу раздражения, т.е. сила на 30—40% больше той минимальной силы, при которой впервые достигал максимальный М-ответ.

Регистрация электромиограммы

Электромиограмму регистрировали поверхностными биполярными Ag/AgCl электродами (Ø 8 мм с межэлектродным расстоянием 25 мм и площадью 50 мм²), которые помещали по средней линии брюшка *m. soleus* на уровне ниже 2 см медиальной и латеральной головок икроножной мышцы. Большой земляной электрод (Ag/AgCl пластина размером 7.5 × 6.5 см) помещали в проксимальной части голени между отводящими и раздражающим электродами. Для лучшего электрического контакта с кожей Ag/AgCl электроды заполнялись электродным гелем. Дополнительно для уменьшения межэлектродного импеданса до 5 k Ω поверхность кожи в месте установки Ag/AgCl электродов тщательно обрабатывалась, включая бритье волос, шлифовку кожи абразивной пастой и очистку кожи раствором спирта с эфиром в пропорции 1 : 4 [46]. Для усиления электромиографического сигнала использовали усилитель (тип УБП-1-02, СССР) с выносным катодным повторителем. Усиленный сигнал при стимуляции *n. tibialis* контролировали на экране запоминающего осциллоскопа (тип С8-9А, СССР) и синхронно регистрировали на светолучевом осциллографе (тип K-115, СССР).

Статистика

После проверки нормальности распределения данных с использованием теста Шапиро–Вилка параметрические статистические тесты выполнялись с использованием программного обеспечения. Данные представлены в виде средних значений \pm стандартной ошибки среднего значения. Для определения значимой разницы между средними значениями воспользовались нормированным отклонением *t* Стьюдента–Фишера, уровень *p* < 0.05 был выбран для обозначения статистической значимости. Различия в архитектуре мышц до и после космического полета были проверены с использованием двустороннего дисперсионного анализа. Для оценки воспроизводимости измерений длины и угла наклона пучков (волокон) между тремя сериями был рассчитан коэффициент вариации.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Длина волокон до полета. Степень изменения $L_{\rm B}$ во всех мышцах зависела от положения угла в голеностопном суставе (рис. 3) и была существенной для МИМ и ЛИМ. Так, при увеличении угла в голеностопном суставе с -15° до $+30^{\circ}$ $L_{\rm B}$ МИМ уменьшалась с 45.2 ± 1.2 до 26.1 ± 2.1 мм (p < 0.01), ЛИМ – с 53.1 ± 0.5 до 33.2 ± 1.3 мм (p < 0.01) и КМ – с 39.2 ± 1.2 до 27.2 ± 2.0 мм (p < 0.01), что соответствует относительным изменениям 42.3, 37 и 30.6% соответственно.

Угол наклона волокон до полета. Влияние положения угла в голеностопном суставе на $\Theta_{\rm B}$ было существенным во всех мышцах (рис. 3) и изменение в МИМ было более существенным по сравнению с ЛИМ и КМ. Так, при изменении положения угла в голеностопном суставе с -15° до $+30^{\circ}$ $\Theta_{\rm B}$ МИМ увеличивался на 44.9% (с $31.2^{\circ} \pm 2.1^{\circ}$ до $45.2^{\circ} \pm 2.0^{\circ}$; p < 0.01), ЛИМ — на 31.8% (с $21.4^{\circ} \pm 2.1^{\circ}$ до $28.2^{\circ} \pm 1.6^{\circ}$; p < 0.05) и КМ — на 34.8% (с $24.7^{\circ} \pm 1.4^{\circ}$ до $33.3^{\circ} \pm 2.2^{\circ}$; p < 0.01).

Толщина мышцы до полета. При изменении положения угла в голеностопном суставе с -15° до $+30^{\circ}$ толщина МИМ уменьшалась с 14.5 до 11.2 мм, ЛИМ – с 10.5 до 10.4 мм и КМ – с 14.5 до 14.2 мм, что соответствует относительным изменениям на 22.8, 0.9 и 2.1% соответственно.

Длина волокон после полета. Степень изменения $L_{\rm B}$ во всех мышцах зависела от положения угла голеностопного сустава (рис. 3). Так, после космического полета при изменении положения угла голеностопного сустава с -15° до $+30^{\circ}$ $L_{\rm B}$ МИМ уменьшилась с 26.9 ± 1.7 до 17.8 ± 1.9 мм (p < 0.01), ЛИМ —с 42.7 ± 0.4 до 25.2 ± 2.4 мм



Рис. 3. Изменение длины ($L_{\rm B}$) и угла ($\Theta_{\rm B}$) наклона волокон МИМ (MG), ЛИМ (LG) и KM (SOL), как функция угла в голеностопном суставе под влиянием продолжительного космического полета. *p < 0.05; **p < 0.01. **Fig. 3.** Changes in the fiber length ($L_{\rm f}$) and pennation angle ($\Theta_{\rm f}$) as functions of the ankle joint angle in the MG, LG, and SOL as a result of a long-term SF. MG – medialis gastrocnemius; LG – lateralis gastrocnemius; SOL – soleus *p < 0.05; **p < 0.01.

LG

SOL

MG

(p < 0.01) и KM - с 27.2 \pm 2.3 до 17.2 \pm 1.8 мм (p < 0.01), что соответствует относительным изменениям на 33.8, 41 и 36.8% соответственно.

Угол наклона волокон после полета. Влияние положения угла в голеностопном суставе на $\Theta_{\rm B}$ было существенным во всех мышцах (рис. 3). Так, при изменении положения угла в голеностопном суставе с -15° до $+30^{\circ}$ $\Theta_{\rm B}$ МИМ увеличился с $22.4^{\circ} \pm 1.8^{\circ}$

до $34.2^{\circ} \pm 2.7^{\circ}$ (p < 0.01), ЛИМ – с $13.4^{\circ} \pm 1.4^{\circ}$ до $18.3^{\circ} \pm 2.3^{\circ}$ и КМ — с $19.5^{\circ} \pm 1.3^{\circ}$ до $25.8^{\circ} \pm 1.7^{\circ}$ (p < 0.01), что соответствует относительным изменениям на 61.6, 35.6 и 32.3% соответственно.

Толщина мышцы после полета. При изменении положения угла в голеностопном суставе с -15° до $+30^{\circ}$ толщина МИМ уменьшалась на 42.9% (с 11.9 до 6.8 мм), ЛИМ – на 46.8% (с 7.7 до 4.1 мм) и КМ – на 46.2% (с 9.1 до 4.9 мм).

Силовые свойства. После продолжительного космического полета сила сокращения ТМГ снижалась (p < 0.05). При этом изометрическая P_{oc} уменьшилась в среднем на 7.4%; а МПС – на 25.8% и P_o – на 17.7% (рис. 4).

Величина $P_{\rm g}$, составлявшая в фоновых исследованиях в среднем 27.4 ± 5.0%, после космического полета увеличилась (p < 0.05), достигнув в среднем 35.5 ± 3.8% (рис. 4).

Скоростные свойства. Анализ изменения времени развития P_{oc} после космического полета обнаружил незначительное уменьшение ВОС на 4% и 1/2 ПР – на 9.9%.

Скоростно-силовые свойства. Снижение МПС (на 25.8%) после космического полета сопровождалось существенным замедлением (p < 0.05) времени (обратная величина скорости) развития произвольного изометрического сокращения мышцы во время выполнения "взрывного" произвольного сокращения (рис. 5, верхняя панель). Так, после космического полета время достижения относительного 25-, 50- и 75%-ного уровня от МПС существенно (p < 0.05) увеличилось в среднем на 13.9, 20 и 16.7% соответственно.

При этом анализ данных электрически вызванных сокращений ТМГ не обнаружил существенных различий в скорости развития изометрического напряжения мышцы (рис. 5, нижняя панель).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании мы определяли влияние продолжительного пребывания в условиях реальной микрогравитации на сократительные функции и архитектуру (длину и угол наклона волокон) ТМГ у человека в условиях *in vivo* и попытались связать изменения между функцией и архитектурой мышцы. Архитектура мышцы вместе с ее внутренними свойствами, такими как состав волокон, затрагивает функциональные характеристики мышцы (например, максимальную силу и скорость укорочения) [47, 48].

Это первое исследование, с количественной оценкой степени изменений внутренней архитектуры разных головок ТМГ (МИМ, ЛИМ и КМ) у человека в условиях *in vivo* в покое и после продолжительного космического полета. Настоящее исследование показало существенное реконструирование архитектуры и функций ТМГ, вызванное длительным пребыванием в условиях микрогравитации, и является первым исследованием, где одновременно использовали определение угла наклона и длину мышечных волокон (ультразвуковая визуализация) как главных детерминантов механической генерации мышцы. Настоящее исследование об изменении внутренней архитектуры мышцы можно рассматривать как уникальное, так как продолжительность разгрузки составила 180 сут., а многие предыдущие сообщения базировались лишь на исследованиях, полученных в модельных условиях [2, 16, 31, 49].

Основным результатом настоящего исследования было снижение величины МПС (-26%) ТМГ после 180-суточного пребывания в условиях реальной микрогравитации. Изменение в функциях мышцы под воздействием внешних условий может быть обусловлено либо изменениями в сократительных процессах, либо в нервной (моторной) команде. Действительно, на показатель МПС влияют такие факторы как связь сила-длина волокон мышцы, геометрическое расположение



Рис. 4. Изменение силы одиночного сокращения (P_{oc} ; P_t), максимальной произвольной силы (МПС; MVC), максимальной электрически вызванной тетанической силы сокращения (P_o ; частота 150 имп/с) (*верхняя панель*) и силового дефицита (P_d) ТМГ (*нижняя панель*) под влиянием продолжительного космического полета. * p < 0.05; ** p < 0.01.

Fig. 4. The effect of a long-duration space flight on the maximal twitch response of force (P_t), maximal voluntary contraction (MVC), and evoked electrical tetanic stimulation at a frequency of 150 impulses × s⁻¹ (P_o) (*top panel*) and force deficiency (P_d) (*bottom panel*) of the triceps surae muscle. MG – medialis gastrocnemius; LG – lateralis gastrocnemius; SOL – soleus * p < 0.05; **p < 0.01.





Fig. 5. Average curves showing the development of force while executing explosive voluntary contraction (*top panel*) and as a result of electrical stimulation at 150 impulses $\times \text{ s}^{-1}$ (*lower panel*). **p < 0.05 **p < 0.01.

мышцы относительно ее сустава и архитектурные характеристики мышцы. Однако, поскольку большинство мышц у человека перистые, то правильная интерпретация функциональных перестроек вследствие разгрузки мышечного аппарата должна учитывать изменения во внутренней организации мышцы, известной как архитектура мышцы [28–30]. На изменение в способности генерировать силу мышц больше влияют различия в их внутренней архитектуре, чем в составе волокон [50, 51].

Попытки определить архитектуру мышц у человека ранее предпринимались, и в основном они базировались на исследованиях образцов бальзамированных препаратов [52]. Однако данные относительно архитектуры бальзамированных мышц человека не отражают истинных размеров волокон в условиях in vivo или in situ. Действительно, используя магнитно-резонансную томографию [41] и ультразвуковую визуализацию [23, 25] в исследовании степени изменения в условиях in vivo геометрических показателей, т.е. длины и угла наклона волокна [24, 35], было показано, что геометрия волокон сильно изменчива. Кроме того, угол наклона изменяется обратно пропорционально как функция длины волокна мышцы и пропорционально как функция изометрической силы, произведенной мышцей так, чтобы объем волокна мышцы сохранялся постоянным при различных длинах и сократительных фазах. Различия углов наклона для мышц человека между состоянием покоя и максимальными изометрическими сокращениями при данном суставном угле составляет порядка 120–170% [53, 54]. Поэтому отказ учитывать влияние сокращения мышцы на угол наклона волокон может быть источником серьезной ошибки [55], что указывает на важность анализа изменений особенностей механики сокращения перистых мышц и разработке неинвазивных методов определения архитектуры мышц у человека.

Поэтому глубокое понимание мышечной архитектуры действительно имеет фундаментальное значение при интерпретации вызванных разгрузкой изменений в функции мышц, учитывая ее ключевую роль в качестве детерминанта механических свойств мышц [26–28], и важно для повышения эффективности кинематики движения человека. Уменьшение длины волокна и увеличение угла наклона с увеличением длины мышцы можно рассматривать как фактор при объяснении "*слабости*" мышечной ткани [56]. В настоящем исследовании уменьшение длины волокон при пассивном подошвенном сгибании от -15° до $+30^{\circ}$ предполагает, что волокна мышцы стали прогрессивно "слабыми" с увеличивающимися углами в голеностопном суставе. Интересно, что после космического полета длина и угол наклона волокон уменьшались, но в большей степени изменилась длина волокон.

Лишь с развитием ультразвуковой технологии, совершенствования ультразвукового оборудования и разработкой В-режима ультразвукового сканирования появился альтернативный метод для получения количественной и качественной информации в реальном времени о мышечной архитектуре (длина и угол наклона волокон) живых мышц человека в условиях *in vivo* [20, 22–25]. В настоящем исследовании, используя эту технику, нами впервые предпринята попытка определить степень изменения архитектурных характеристик разных головок ТМГ у человека после продолжительного космического полета.

МИМ характеризуется более короткими длинами волокон и большими углами, что позволяет упаковать больше волокон и, следовательно, имеет больший потенциал в генерации силы. Наоборот, ЛИМ имеет самые большие длины волокон в ТМГ, соответственно, число саркомеров в мышце будет наибольшим, обеспечивая высокий скоростной потенциал [57, 58]. Эти результаты подтверждаются данными о том, что физиологическая площадь поперечного сечения МИМ в 2.5 раза больше, чем ЛИМ, тогда как различие в объеме мышцы только в 1.7 раза [39]. Максимальная скорость сокращения мышцы зависит от композиции (типа) волокон [59]. Однако, поскольку состав волокон МИМ и ЛИМ аналогичен [60], то различия в максимальной скорости укорочения и максимальной силе преимущественно определяется их архитектурными свойствами.

Пребывание в условиях микрогравитации привело к заметному уменьшению длины и угла наклона волокон и толщины КМ. Кроме того, "*флексорное*" положение космонавта в условиях реальной микрогравитации [61] создавало голеностопному суставу немного подошвенно-согнутое положение, что, возможно, усиливало наблюдаемый эффект и, возможно, внесло вклад в уменьшение длины волокон.

После космического полета, уменьшение длины и угла наклона мышечных волокон предполагает потерю не только последовательно, но и параллельно расположенных саркомеров соответственно. Это наблюдение согласуется с предыдущими результатами в условиях неупотребления мышцы [3]. Потеря включенных последовательно расположенных саркомеров подразумевает, что рабочий диапазон каждого саркомера становится слишком большим. Когда рабочий диапазон каждого саркомера становится больше 3.65 мк, то актин и миозин не могут взаимодействовать [62]. Функциональным последствием уменьшения длины волокон мышцы будет снижение количества образований поперечных мостиков и, как следствие этого, уменьшение МПС.

Изменение числа последовательно расположенных саркомеров может затронуть и угол наклона волокон, при котором волокна мышцы укорачиваются во время сокращения [3]. Наблюдаемый меньший угол наклона мышечных волокон после космического полета, по-видимому, частично компенсирует потерю силы из-за более эффективной передачи силы к сухожилию, несмотря на снижение жесткости МСК, как ранее было показано у космонавтов после космического полета и у испытуемых после пребывания в условиях, моделирующих микрогравитацию [2, 63, 64]. Уменьшение жесткости МСК после космического полета может означать, что лля генерации продукции любого уровня мышечной силы, деформация сухожилия будет значительно большей после космического полета. Уменьшенная жесткость сухожилия приведет к изменению отношения длина-напряжение от оптимальной длины в зоне этого отношения, что вызовет уменьшение активного напряжения для этих саркомеров, вследствие этого сила сокращения мышцы в целом будет снижена. Это указывает на то, что адаптационные изменения, происходящие в мышце и МСК, к условиям разгрузки мышечного аппарата при продолжительной микрогравитации, компенсируют друг друга, чтобы поддержать постоянным функциональный диапазон мышцы.

Данные, полученные в настоящем исследовании, показывают, что архитектура разных головок ТМГ значительно отличается, отражая, возможно, их функциональные свойства. Результаты свидетельствуют о том, что мышцы с различными функциональными свойствами могут по-разному отвечать на разгрузку, это должно быть принято во внимание в программах реабилитации после любого вида разгрузки. Эти выводы имеют важное клиническое значение для восстановления опорно-двигательного аппарата после разгрузки на Земле и в условиях микрогравитации. Рекомендуется, чтобы сухожилию, помимо мышц, уделялось большее внимание во время реабилитации, которая предпочтительно должна начинаться в течение первых двух недель после возвращения на Землю.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты, представленные в настоящем исследовании, во-первых, указывают, на то, что метод ультрасонографии можно использовать для оценки степени изменения архитектуры мышц в условиях *in vivo* и, во-вторых, дают представление о функционировании мышечных волокон человека в условиях *in vivo*, а также о взаимодействии между ними. Продолжительное пребывание в условиях реальной микрогравитации приводит к изменению внутренней архитектуры ТМГ (угла наклона и длины мышечного волокна) и снижению сократительных функций мышцы. Архитектура разных головок ТМГ значительно отличается, отражая, возможно, их функциональные роли. Изменение длины и угла наклона волокон между мышцами, как в исходном состоянии, так и особенно после пребывания в условиях продолжительной микрогравитации, могут быть связаны с различиями в способности продуцировать силу мышцы и упругих, эластических характеристик сухожилий и апоневрозов.

Результаты данного исследования ясно показывают, что архитектура мышечных волокон в условиях покоя значительно отличается от архитектуры мышц после пребывания в условиях продолжительной микрогравитации. До настоящего времени данные архитектуры мышц были получены, главным образом, на фрагментах бальзамированных мышц. Однако данные, полученные при исследовании бальзамированных мышц человека, могут внести неточные, а в некоторых случаях даже ошибочные результаты.

Таким образом, метод ультразвукового сканирования мышц является высокоинформативным и доступным методом оценки архитектуры скелетных мышц человека *in vivo* после пребывания в условиях продолжительной микрогравитации и может быть использован в комплексе с другими методами для оценки функционального состояния мышц и для изучения механизмов, ответственных за изменения функций под влиянием различных факторов.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Автор выражает благодарность медицинскому и инженерному штату и руководству Центра подготовки космонавтов им. Ю.А. Гагарина (Звездный городок, Московский регион) за их вклад в организацию исследования, а также всем сотрудникам, которые помогали в осуществлении нашего исследования.

Особую благодарность выражаю Инесе Бенедиктовне Козловской (посмертно) за постоянную поддержку в проведении новаторских исследований, доброжелательность, полезные советы при обсуждении результатов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской академии наук (грант 63.1).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Нет никаких финансовых, личных и коммерческих отношений между автором рукописи и другими людьми или организациями, которые могли бы ненадлежащим образом предвзято влиять на эту работу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gopalakrishnan R., Gencenc K.O., Rice A.J., Lee S.M.C., Evans H.J., Maender C.C., Ilaslan H., Cavanagh P.R. Muscle volume, strength, endurance, and exercise loads during 6-month missions in space. Aviat. Space Environ. Med. 81: 91–102. 2010.
- 2. *Kubo K., Akima H., Kouzaki M., Ito M., Kawakami Y., Kanehisa H., Fukunaga T.* Changes in the elastic properties of tendon structures following 20 days bed rest in humans. Eur. J. App. Physiol. 83: 463–468. 2000.
- 3. Narici M.V., Cerretelli P. Changes in human skeletal muscle architecture induced by disuse atrophy. J. Physiol. 506: 59. 1998.
- 4. *Berg H.E., Larsson L., Tesch P.A.* Lower limb skeletal muscle function after 6 weeks of bed rest. J. Appl. Physiol. 82: 182–188. 1997.
- 5. *Koryak Yu.A.* Influence of simulated microgravity on mechanical properties in the human triceps surae muscle in vivo. I: Effect of 120 days of bed-rest without physical training on human muscle musculo-tendinous stiffness and contractile properties in young women. Eur. J. Appl. Physiol. 114: 1025–1036. 2014.
- 6. *Akima H., Kubo K., Imai M., Kanehisa H., Suzuki Y., Gunji A., Fukunaga T.* Inactivity and muscle: effect of resistance training during bed rest on muscle size in the lower limb. Acta Physiol. Scand. 172: 269–278. 2001.
- Григорьева Л.Г., Козловская И.Б. Влияние невесомости и гипокинезии на скоростно-силовые свойства мышц человека. Космич. биол. и авиакосмич. мед. 21(1): 27–30. 1987

[*Grigor'eva L.S., Kozlovskaya I.B.* Effect of microgravity and hypokinesia on the strength-velocity properties of human muscles. Kosm. Biol. Aviakosm. Med. 21. 27–30. 1987. (In Russ)].

- 8. Akima H., Foley J.M., Prior B.M., Dudley G.A., Meyer R.A. Vastus lateralis fatigue alters recruitment of musculus quadriceps femoris in humans. J. Appl. Physiol. 92: 679–684. 2002.
- Kozlovskaya I.B. In: Neurophysiological effects caused by short-and long-term exposures to microgravity. Aerospace Sci. Ed. Yajima K. Tokyo. Nihon Univer. 145–150. 1991.
- 10. LeBlanc A., Gogia P., Schneider V., Krebs J., Schonfeld E., Rvans H. Calf muscle area and strength changes after five weeks of horizontal bed rest. Am. J. Sp. Med. 16: 624–629. 1988.
- 11. Alkner B.A., Tesch P.A. Efficacy of a gravity-independent resistance exercise device as a countermeasure to muscle atrophy during 29-day bed rest. Acta Physiol. Scand. 181: 345–357. 2004.
- 12. Loram I.D., Maganaris C.N., Lakie M. Paradoxical muscle movement in human standing. J. Physiol. 556: 683-689. 2004.
- Stapley P., Pozzo T., Grishin A., Papaxanthis C. Investigating centre of mass stabilisation as the goal of posture and movement coordination during human whole body reaching. Biol. Cybern. 82: 161–172. 2000.
- 14. Sarabon N., Stefan L., Jan C., Milan S., Helmut K. Strength training in elderly people improves static balance: a randomized controlled trial. Eur. J. Transl. Myol. Basic Appl. Myol. 23: 85–89. 2013.
- 15. Friedrich J.A., Brand R.A. Muscle fiber architecture in the human lower limb. J. Biotech. 23: 91–95. 1990.
- 16. Kawakami Y., Akima H., Kubo K., Muraoka Y., Hasegawa H., Kouzaki M., Imai M., Suzuki Y., Gunji A., Kanehisa H., Fukunaga T. Changes in muscle size, architecture, and neural activation after 20 days of bed rest with and without resistance exercise. Eur. J. Appl. Physiol. 84: 7–12. 2001.
- 17. *Rugg S.G., Gregor R.J., Mandelbaum B.R., Chiu L.* In vivo moment arm calculations at the ankle using magnetic resonance imaging (MRI). J. Biomech. 23: 495–501. 1990.
- Kawakami Y., Nakazawa K., Fujimoto T., Nozaki D., Miyashita M., Fukunaga T. Specific tension of elbow flexor and extensor muscles based on magnetic resonance imaging. Eur. J. Appl. Physiol. 68: 139–147. 1994.
- 19. Anderson D.E., Bean J.F., Holt N.E., Keel J.C., Bouxsein M.L. Computed tomography-based muscle attenuation and electrical impedance myography as indicators of trunk muscle strength independent of muscle size in older adults. Am. J. Phys. Med. Rehabil. 93: 553–561. 2014.
- 20. Hiraoka A., Aibiki T., Okudaira T., Toshimori A., Kawamura T., Nakahara H., Suga Y., Azemoto N., Miyata H., Miyamoto Y., Ninomiya T., Hirooka M., Abe M., Matsuura B., Hiasa Y., Michitaka K. Muscle atrophy as pre-sarcopenia in Japanese patients with chronic liver disease: computed tomography is useful for evaluation. J. Gastroenterol. 50: 1206–1213. 2015.
- 21. *Rutherford O.M., Jones D.A.* Measurement of fibre pennation using ultrasound in the human quadriceps in vivo. Eur. J. Appl. Physiol. 65: 433–437. 1992.
- 22. *Kuno S., Fukunaga T.* Measurement of muscle fibre displacement during contraction by realtime ultrasonography in humans. Eur. J. Appl. Physiol. 70: 45–48. 1995.
- 23. Narici M.V., Hoppeler H., Kayser B., Landoni L., Classen H., Gavardi C., Conti M., Ceretelli P. Human quadriceps cross-sectional area, torque and neural activation during 6 months strength training. Acta Physiol. Scand. 157: 175–186. 1996.
- 24. *Kawakami Y., Abe T., Fukunaga T.* Muscle-fiber pennation angles are greater in hypertrophied than in normal muscles. J. Appl. Physiol. 74: 2740–2744. 1993.
- 25. Kawakami Y., Abe T., Kuno S.Y., Fukunaga T. Training-induced changes in muscle architecture and specific tension. Eur. J. Appl. Physiol. 72: 37–43. 1995.
- 26. *Gans C., Bock W.J.* The functional significance of muscle architecture a theoretical analysis Ergeb. Anat, Entwicklungsgesch. 38: 115–142. 1965.
- 27. Gans C. Fiber architecture and muscle function. Exerc. Sport Sci. Rev. 10: 160–207. 1982.
- 28. Gans C., Gaunt A.S. Muscle architecture in relation to function. J. Biomech. 24. 53-65. 1991.
- 29. Fukunaga T., Ichinose Y., Ito M., Kawakami Y., Fukashiro S. Determination of fascicle length and pennation in a contracting human muscle in vivo. J. Appl. Physiol. 82: 354–358. 1997.
- 30. *Muhl Z.F.* Active length-tension relation and the effect of muscle pennation on fiber lengthening. J. Morphol. 173: 285–292. 1982.
- 31. Коряк Ю.А., Кузьмина М.М., Бережинский И.В., Коваленко В.М. Продолжительная электромиостимуляционная тренировка мышц у человека в условиях механической разгрузки двигательного аппарата и ее влияние на архитектуру и функцию трехглавой мышцы голени. Фундамент. исслед. 3: 69–87. 2010. [Koryak Yu.A., Kuz'mina M.M., Berezhinsky I.V., Kovalenko V.M. Long-term electromyostimulation training of muscles in a man in the conditions of mechanical unloading of the muscular apparatus and its influence on the architecture and function of the human triceps surae muscle. Fundament. Res. 3: 69–87. 2010. [In Russ)].
- Maganaris C.N., Baltzopoulos V., Sargeant A.J. Changes in Achilles tendon moment arm from rest to maximum isometric plantarflexion: in vivo observations in man. J. Physiol. 510: 977–985. 1998.
- 33. Хельсинкская Декларация Всемирной медицинской ассоциации. 1964. [WMA Declaration of Helsinki Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. 1964].

- 34. Aagaard P., Andersen J.L., Dyhre-Poulsen P., Leffers A.M., Wagner A., Magnusson S.P., Halkjaer-Kristensen J., Simonsen E.B. A mechanism for increased contractile strength of human pennate muscle in response to strength training: changes in muscle architecture. J. Physiol. 534(2): 613–623. 2001.
- 35. *Blazevich A.J., Gill N.D., Bronks R., Newton R.U.* Training-specific muscle architecture adaptation after 5-wk concurrent training in athletes. Med. Sci. Sports Exerc. 35: 2013–2022. 2003.
- Kanehisa H., Muraoka Y., Kawakami Y., Fukunaga T. Fascicle arrangements of vastus lateralis and gastrocnemius muscles in highly trained soccer players and swimmers of both genders. Int. J. Sports Med. 24: 90–95. 2003.
- Kubo K., Kanehisa H., Azuma K., Ishizu M., Kuno S.Y., Okada M., Fukunaga T. Muscle architectural characteristics in young and elderly men and women. Int. J. Sports Med. 24: 125–130. 2003.
- Kawakami Y., Ichinose Y., Fukunaga T. Architectural and functional features of human triceps surae muscles during contraction. J. Appl. Physiol. 85: 398–404. 1998.
- Fukunaga T. Roy R.R., Shellock F.G., Hodgson J.A., Day M.K., Lee P.L., Kwong-Fu H., Edgerton V.R. Physiological cross-sectional area of human leg muscles based on magnetic resonance imaging. J. Orthop. Res. 10: 926–934. 1992.
- 40. Berg H.E., Tedner B., Tesch P.A. Changes in lower limb muscle cross-sectional area and tissue fluid volume after transition from standing to supine. Acta Physiol. Scand. 148: 379–385. 1993.
- 41. *Scott S.J., Engstrom C.M., Loeb G.E.* Morphometry of human thigh muscles: determination of fascicle architecture by magnetic resonance imaging. J. Anat. 182: 249–257. 1993.
- 42. *Finni T., Hodgson J.A., Lai A.M., Edgerton V.R., Sinha S.* Nonuniform strain of human soleus aponeurosis-tendon complex during submaximal voluntary contractions in vivo. J. Appl. Physiol. 95: 829–837. 2003.
- 43. Коц Я.М., Абсалямов Т.М., Зорин В.П., Коряк Ю.А., Кузнецова С.П., Син Л.Д. Модификация тендометрического метода измерения силы сокращения отдельных мышц у человека. Физиология человека. 2: 1045–1048. 1976. [Kots Ya.M., Absalyamov T.M., Zorin V.P., Koryak Yu.A., Kuznetsov S.P., Sin L.D. Modification of the tendometric method to measure the force contraction for individual human muscles. Human Physiology. 2: 1045–1048. 1976. [In Russ)].
- 44. Коряк Ю.А. Адаптация скелетных мышц к изменению нагрузки. Экспериментальное исследование. LAP LAMBERT Acad. Publisahid. GmbH & Co. KG Germany. 2011. [Koryak Yu.A. Adaptation of the skeletal muscles to the load change. Ed. House Acad. Natural History 2012. (In Russ)].
- 45. Коряк Ю.А. Нервно-мышечная адаптация к кратковременным и продолжительным космическим полетам человека. ИМБП РАН. Российский сегмент. М. (*Григорьев А.И., Ушаков И.Б.*, ред.) 2: 93–123. 2011. [Koryak Yu.A. Neuromuscular adaptation to short-term and long-duration space flights. ISS, RAS IBMP. Russia segment. M (*Grigor'ev A.I., Ushakov I.B.*, eds.): 93–123. 2011. (In Russ)].
- 46. Водолазский Л.А., Мойкин Ю.В. Методика изучения рабочих движений в производственных условиях. Методы физиол. исследований труд. процессов. М. Наука. 1960. [Vodolazsky L.A., Moikin Yu.V. Methds for studying work movements in a production environment. Methods of physiological studies of work processes. M. Nauka. 1960. (In Russ)].
- 47. Powell P., Roy R.R., Kanim P., Bello M.A., Edgerton V.R. Predictability of skeletal muscle tension from architectural determinations in guinea pig hind-limbs. J. Appl. Physiol. 57: 1715–1721. 1984.
- De Boer M.D., Maganaris C.N., Seynnes O.R., Rennie M.J., Narici M.V. Time course of muscular, neural and tendinous adaptations to 23 day unilateral lower-limb suspension in young men. J. Physiol. 583:1079–1091. 2007.
- 49. *Reeves N.D., Maganaris C.N., Ferretti G., Narici M.V.* Influence of 90-day simulated microgravity on human tendon mechanical properties and the effect of resistive countermeasures. J. Appl. Physiol. 98: 2278–2286. 2005.
- 50. Bodine S.C., Roy R.R., Meadows D.A., Zernicke R.F., Sacks R.D., Fonrnier M, Edgerton V.R. Architectural, histochemical, and contractile characteristics of a unique biarticular muscle: the cat semitendinosus. J. Neurophysiol. 48: 192–201. 1982.
- 51. Burkholder T.J., Fingado B., Baron S., Lieber R.L. Relationship between muscle fiber types and sizes and muscle architectural properties in the mouse hindlimb. J. Morphol. 221: 177–190. 1994.
- 52. Friedrich J.A., Brand R.A. Muscle fiber architecture in the human lower limb. J. Biotech. 23: 91–95. 1990.
- 53. *Herbert R.T., Gandevia S.C.* Changes in pennation with joint angle and muscl torque: In vivo measurements in human brachialis muscle. J. Physiol. 482: 523–532. 1995.
- Narici M.V., Binzoni T., Hiltbrand E., Fasel J., Terrier F., Cerretelli P. In vivo human gastrocnemius architecture with joint angle at rest and during graded isometric contraction. J. Physiol. 496: 287–297. 1996.
- 55. Maganaris C.N., Baltzopoulos V., Sargeant A.J. In vivo measurements of the triceps surae architecture in man: implications for muscle function. J. Physiol 512: 604–613. 1998.
- 56. *Alexander R.McN*. Animal Mechanics. Lecturer in Zoology at the University College of North Wates, Bangor. London. Sidgwick & Jackson. 1976.
- 57. *Huijing P.A.* Architecture of the human gastrocnemius muscle and some functional consequences. Acta Anat. 123: 101–107. 1985.

- Wickiewicz T.L., Roy R.R., Powell P.L., Edgerton V.R. Muscle architecture of the human lower limb. Clin. Orthop. 179: 275–283. 1983.
- Spector S.A., Gardiner P.F., Zernicke R.F., Roy R.R., Edgerton V.R. Muscle architecture and force-velocity characteristics of cat soleus and medial gastrocnemius: implications for motor control. J. Neurophysiol. 44: 951–960. 1980.
- 60. Johnson M.A., Polgar J., Weightman D., Appleton D. Data oπ the distribution of fibre types in thirty-six human muscles: an autopsy study. J. Neurol. Sci. 18: 111-129. 1973.
- Clément G., Gurfinkel V.S., Lestienne F. Mechanisms of posture maintenance in weightlessness. Vestibular and Visual Control on Posture and Locomotor Equilibrum (Black I, ed.). Karger. Basel. Switzerland: 158–163. 1985.
- 62. Gordon A.M., Huxley A.F., Jullian F.J. The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres. J. Physiol.184. 170–192.1966.
- 63. *Koryak Yu.A.* Influence of long-term space flight on mechanical properties of the human triceps surae muscle: electromechanical delay and musculo-tendinous stiffness. J. Skeletal Muscle. 1(1): 1–10. 2017.
- 64. *Koryak Yu.A.* Influence of simulated microgravity on mechanical properties in the human triceps surae muscle *in vivo*. II: Effect of 120 days of bed-rest with physical training on human muscle musculo-tendinous stiffness and contractile properties in young women. Central Eur. J. Sport Med. 11: 125–143. 2015.

Influence of Real Microgravity on Human Skeletal Muscle Architecture and Mechanical Properties

Yu. A. Koryak*

State Scientific Center of the Russian Federation — Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia *e-mail: yurikoryak@mail.ru

The aim of this study was to quantitatively describe the relationships between joint angles and muscle architecture [lengths (L_f) and angles (Θ_f) of fascicles] of human triceps surae [medial (MG) and lateral (LG) gastrocnemius and soleus (SOL) muscles] *in vivo* for three cosmonaut after of prolonged exposure to microgravity (μ G). Sagittal sonographs of MG, LG, SOL were taken at ankle was positioned at 15° (dorsiflexion), 0° (neutral position), +15°, and +30° (plantarflexion), with the knee at 90° at rest and after μ G. At each position, longitudinal ultrasonic images of the MG and LG and SOL were obtained while the cosmonauts was relaxed from which L_f and Θ_f with respect to the aponeuroses were determined. After μ G plantarflexor force declined (26%). In the passive condition, L_f changed from 45, 53, and 39 mm (knee, 0°, ankle, -15°) to 26, 33, and 28 mm (knee, 90° ankle, 30°) for MG, LG, and SOL, respectively. Different L_f and Θ_f , and their changes by contraction, might be related to differences in force-producing capabilities of the muscles and elastic characteristics of tendons and aponeuroses. The three heads of the triceps surae muscle substantially differ in architecture, which probably reflects their functional roles.

Keywords: ultrasonography, space flight, skeletal muscle, voluntary contractions, lengths and angles of fascicles

ЦИТИРОВАТЬ:

Коряк Ю.А. Влияние реальной микрогравитации на мышечную архитектуру и функцию скелетной мышцы человека. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(9): 1144–1162. DOI: 10.31857/S0869813920090034

TO CITE THIS ARTICLE:

Koryak Yu.A. Influence of Real Microgravity on Human Skeletal Muscle Architecture and Mechanical Properties. Russian Journal of Physiology. 106(9): 1144–1162. DOI: 10.31857/S0869813920090034 РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 9, с. 1163–1169

— МЕТОДИЧЕСКИЕ СТАТЬИ —

СПОСОБ СОЗДАНИЯ НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ ПРОСТОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ, ОБЛАДАЮЩЕЙ РЕВЕРБЕРАЦИЕЙ

© 2020 г. С. С. Сергеева^{1, *}, О. С. Сотников¹, Н. М. Парамонова^{2, 3}

¹Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия ²Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия ³Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия *E-mail: sveta.serga@yandex.ru

> Поступила в редакцию 05.02.2020 г. После доработки 30.05.2020 г. Принята к публикации 30.05.2020 г.

Впервые показано, что 60-минутное воздействие 0.4%-ного раствора проназы на нервный ганглий брюшного мозга медицинской пиявки вызывает разрушение глиальных оболочек, сближение нейритов и образование щелевых мембранных контактов между нервными отростками в нейропиле. Действие проназы приводит к созданию экспериментальной модели простой нервной системы, нервные клетки которой обладают частотной реверберационной активностью. Показано, что основой для возникновения реверберации возбуждения в нервной системе могут служить плотные мембранные контакты – электрические синапсы.

Ключевые слова: глиальный протеолиз, проназа, реверберация возбуждения, щелевые мембранные контакты, электрические синапсы, медицинская пиявка

DOI: 10.31857/S0869813920080075

В настоящее время электрические синапсы между нейронами выявлены почти в каждой структуре мозга млекопитающих [см. обзоры 1-3]. Тем не менее, их функциональная роль и физиологическое значение, в том числе при их интеграции с химическими синапсами, остаются до сих пор непонятыми [4, 5]. Появление более простого объекта (по типу простых нервных систем) для исследования функционального вклада электрических синапсов в интегративные процессы, несомненно, будет полезным. Показано, что протеазы не изменяют амплитудные и кинетические характеристики нервных клеток [6]. Их действие, в первую очередь, вызывает разрушение глиальных клеток и оболочек, что в специальных условиях может привести к формированию межклеточных плотных и щелевых контактов между отдельными нейронами [7]. Известно, что нейроны пиявки в культуре ткани при отсутствии глии способны образовывать электрические синапсы, не наблюдаемые в норме [8], а наличие экспрессии иннексинов Hm-inx в нейронах предполагает такую возможность [9–11]. Нейроны, соединенные в мозге возникшими de novo щелевыми контактами — электрическими синапсами, несомненно, должны обладать особой электрической активностью. Графическая модель продемонстрировала, что трех электрических синапсов достаточно для того, чтобы получить эффект реверберации [12].

Целью настоящего исследования явилось доказательство того, что с помощью мягкого воздействия проназы на нервный ганглий брюшной нервной цепочки медицинской пиявки можно, разрушив глиальное окружение нейронов, сформировать нервную сеть, клетки которой будут обладать импульсной активностью реверберационного типа.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования

Объектом исследования служил нервный ганглий медицинской пиявки *Hirudo medicinalis*. Животные были специально выращены на "КНМ Биофабрика", Санкт-Петербург. Пиявок наркотизировали в холодной воде, вскрывали с брюшной стороны, извлекали второй от головного ганглий и помещали его в пластиковую камеру, заполненную раствором Рингера для пиявки: (мМ) 130 NaCl, 4 KCl, 1.8 CaCl₂, 48 глюкоза, рН 7.4. У ганглия вскрывали соединительнотканную оболочку и прикалывали его на резиновой подложке. Для разрушения соединительнотканных и глиальных оболочек, окружающих нервные клетки, в течение 10–60 мин действовали на ганглий раствором проназы (использовали лиофилизированную проназу из *Streptomyces grisens*, Serva). Затем препарат отмывали от проназы физиологическим раствором.

В ряде экспериментов (n = 6) ганглии брали на электронномикроскопическое исследование. Для электрофизиологических экпериментов нервные клетки в ганглии (n = 10) подкрашивали 0.01%-ным раствором нейтрального красного, в результате чего на поверхности ганглия становились видны два крупных нейрона Ретциуса (HP). Одна из этих клеток служила объектом для электрофизиологического исследования.

Исследование проводилось в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациям этического комитета Института физиологии им. И.П. Павлова, протокол № 26/12 от 26 декабря 2019 г. на разрешение публикации данного исследования.

Методика электронномикроскопического исследования

Для электронномикроскопического исследования нервные ганглии фиксировали в течение 1 ч в 2.5%-ном растворе глютарового альдегида (glutaraldehyde, Acros Organics, США), затем в 1%-ном растворе охлажденной четырехокиси осмия (osmium tetroxide, Sigma-Aldrich, Германия). После дегидратации в растворах этилового спирта восходящей концентрации заливали в смесь аралдитов. Ультратонкие срезы готовили на ультратоме LKB-5 (Швеция) и окрашивали методом тройного контрастирования по Рейнгольдсу. Просмотр и фотосъемку проводили на электронном микроскопе FEI Tecnai G^2 Spirit BioTWIN (Нидерланды) при напряжении 80 кВ. Негативы сканировали в просвечивающем режиме с помощью сканера ИМАХ Astra 4000 V.

Методика электрофизиологического исследования

Импульсную активность HP изучали внеклеточным методом. Экстраклеточный отводящий золотой микроэлектрод в стеклянной изоляции подводили к одному из нейронов под контролем микроскопа MБС-10. Регистрировали частоту спонтанной импульсной активности, амплитуду и длительность спайка. Электрический ответ HP визуально анализировали на осциллографах: C1-93 (Россия), цифровом осциллографе GDS-806S (GW Instek, Тайвань), записывали и сохраняли на компьютере. Для анализа электрической активности использовали программу-приложение к цифровому осциллографу GDS-806S Free Capture V2.05 и оригинальное программное обеспечение. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2003. Вычисляли среднее арифметическое, ошибку среднего арифметического, используя однофакторный дисперсионный анализ, определяли достоверность различия (*p*).
1165



Рис. 1. Отростки глиальных клеток мозга пиявки в норме и после действия проназы.

A — нейриты, покрытые глиальной оболочкой (в норме); B — глиальные отростки наружной оболочки ганглия после воздействия проназы; C — овальные фрагменты ретрагирующих глиальных отростков (стрелки), после их диссоциации и ретракции при обработке проназой; 1 — глия, покрывающая отдельные нейриты и пучки нервных отростков; 2 — глиоцит. Электронная микроскопия. Увеличение 10000. **Fig. 1.** The processes of glial leech brain cells are normal and after pronase action.

A – neurites coated with a glial membrane (normal); B – glial processes of the outer shell of the ganglion after exposure to pronase; C – oval fragments of retracting glial processes (arrows), after their dissociation and retraction when treated with pronase; 1 – glia, covering individual neurites and bundles of nerve processes; 2 – gliocyte. Electron microscopy. SW 10.000.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Электронномикроскопические данные

В ганглии пиявки в норме глиоциты окружают отдельные волокна и целые пучки волокон (рис. 1*A*). После обработки мозга пиявки проназой глия диссоциирует на отдельные ретрагирующие фрагменты, контактирующие друг с другом. Но меж-



Рис. 2. Межклеточные щелевые контакты после действия 0.4%-ного раствора проназы.

A — контакт с изменяющимися размерами межклеточной щели; B — плотный агрегат сближающихся мембран щелевого контакта; C — парные щелевые контакты; 1 — область соединения коннексонов двух сближенных мембран электрического синапса; 2 — межклеточная щель; 3 — внутренние слои мембран контактирующих волокон; 4 — билипидная мембрана одного из контактирующих волокон; 5 — сужение межклеточной щели в области формирующихся щелевых контактов; H1, H2 — нейроплазма смежных волокон. Электронная микроскопия. Увеличение: A = 45000, B = 58000, C = 62000.

Fig. 2. Intercellular gap junctions after the action of 0.4% pronase.

A – contact with varying sizes of the intercellular cleft; B – dense aggregate that brings together the gap junction membranes; C – paired slotted contacts; 1 – the junction of the connexons of two adjacent membranes of the electrical synapse; 2 – intercellular cleft; 3 – the inner layers of the membranes of the contacting fibers; 4 – bilipid membrane of one of the contacting fibers; 5 – narrowing of the intercellular cleft in the area of the forming gap junctions; H1, H2 – neuroplasma of adjacent fibers. Electron microscopy. SW: A – 45000, B – 58000, C – 62000.

ду отдельными нейритами встречались еще отдельные участки отростков леммоцитов с признаками диссоциации (рис. 1*B*). Наружные слои глиоцитов при действии проназы ампутированы на множество профильных овальных, очевидно ретрагирующих слоев. В отдельных межнейрональных щелях внутри ганглиев попадаются эллипсоидные овоиды, препятствующие контакту нервных волокон (рис. 1*C*).

На рис. 2*A*, *B* представлен общий вид щелевых контактов мозга пиявки после удаления глии. Внутри ганглия встречается большое количество парных щелевых контактов. В суженной части межклеточной щели они обычно образуют небольшую белковую агрегацию, а между парой мембран, формирующих щелевой контакт, часто отмечается небольшое расширение межклеточной щели. Встречаются и множественные, серийные контакты в форме цепочки между одной парой нейритов. Так как они располагаются в местах ранее очевидно заполненных глиальными отростками или элементами соединительной ткани, то можно предполагать, что эти новые образования возникли в результате увеличения межмембранной адгезии и околомембранной агрегации местных белков.

Таким образом, впервые экспериментально удалось получить электрические синапсы, также впервые выявлен эффект действия проназы на нервную ткань.



Рис. 3. Импульсная активность нейрона Ретциуса. A – частота спонтанной импульсной активности нейрона Ретциуса в норме; B – частота спонтанной пачечной импульсной активности нейрона Ретциуса после действия проназы; C – спонтанный спайк нейрона Ретциуса в нормальном физиологическом растворе; D – спонтанный реверберационный спайк нейрона после действия проназы; E – реверберационный спайк нейрона в растворе с ионами Mg²⁺ после действия проназы.

Fig. 3. The impulse activity of a Retzius neuron. A – the frequency of spontaneous impulse activity of the Retzius neuron is normal; B – the frequency of spontaneous burst impulse activity of the Retzius neuron after pronase action; C – spontaneous spike of the Retzius neuron in normal saline; D – spontaneous reverberation spike of a neuron after pronase action; E – reverberation spike of a neuron in solution with Mg²⁺ ions after pronase action.

Электрофизиологические данные

Регистрировали спонтанную импульсную активность HP. Затем, раствор Рингера в камере заменяли на раствор, содержащий проназу. После определенного времени действия проназы ганглий перфузировали раствором Рингера, удаляя проназу, и вновь регистрировали спонтанную импульсную активность HP.

Исследовали действие 0.2-, 0.4- и 0.8%-ных растворов проназы в течение 10, 20, 40 и 60 мин на электрическую активность HP. Выявлено, что для получения отличной от нормы электрической активности HP, а именно феномена реверберации возбуждения, необходимо было инкубировать препарат в 0.2%-ном растворе проназы в течение 2.5–3-х часов. Раствор проназы при концентрации 0.8% в течение 10 мин не оказывал влияние на импульсную активность HP. 20-минутная инкубация вызывала увеличение импульсной активности HP, затем происходило резкое, плохо контролируемое разрушение структуры ганглия.

В результате экспериментов выявлено, что концентрация проназы равная 0.4% в течение 60 мин вызывала стойкую, стабильную перестройку импульсной активности HP. Эта концентрация проназы и время ее воздействия на ганглий в дальнейшем использовалась как в электронномикроскопических, так и в электрофизиологических экспериментах. После действия проназы вместо одиночных спонтанных спайков HP начинает генерировать пачки импульсов, состоящие из 3-7 спайков (рис. 3C, D).

Частота спонтанной импульсной активности пачек спайков после действия проназы статистически не отличается от частоты одиночных спонтанных импульсов в физиологическом растворе до воздействия проназы (0.26 \pm 0.008 имп/с и 0.25 \pm \pm 0.09 пачка/с соответственно) (рис. 3*A*, *B*).

Для того, чтобы выявить возможное участие химических синапсов в формировании HP спонтанной реверберационной импульсной активности, в конце эксперимента в камеру с ганглием добавляли физиологический раствор, в котором ионы Ca^{2+} заменяли на ионы Mg^{2+} . Выявлено, что в норме (без проназы) характер и частота спонтанной импульсной активности HP в физиологическом растворе с ионами Mg^{2+} достоверно не изменялась. В препаратах, полученных в результате действия проназы, в растворе с ионами Mg^{2+} реверберация сохранялась, но количество импульсов в пачке было всегда выше (рис. 3*D*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Электронномикроскопические исследования показали, что в результате действия проназы получена экспериментальная безглиальная модель нервной системы — ганглий, нервные клетки в котором соединены щелевыми контактами, являющимися электрическими синапсами. Эксперименты с ионами Mg^{2+} демонстрируют, что в формировании пачечной активности HP химические синапсы не принимают непосредственного участия. Важно отметить, что HP в препарате, полученном в результате действия проназы, сохраняют свои электрические свойства в течение 5–6 ч, что не отличает их от HP в препарате брюшной нервной цепочки, обычно используемого нами в длительных опытах.

Таким образом, модель "электрической нервной системы" на основе нервного ганглия пиявки, клетки в котором связаны преимущественно электрическими синапсами, может быть в дальнейшем полезной для изучения функциональной роли электрических синапсов в формировании сложных нейрофизиологических процессов.

выводы

1. Проназа, вызывая разрушение глиальных оболочек в нервном ганглии пиявки, способствует формированию нервной сети, клетки в которой связаны щелевыми мембранными контактами.

2. Созданная экспериментальная модель простой нервной системы показывает, что основой для возникновения реакции реверберации в нервной системе могут служить электрические синапсы (gap junction).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2013—2020 гг. (ГП-14, раздел 64).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Nagy J.I., Dermietzel R., Hertzberg E.L. (Eds). Gap Junctions and Connexins in the Mammalian Central Nervous System. JAI Press. Greenwich. 323–396. 2000.
- 2. Nagy J.I., Rash J.E. Electrical synapses in mammalian CNS: Past eras, present focus and future directions. Biochim. Biophys. Acta–Biomebranes. 1860(1):102–123. 2018.
- 3. *Connors B.W., Long M.A.* Electrical synapses in the mammalian brain. Annu. Rev. Neurosci. 27: 393–418. 2004.
- 4. *Pereda A.E.* Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. Nat. Rev. Neurosci. 15(4): 250–263. 2014.
- Jabeen S., Thirumalai V.J. The interplay between electrical and chemical synaptogenesis. Neurophysiology. 120(4): 1914–1922. 2018.

- 6. *Lun'ko O.O., Isaiev D.S., Maxymiuk O.P., Kryshtal' O.O., Isaieva O.V.* The effect of enzymatic treatment using proteases on properties of persistent sodium current in CA1 pyramidal neurons of rat hippocampus. Fiziol. Zh. 60(3): 75–79. 2014. [Article in Ukraine].
- 7. Sotnikov O.S., Lukovnikova M.V., Vasyagina N.Y., Laktionova A.A., Paramonova N.M. Neuron changes in a mollusk in response to proteolytic enzymes. Neurosci. Behav. Physiol. 40(7): 773–778. 2010.
- De-Miguel F.F. Steps in the formation of neurites and synapses studied in cultured leech neurons. Braz. J. Med. Biol. Res. 33(5): 487–497. 2000.
- 9. *Dykes I.M., Freeman F.M., Bacon J.P., Davies J.A.* Molecular Basis of Gap Junctional Communication in the CNS of the Leech *Hirudo medicinalis.* J. Neurosci. 24(4): 886–894. 2004.
- 10. Baker M.W., Macagno E.R. RNAi of the receptor tyrosine phosphatase HmLAR2 in a single cell of an intact leech embryo leads to growth-cone collapse. Curr. Biol. 10(17): 1071–1074. 2000.
- 11. *Firme C.P., Natan R.G., Yazdani N., Macagno E.R., Baker M.W.* Ectopic expression of select innexins in individual central neurons couples them to pre-existing neuronal or glial networks that express the same innexin. J. Neurosci. 32(41): 14265–14270. 2012.
- 12. Сотников О. С. Объединенная нейронно-ретикулярная теория. СПб. Наука. 239. 2019. [Sotnikov O.S. United neuron-retikular theory. SPb. Nauka. 239. 2019. (In Russ)].

Method for Creating a Neurophysiological Model of a Simple Nervous System Possessing Reverberation

S. S. Sergeeva^{*a*}, *, O. S. Sotnikov^{*a*}, and N. V. Paramonova^{*b*}, *c*

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

^bSechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

> ^cMilitary Medical Academy named after S.M. Kirova, St. Petersburg, Russia *e-mail: sveta.serga@yandex.ru

It has been shown for the first time that a 60-minute exposure by a 0.4% solution of pronase on the nervous ganglion of the abdominal brain of a medical leech causes destruction of the glial membranes, convergence of neurites and the formation of gap junction between nerve processes in the neuropil. The action of pronase leads to the creation of an experimental model of the simple nervous system, the nerve cells of which possess frequency reverberation activity. It is shown that the basis for the occurrence of reverberation of excitation in the nervous system can serve electrical synapses and membrane tight junction.

Keywords: glial membrane proteolysis, pronase, reverberation of excitation, gap junction, electrical synapses, medicinal leech

ЦИТИРОВАТЬ:

Сергеева С.С., Сотников О.С., Парамонова Н.М. Способ создания нейрофизиологической модели простой нервной системы, обладающей реверберацией. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(8): 1163–1169.

DOI: 10.31857/S0869813920080075

TO CITE THIS ARTICLE:

Sergeeva S.S., Sotnikov O.S., Paramonova N.V. Method for Creating a Neurophysiological Model of a Simple Nervous System Possessing Reverberation. Russian Journal of Physiology. 106(8): 1163–1169.

DOI: 10.31857/S0869813920080075

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 9, с. 1170–1188

—— МЕТОДИЧЕСКИЕ СТАТЬИ —

СКРИНИНГОВЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ И ВРЕМЕННОЙ РАЗРЕШАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ СЛУХА ПРИ ЛОКАЛИЗАЦИИ ДВИЖЕНИЯ ПО АЗИМУТАЛЬНОЙ КООРДИНАТЕ

© 2020 г. А. П. Гвоздева^{1, *}, В. М. Ситдиков¹, И. Г. Андреева¹

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия *E-mail: kukumalu@mail.ru

> Поступила в редакцию 30.04.2012 г. После доработки 06.07.2020 г. Принята к публикации 18.08.2020 г.

В работе предложен и апробирован скрининговый метод оценки пространственной и временной разрешающей способности слуха при локализации движения по азимутальной координате. Применяли способ моделирования движения источника звука в свободном поле, базирующийся на изменении баланса громкости широкополосных шумовых посылок на двух громкоговорителях, расположенных напротив слушателя под азимутальными углами ±30°. В диапазонах скоростей и траекторий движения звуковых образов, соответствующих максимальной чувствительности слуха, с использованием адаптивной психоакустической методики выполнена оценка порогов по угловому смещению и по длительности движущегося звукового образа у 11 взрослых испытуемых с нормальным слухом. Пороги оценивали для двух типов сигналов: 1) контрольные сигналы с равномерным спектром и 2) сигналы со снижением доли высоких частот в спектре, соответствующим умеренной сенсоневральной тугоухости. Пороги углового смещения составляли в среднем 1.3°, а индивидуальные пороги по времени не превышали 0.1 с. Время, необходимое для оценки одного порога, составляло полторы минуты. Пространственная и временная разрешающая способность не ухудшалась при уменьшении доли высоких частот в спектре сигнала. Первичная апробация предложенного нами метода на группе из шести пациентов с сенсоневральной тугоухостью выявила у них повышение среднего порога по времени в несколько раз по сравнению с нормой. Продолжительность эксперимента, требуемая для оценки порога у пациентов, не отличалась от таковой у испытуемых с нормальным слухом. Таким образом, предложенный в работе метод позволяет быстро оценивать показатели пространственного слуха по азимутальной координате и может быть использован для объективной скрининговой оценки состояния пространственного слуха пациентов.

*Ключевые слов*а: пространственный слух, разрешающая способность слуха, пороги слуха, восприятие движения, моделирование движения, движущийся звуковой образ, сенсоневральная тугоухость

DOI: 10.31857/S0869813920090113

Локализация движущихся источников звука является одной из важнейших функций слуховой системы, так как она позволяет человеку избегать опасных для него объектов. Выполнение этой функции определяется разрешающей способностью слуха по расстоянию (в том числе, угловому) и по длительности. Оба показа-

теля дополняют друг друга, в совокупности они обеспечивают точную и быструю реакцию на возникающую опасность. Существенным моментом при локализации движущегося источника является оценка направления движения, а не просто факт его обнаружения. Способность оценить направление позволяет сформировать адекватную реакцию на движущийся источник звука. Разрешающую способность оценивают психоакустическими или объективными методами, такими как регистрация движения глаз [1, 2] и положения головы (носа) [3, 4]. Косвенным способом является применение опросников для оценки затруднений в способности локализовать источник звука при различных реальных ситуациях, этот способ используется в клинике [5, 6]. Наиболее точная количественная оценка состояния функции локализации звука достигается с применением психоакустических методов. Преимуществом этих методов являются отсутствие сложной регистрирующей аппаратуры, возможность их использования для испытуемых с нарушениями зрения и подвижности шеи, высокая воспроизводимость результатов. Психоакустические методы получили широкое распространение в экспериментальных исследованиях, тем не менее, в настоящее время методика количественной оценки состояния пространственного слуха, которую можно применить в условиях клиники, отсутствует [7, 8]. Обследования, которые проводят при помощи опросников [6, 9], дают лишь общее представление о затруднениях в локализации.

Психоакустические показатели локализации движущихся по азимуту источников звука оценивали в разных условиях предъявления стимулов: при бинауральном прослушивании предзаписи с применением манекена [10, 11] или передаточных функций головы [12, 13]; в случае реального перемещения источника звука [14]; при моделировании движения в условиях свободного поля [15, 16]. Исследования разрешающей способности по расстоянию и по времени, выполненные для разных параметров сигнала и в различных условиях предъявления, позволяют сформулировать экспериментальную парадигму, которая будет оптимальна для скринингового обследования. Минимальные пороги для обнаружения движения получают в случае выполнения следующих условий: 1) положение головы жестко не фиксировано, что дает возможность испытуемому выполнять микродвижения головы [4, 17]; 2) применение источников широкополосного шума [14]; 3) траектории движения находятся в диапазоне $\pm 30^{\circ}$ азимута [16, 18]; 4) длительность звучания сигнала составляет не менее 300 мс [15, 19]; 5) скорости движения источника звука менее 20 град/с [14, 16, 20, 21]. Эти пять условий обеспечивают минимальные значения порогов по расстоянию, а первые три – по длительности звучания. При их соблюдении значительно проще выявить частичную или полную утрату способности восприятия движения по слуху, чем в произвольной ситуации, когда пороги при норме слуха значительно увеличиваются или могут варьировать.

Нами был разработан метод оценки порогов пространственного слуха на основе адаптивной психофизической методики при моделировании движения звукового источника в свободном поле. Настоящая работа посвящена проверке применимости разработанного нами метода оценки порогов пространственного слуха при локализации широкополосных источников, движущихся по азимутальной координате. Задачи работы включали: 1) определение порогов по угловому смещению для оценки направления движения источников звука у испытуемых с нормальным слухом; 2) оценку порога по времени, достаточного для определения направления движения, в норме и на примере пациентов с сенсоневральной тугоухостью (СНТ); 3) определение времени, необходимого для оценки порога при помощи адаптивной методики при нормальном слухе и у пациентов с нарушением слуха, испытывающих трудности в задачах локализации.



Рис. 1. Амплитудно-частотные характеристики сигналов для создания движущихся звуковых образов. По оси абсцисс – частота, Гц; по оси ординат – амплитуда сигнала, дБ.

I – контрольные сигналы, *2* – сигналы со снижением доли высоких частот в спектре.

Fig. 1. Amplitude-frequency characteristics of signals used to create moving sound images. Abscissa – frequency, Hz; ordinate – signal amplitude, dB.

I - control signals, 2 - signals with the reduced fraction of high-frequency spectral components.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Испытуемые. В исследовании приняли участие 11 испытуемых в возрасте 22–57 лет (из них 7 женщин). Испытуемые имели нормальные пороги слуха по данным тональной пороговой аудиометрии, которую проводили на клиническом аудиометре Pracitronic MA-31.

Все процедуры, выполненные в настоящем исследовании с участием людей, соответствовали требованиям Этического комитета Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН и Хельсинкской декларации 1964 г. с ее последующими изменениями. Каждый испытуемый подписывал информированное согласие на участие в эксперименте.

Моделирование движущегося звукового образа. Звуковые стимулы представляли собой ритмические последовательности широкополосных шумовых посылок в диапазоне частот 0.1-8 кГц. Длительность посылок составляла 22 мс, а продолжительность пауз между ними – 3 мс. Шумовые посылки имели трапециевидную огибающую с линейными фронтами нарастания и убывания по 4 мс. Применяли звуковые стимулы двух типов: 1) контрольные стимулы, спектр мощности которых был равномерным (плоским) во всем диапазоне частот, и 2) стимулы со снижением доли высоких частот в спектре, которое соответствовало типичной аудиограмме пациента с умеренной СНТ (пороги слуха на частотах 0.25, 0.5, 1, 2, 4 и 8 кГц: 15, 17, 25, 50, 60 и 65 дБ соответственно). Снижение доли высоких частот достигалось применением к контрольным стимулам полосового фильтра, представляющего собой ряд полосно-пропускающих фильтров Баттерворта второго порядка в шести октавных диапазонах с центральными частотами: 0.25, 0.5, 1, 2, 4 и 8 кГц. Амплитудно-частотные спектры контрольных стимулов и стимулов со снижением доли высоких частот представлены на рис. 1.

Движение звукового образа вправо или влево моделировали, подавая звуковые стимулы на два динамических громкоговорителя. Громкоговорители располагали симметрично слева и справа от испытуемого так, что расстояние между ними, а также расстояния от центра межушной оси испытуемого до каждого из громкоговорителей составляли по 1 м и, таким образом, образовывали равносторонний треугольник (рис. 2*A*). Громкоговорители были расположены на уровне головы испытуемого, а их акустические оси направлены перпендикулярно межушной оси. Такое расположение было выбрано для исключения неточностей при установке громкоговорителей врачом в условиях дефицита времени на приеме пациентов. Акустические измерения, проведенные при расположении громкоговорителей перпендикулярно межушной оси, показали, что неравномерность их амплитудно-частотной характеристики не увеличивалась по сравнению с ситуацией, когда акустические оси обоих громкоговорителей были направлены на центр межушной оси.

Для создания иллюзии движения источника звука от центра влево или вправо амплитуда шумовых посылок одновременно линейно увеличивалась от уровня 50 дБ на одном громкоговорителе (на том, в сторону которого смещался звуковой образ) и уменьшалась до этого же уровня на другом громкоговорителе. Для создания иллюзии движения слева или справа к центру амплитуда шумовых посылок изменялась в противоположном направлении: линейно уменьшалась до уровня 50 дБ на одном громкоговорителе (том, со стороны которого звуковой образ двигался к центру) и увеличивалась до уровня 50 дБ на другом громкоговорителе. Траектория движения звукового образа представляла собой часть окружности, расположенную между громкоговорителями, радиус которой был равен 1 м, а центр находился посередине межушной оси испытуемого [15] (рис. 2*A*). Угловое смещение звукового образа определялось начальной и конечной точками траектории его движения, которые вычисляли, применяя закон обратных синусов [22]. Данный закон выражается соотношением:

$$\frac{\sin\Theta_2}{\sin\Theta_1} = \frac{p_R - p_L}{p_R + p_L},\tag{1}$$

где Θ_1 — угол, на который смещены громкоговорители относительно центральной оси (см. рис. 2*A*); Θ_2 — угол смещения звукового образа относительно центральной оси; p_R — звуковое давление, создаваемое правым громкоговорителем в месте прослушивания; p_L — звуковое давление, создаваемое левым громкоговорителем в месте прослушивания.

Звуковые давления *p_R* и *p_L*можно выразить формулой:

$$p = p_0 \times 10^{\frac{L}{20}},$$
 (2)

где L – уровень звукового давления, а p_0 – опорное звуковое давление, равное 2×10^{-5} Па.

Подставляя формулу (2) в правую часть выражения (1), и учитывая, что в нашем случае угол $\Theta_1 = 30^\circ$, получили выражение для угла смещения звукового образа:

$$\Theta_2 = \arcsin\left(\frac{1}{2} \times \left(\frac{\frac{L_R}{10^{20} - 10^{20}}}{\frac{L_R}{10^{20} + 10^{20}}}\right)\right),\tag{3}$$

где L_R и L_L — уровни звукового давления, создаваемого в месте прослушивания правым и левым громкоговорителями соответственно, дБ;

На рис. 2*В* показаны расчетные значения смещений по азимуту для применяемых в нашем исследовании изменений амплитуды посылок. Отметим, что в пределах изменений до 13 дБ зависимость угла смещения звукового образа по азимуту от изменения амплитуды близка к линейной.

Ашаратура. Эксперименты проводили в звукоизолированной анэхоидной камере объемом 62.5 м³ (5 × 5 × 2.5 м), ослабление уровня наружных шумов в которой составляло не менее 40 дБ в диапазоне частот 0.5—16 кГц. Звуковые стимулы воспроизводили при помощи оригинальной компьютерной программы на ПК МiсгоХрегts с внешним USB-аудиоинтерфейсом AKAI EIE (16 бит, частота дискретизации 44100), с которого аналоговый сигнал поступал на усилитель мощности Neva Audio SA-3004, а затем на динамические громкоговорители Klipsch R-3800-C. Акустические измерения выполняли с применением комплекта калиброванной акустической аппаратуры фирмы Brüel & Kjær, который состоял из микрофона 4145, предусилителя 2639 и усилителя 2606.

Процедура эксперимента. Все эксперименты начинали с определения баланса уровней между парой громкоговорителей, который позволяет сформировать неподвижный звуковой образ, расположенный при 0° азимута. Для этого испытуемому с помощью двух динамических громкоговорителей предъявляли непрерывный шумовой сигнал, соответствующий по спектру типу стимулов, для которых определяли порог. Испытуемого просили самостоятельно выставить баланс громкости на громкоговорителях при помощи регулятора на экспериментальном пульте так, чтобы громкость слева и справа была одинаковой. Регулировка баланса осуществлялась с шагом 0.5 дБ. Полученное значение баланса фиксировалось и использовалось в качестве исходного значения, относительно которого изменялась амплитуда

Рис. 2. Моделирование смещения источника звука по азимутальной координате.

A – схема взаимного расположения испытуемого и громкоговорителей в акустической камере: 1 – испытуемый, 2 – левый громкоговоритель, 3 – правый громкоговоритель, 4 – звуковой образ, Θ_1 – угол смещения громкоговорителей относительно центральной оси (в нашем случае 30°); Θ_2 – угол смещения звукового образа относительно центральной оси, рассчитываемый по формуле (3).

B – соответствие между изменением амплитуды шумовых посылок и смещением звукового образа относительно центральной оси при расположении громкоговорителей под азимутальными углами 30°. По оси абсцисс – изменение амплитуды шумовых посылок, дБ; по оси ординат – смещение звукового образа, град.

C, D — траектории звуковых образов при моделировании движения по азимутальной координате от центра вправо и к центру справа соответственно. В качестве примера показаны траектории и обозначены угловые смещения звуковых образов с изменением амплитуды сигнала на правом громкоговорителе 2 дБ (смещение 3.3°), 5 дБ (8.1°) и 10 дБ (15.1°). Схематически обозначено направление изменения амплитуды сигналов (последовательностей шумовых посылок) на левом и правом громкоговорителях. **Fig. 2**. Modeling of a sound source azimuthal displacement.

A – a scheme of mutual placement of a subject and loudspeakers in an acoustic chamber: I – subject, 2 – left loudspeaker, 3 – right loudspeaker, 4 – sound image, Θ_1 – angular displacement of loudspeakers relative to the central axis (in our case 30°), Θ_2 – angular displacement of the sound image relative to the central axis calculated by equation (3).

B – relation between sound bursts amplitude change and the displacement of the sound image relative to the central axis in case of 30° angle between the axis and each of the loudspeakers. Abscissa – sound bursts amplitude change, dB; ordinate – sound image displacement, deg.

C, D – trajectories of sound images when modeling azimuthal movement from the center to the right, and from the right to the center, respectively. As an example trajectories and angular displacements of sound images with amplitude changes of 2 dB (3.3° displacement), 5 dB (8.1°) and 10 dB (15.1°) are shown. Directions of sound bursts amplitude changes at left and right loudspeakers are shown schematically.



стимулов. Это позволяло уменьшить влияние на результаты эксперимента возможной асимметрии слуха испытуемого в пределах 5 дБ, которое нельзя выявить при помощи стандартной тональной пороговой аудиометрии.

В эксперименте оценивали пороги по азимуту и по времени звучания звукового образа. Порогом по азимуту считали такое минимальное угловое смещение движущегося звукового образа влево или вправо, при котором испытуемый правильно определял направление движения звукового образа. Порогом по времени звучания звукового образа называли продолжительность звучания движущегося звукового образа, достаточную для определения направления его движения. Каждый испытуемый принимал участие в эксперименте, состоявшем из двух частей. В ходе первой части эксперимента пороги по азимуту и по времени звучания оценивали сначала для контрольных звуковых образов с плоским спектром, а затем для звуковых образов со снижением доли высоких частот в спектре. Во второй части эксперимента пороги опрядке: сначала для звуковых образов со снижением доли высоких частот, а затем — пороги для контрольных звуковых образов. Последовательность, в которой определяли пороги, всегда была одинаковой: 1) порог по азимуту при движении источника в левой полуплоскости; 2) порог по азимуту — в правой полуплоскости; 3) порог по времени — в левой полуплоскости; 4) порог

времени — в правой полуплоскости. Между первой и второй частями эксперимента испытуемому давали от нескольких часов до нескольких дней отдыха.

Методика для оценки порога по азимуту была реализована для траекторий движения вблизи 0°, т.е. в области максимальной чувствительности слуха по азимуту. При движении звукового образа от центра начало траектории всегда соответствовало 0° азимута, а конец траектории был расположен слева или справа относительно ее начала на соответствующее увеличению амплитуды посылок количество градусов (рис. 2*B*). При движении в обратном направлении — к центру, конец траектории движения был всегда фиксирован в 0° по азимуту, а начало траектории было смещено влево или вправо на несколько градусов (рис. 2*D*). Для того, чтобы создать движение звукового образа, изменяли амплитуду шумовых посылок на громкоговорителях, как показано на рис. 2*C*, *D*. Для создания неподвижного звукового образа, локализованного точно по центру между двумя громкоговорителями применяли один звуковой стимул, для которого амплитуда шумовых посылок была постоянна на обоих громкоговорителях.

Амплитуда посылок в последовательностях, подаваемых на каждый из громкоговорителей, могла изменяться на 0-5 дБ с шагом в 0.5 дБ. Амплитуда шумовых посылок на громкоговорителях всегда изменялась в противоположных направлениях: при моделировании движения от центра она увеличивалась от уровня 50 дБ на 0-5 дБ на громкоговорителе, в сторону которого происходило движение, и снижалась на такую же величину до 50 дБ на другом громкоговорителе. При моделировании движения к центру выполняли линейное уменьшение амплитуды до 50 дБ на громкоговорителе, со стороны которого происходило движение, и увеличивали амплитуду сигнала до базового значения 50 дБ на другом громкоговорителе. Суммарное изменение амплитуды сигнала от начала к концу звучания последовательности вычисляли по формуле:

$$\Delta A = (A_{\Pi K} - A_{\Pi K}) - (A_{\Pi H} - A_{\Pi H}), \qquad (4)$$

где $A_{\Pi K}$ и $A_{\Lambda K}$ – амплитуды посылок в конце звучания последовательности на правом и левом громкоговорителях соответственно; $A_{\Pi H}$ и $A_{\Lambda H}$ – амплитуды посылок в начале звучания последовательности на правом и левом громкоговорителях соответственно. Для применявшихся нами перепадов амплитуд на громкоговорителях суммарное изменение амплитуды звукового сигнала могло составлять от 0 до 10 дБ с шагом в 1 дБ. Такие параметры стимулов позволяли создавать движущийся от центра или к центру звуковой образ в диапазоне азимутальных углов ±15.1°, которого было достаточно для формирования движения, направление которого четко определялось всеми испытуемыми. Длительность звуковых образов была одинаковой и составляла 1 с, а расчетные скорости движения были в диапазоне от 1.6 до 15.1°/с.

Пороги определяли с применением адаптивной психоакустической методики "один вверх—один вниз", отдельно в правой и левой полуплоскостях: 1) для контрольных звуковых стимулов и 2) для стимулов со сниженной долей высоких частот в спектре. Для ознакомления испытуемого с движущимися звуковыми образами применяли стимулы с максимальной амплитудой смещения 15.1°, которой соответствовало суммарное изменение амплитуды на 10 дБ. При определении порога направление движения звукового образа – от центра или к центру – выбирали случайным образом. Испытуемого просили ответить на вопрос: "Влево или вправо движется звуковой образ?", нажав на одну из двух кнопок на экспериментальном пульте. В случае правильного ответа испытуемому предъявляли стимул с перепадом амплитуды меньшим на 1 дБ, соответствующий меньшему угловому смещению. В случае неправильного ответа, перепад увеличивали на 1 дБ. Пороговое изменение амплитуды вычисляли как среднее значение перепада амплитуд в пяти последовательных точках разворота, т.е. в тех случаях, когда испытуемый давал неправильный ответ после правильного ответа или наоборот — правильный ответ после неправильного. По этой причине пороговое изменение амплитуды могло находиться между целыми значениями перепада амплитуды, которые применялись в эксперименте. Порог углового смещения вычисляли по формуле (3), подставляя в нее значения L_R и L_L , соответствующие вычисленному пороговому изменению амплитуды.

Методика для оценки порога по времени звучания звукового образа, движущегося влево или вправо, была реализована для максимально протяженных траекторий движения, применявшихся в данной модели — от 0° до 24.2°. Эту траекторию формировали изменением амплитуды шумовых посылок на 10 дБ на обоих громкоговорителях: на одном громкоговорителе амплитуда увеличивалась, а на другом уменьшалась таким образом, что суммарное изменение амплитуды составляло 20 дБ, что соответствовало значению 24.2°. Время звучания движущегося образа варьировало от 0.1 до 1 с с шагом 0.1 с. Если испытуемый правильно определял направление движения звуковых образов длительностью 0.1 с, то дополнительно применяли более короткий стимул, продолжительностью 0.075 с. Таким образом, расчетная скорость движения звуковых образов варьировала в широких пределах и составляла от 24.2°/с для самого длительного односекундного стимула до 322°/с для самого короткого стимула продолжительностью 0.075 с. Порог по времени оценивали при помощи адаптивной психоакустической методики, его определяли отдельно для правой и левой полуплоскостей для контрольных звуковых стимулов и стимулов со сниженной долей высоких частот в спектре. Предъявление стимулов начинали с сигналов максимальной длительности, случайным образом выбирая звуковые образы, движущиеся от центра или к центру. Испытуемого просили ответить на вопрос: "Влево или вправо движется звуковой образ?", нажав на одну из двух кнопок на экспериментальном пульте. В случае правильного ответа испытуемому предъявляли стимул, который был короче предыдущего на 0.1 с. При неправильном ответе длительность стимула увеличивали на 0.1 с. Порог по времени звучания звукового образа определяли как среднее значение длительности стимулов в пяти последовательных точках разворота в формировании стимульных рядов адаптивной методики. Развороты выполняли в тех случаях, когда испытуемый давал неправильный ответ после правильного или наоборот.

Статистический анализ. Полученные данные анализировали при помощи непараметрического парного критерия Вилкоксона, сравнивая индивидуальные пороги по азимуту движущихся звуковых образов с одинаковым спектральным профилем. Сравнение проводили для разных полуплоскостей отдельно в первой и второй частях эксперимента, а также между двумя частями эксперимента, сопоставляя средние значения порогов в левой и правой полуплоскостях. Также с помощью критерия Вилкоксона сравнивали пороги для контрольных звуковых образов и звуковых образов со снижением доли высоких частот в спектре, усредненные по двум частям эксперимента. Для того, чтобы оценить, как уменьшение доли высоких частот влияет на пороги по азимуту у испытуемых разного возраста, были выполнены линейные аппроксимации соотношений между возрастом испытуемых и индивидуальными порогами для движущихся звуковых образов разного спектрального состава. Для порогов по времени оценивали долю случаев, в которых индивидуальные пороги оказывались ниже значения длительности сигнала 0.075 с. Этот показатель сравнивали при помощи одностороннего биномиального критерия в первой и второй части эксперимента для движущихся звуковых образов с одинаковым спектральным профилем.

	Возраст, лет Age, years	Пороги по азимуту Minimum audible movement angles			
№ испытуемого Subject no.		контроль control		снижение доли ВЧ reduced fraction of high-frequency spectral components	
		левая полуплоскость left half-plane	правая полуплоскость right half-plane	левая полуплоскость left half-plane	правая полуплоскость right half-plane
1	22	1.3/1.3*	1.3/1.3	1.0/1.0	1.0/1.0
2	27	1.0/2.0	1.3/1.0	1.0/1.3	2.0/1.0
3	28	1.3/1.0	2.0/1.0	1.0/2.0	1.0/1.0
4	30	1.0/1.0	1.0/1.0	2.0/0.7	1.3/1.3
5	32	0.8/1.6	1.0/1.0	0.7/1.0	1.3/1.0
6	34	1.6/1.0	1.0/1.0	1.3/1.0	1.0/1.0
7	44	1.0/1.0	1.6/1.0	1.0/1.0	2.0/1.0
8	54	1.0/1.3	2.0/1.3	1.6/2.0	1.3/1.3
9	54	1.3/1.6	1.0/1.3	1.3/2.3	1.0/2.0
10	56	1.6/1.0	1.0/1.3	1.3/2.3	1.3/1.3
11	57	1.3/1.6	2.0/1.0	1.0/1.6	1.6/2.3
Среднее Average	40 ± 13**	$1.2 \pm 0.3/1.3 \pm 0.4$	$1.4 \pm 0.4/1.1 \pm 0.2$	$1.2 \pm 0.4/1.5 \pm 0.6$	$1.3 \pm 0.4/1.3 \pm 0.5$

Таблица 1. Индивидуальные пороги по азимуту для определения направления движения зву-кового образа

 Table 1. Individual minimum audible movement angles for determining direction of a sound image motion.

* - значения порога, полученные в первой и второй частях эксперимента.

* - minimum audible movement angles revealed in first and second part of the experiment.

** — указаны стандартные отклонения.

** - standard deviations are shown.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Предложенный нами метод позволил определить пороги по азимуту и пороги по времени звучания источника, которое необходимо для оценки направления движения, у всех 11 испытуемых. Результаты оценки порогов по азимуту для движущихся звуковых образов с разным спектральным составом представлены в табл. 1. Значения порогов в группе испытуемых варьировали в пределах $0.7^{\circ}-2.3^{\circ}$, т.е. максимальное значение в три раза отличалось от минимального. При повторных измерениях порога у одного испытуемого результаты различались не более чем на 1° , то есть были в пределах шага изменения длины траектории. Это указывает на хорошую повторяемость результатов.

В первой части эксперимента при прослушивании контрольных сигналов средние по группе пороги по азимуту для левой и правой полуплоскости составили 1.2° и 1.4° соответственно. Индивидуальные значения порогов варьировали в пределах $0.8^{\circ}-1.6^{\circ}$ для левой полуплоскости и $1.0^{\circ}-2.0^{\circ}$ для правой полуплоскости. Сравнение этих порогов при помощи непараметрического парного критерия Вилкоксона показало отсутствие различий (p = 0.23, n = 9, здесь и далее *n* отражает число парных сравнений, в которых значения порогов в паре различались). Для движущихся звуковых образов со снижением доли высоких частот в спектре пороги по азимуту для левой и правой полуплоскости достоверно не различались (p = 0.4, n = 8) и составили 1.2° и 1.3° соответственно. Индивидуальные значения порогов варьировали от 0.7° до 2.0° для левой и от 1.0 до 2.0° для правой полуплоскости.

Во второй части эксперимента порядок, в котором оценивали пороги, был изменен для уменьшения возможного влияния утомления испытуемых на результаты эксперимента. Как и в первой части эксперимента, для звуковых образов разного спектрального состава не было обнаружено достоверных различий между порогами, определенными в левой и правой полуплоскостях (p = 0.24, n = 7). Для звуковых образов со снижением доли высоких частот средние значения порогов по группе составили 1.5° и 1.3° в левой и правой полуплоскости соответственно. Для звуковых образов с плоским спектром средние по группе пороги составили 1.3° и 1.1° соответственно. Сравнение этих четырех величин при помощи парного критерия Вилкоксона не выявило между ними достоверных различий. Таким образом, пороги угловых смещений для левой и правой полуплоскостей не различались между собой как для контрольных сигналов, так и для сигналов со снижением доли высоких частот в спектре в обеих частях эксперимента.

Дальнейший анализ данных проводили, усредняя значения порогов в левой и правой полуплоскости для движущихся звуковых образов одинакового спектрального состава в первой и второй частях эксперимента. В первой части эксперимента средние пороги составили 1.3° как в контроле, так и при снижении доли высоких частот. Во второй части эти пороги были равны 1.4° и 1.2° соответственно. Попарное сравнение порогов при снижении доли высоких частот и в контроле не выявило достоверных различий как при сопоставлении данных, полученных в одной части эксперимента, так и между разными частями эксперимента. Вместе с тем, наблюдалась тенденция к увеличению разброса индивидуальных значений порогов, которые определяли в начале каждой части эксперимента: в первой части для звуковых образов с плоским спектром (контроль) и во второй части – для звуковых образов со снижением доли высоких частот. Усреднение полученных данных по результатам прослушивания звуковых образов в первой и второй частях эксперимента показало, что пороги по азимуту как для контрольных звуковых образов, так и для движущихся звуковых образов со снижением доли высоких частот в спектре в среднем по группе составляли 1.3°.

Сравнительный анализ индивидуальных порогов по азимуту для испытуемых разного возраста показал, что у пяти из шести слушателей младше 40 лет пороги для звуковых образов со снижением доли высоких частот в спектре были меньше или равны порогу для звуковых образов с плоским спектром (рис. 3). Вместе с тем, у всех испытуемых старше 40 лет (5 человек) наблюдали обратную ситуацию: пороги в контроле были заметно ниже, чем при снижении доли высоких частот. Линейная аппроксимация зависимости порогов по азимуту от возраста испытуемых показала, что для контрольных стимулов корреляция между возрастом и порогом отсутствовала ($R^2 = 0.17$). При снижении доли высоких частот в движущихся звуковых образах наличие корреляции между возрастом и порогом по азимуту становилось очевидным ($R^2 = 0.71$). Это указывало на небольшое ухудшение пространственной разрешающей способности при локализации стимулов данного типа у испытуемых старшего возраста по сравнению с более молодыми испытуемыми.

Пороги по времени звучания, необходимому для определения направления движения звукового образа, представлены в табл. 2 для всех 11 испытуемых. Индивидуальные пороги по времени, определенные в обеих частях эксперимента для левой и правой полуплоскостей, у большинства испытуемых составляли 0.1 с независимо от спектрального состава сигналов. Вместе с тем, некоторые слушатели правильно определяли направление движения звуковых образов даже самой маленькой длительности (0.075 с) в 100% случаев, что указывало на индивидуальный порог менее чем 0.075 с. Испытуемый № 6 в семи из восьми серий стимулов для





По оси абсцисс – возраст испытуемого, лет; по оси ординат – порог углового смещения, град.

1 – контрольные стимулы, 2 – стимулы со снижением доли высоких частот в спектре. На рисунке пока-

заны прямые, аппроксимирующие полученные данные, приведены соответствующие уравнения и ука-

заны квадраты коэффициентов аппроксимации (R^2).

Fig. 3. Relations between individual minimum audible movement angles, averaged between I and II parts of the experiment, and age of subjects.

Abscissa - subject age, years; ordinate - minimum audible movement angle, deg.

I – control stimuli, 2 – stimuli with reduced fraction of high-frequency spectral components. Linear approximations of the data and the corresponding equations with coefficients of determination (R^2) are presented.

определения порогов по времени точно оценивал направление движения даже для звуковых образов минимальной длительности. Поскольку точное значение порога у значительного числа испытуемых определено не было, для оценки влияния снижения доли высоких частот в спектре сигнала на пороги по времени мы оценивали процент случаев, в которых порог оказывался менее 0.075 с для контрольных сигналов и для сигналов со сниженной долей высоких частот. Для контрольных сигналов, как в первой, так и во второй части эксперимента этот показатель был равен 32%, а для сигналов со снижением доли высоких частот – 14 и 23% соответственно. Сравнение этих значений при помощи одностороннего биномиального критерия не выявило между ними достоверных различий, т.е. снижение доли высоких частот не приводило к достоверному уменьшению процента случаев, в которых порог по времени оказывался меньше 0.075 с, и, по-видимому, не оказывало влияния на локализацию движущегося звукового образа. Как в контрольных условиях, так и при снижении доли высоких частот в спектре сигнала, порог по времени не превышал 0.1 с. Вместе с тем, некоторые испытуемые после участия в эксперименте сообщали о том, что при снижении доли высоких частот в спектре сигнала им было легче определять направление движения звуковых образов.

Существенным показателем при апробации разработанной методики для возможности ее широкого применения является время, необходимое для оценки одного порога. В табл. 3 приведены средние значения продолжительности экспери-

Таблица 2. Индивидуальные пороги по времени для оценки направления движения звуково-
го образа по азимутальной координате в левой и правой полуплоскостях, с
Table 2. Individual temporal thresholds for determining direction of a sound image motion in left and
right horizontal half-planes, s

	, Jier IS	Пороги по времени, с Temporal thresholds, s				
TyeMoro 10.		контроль control		снижение доли ВЧ reduced fraction of high-frequency spectral components		
№ испы Subject r	Bo3pacr Age, yeai	левая полуплоскость left half-plane	правая полуплоскость right half-plane	левая полуплоскость left half-plane	правая полуплоскость right half-plane	
1	22	0.1/0.1*	0.1/-**	0.1/0.1	0.1/-	
2	27	0.1/0.1	0.1/-	0.1/0.1	0.1/0.1	
3	28	-/0.1	0.1/0.1	0.1/-	0.1/0.1	
4	30	0.1/0.1	0.1/0.1	0.1/0.1	0.1/0.1	
5	32	0.1/0.1	-/0.1	0.1/0.1	0.1/0.1	
6	34	_/_	_/_	_/_	0.1/-	
7	44	0.1/0.1	0.1/0.1	0.1/0.1	0.1/0.1	
8	54	-/0.1	-/0.1	0.1/0.1	_/_	
9	54	0.1/-	-/0.1	0.1/0.1	0.1/0.1	
10	56	0.1/-	0.1/0.1	0.1/0.1	0.1/0.1	
11	57	0.1/0.1	0.1/-	0.1/0.1	-/0.1	

* — значения порога, полученные в первой и второй частях эксперимента. * — thresholds evaluated in first and second part of the experiment.

** – прочерком обозначены случаи, в которых порог был ниже минимального применявшегося значения длительности стимулов 0.075 с.

** – a dash denotes cases when the threshold was lower than minimum duration of 0.075 s which was used in our study.

Таблица 3. Средние время и число предъявлений стимулов, необходимые для оценки порога по времени с применением адаптивной методики

Table 3. Average time and number of stimuli presentations necessary for temporal threshold assessment with the usage of adaptive procedure. The data for subjects with normal hearing (n = 11) and for patients with sensorine ural hearing loss (n = 6) are listed.

	Испытуемые с но Subjects with	тьной d	
	контроль control	снижение доли ВЧ reduced fraction of high-frequency spectral components	Пациенты с сенсоневрал тугоухостью Subjects with sensorineura hearing loss
Время оценки одного порога, с Time for determining one threshold, s	93 ± 21*	89 ± 21	77 ± 39
Число предъявлений стимулов Number of stimuli presentations	26 ± 6	24 ± 6	17 ± 6

Приведены данные для группы испытуемых с нормальным слухом (n = 11) и пациентов с сенсоневральной тугоухостью (n = 6).

* – указаны стандартные отклонения.

The data for subjects with normal hearing (n = 11) and for patients with sensorineural hearing loss (n = 6) are listed). (* - standard deviations are shown).

мента, необходимой для оценки порога по времени у одного испытуемого в одной полуплоскости. Оно составляло около 1.5 мин, за которые испытуемый давал не более 30 ответов на звуковые стимулы. Таким образом, применение адаптивной методики для оценки порогов позволяло за короткое время определить несколько важных показателей пространственного слуха.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Апробация методики, разработанной для оценки разрешающей способности слуха при локализации звукового образа, движущегося по азимутальной координате в условиях свободного поля, была выполнена успешно. Оценка порогов проводилась нами при помощи адаптивной психоакустической методики "один вверх один вниз".

Применение в предложенном нами методе оценки пространственной и временной разрешающей способности данного варианта методики, вместо варианта "один-вверх, два-вниз", который приводит к оценке порога на уровне 70.1% [23], было оправдано по нескольким причинам. Во-первых, время, затрачиваемое на процедуру при использовании метода "один вверх-один вниз" меньше за счет меньшего числа предъявлений, необходимых для достижения того же числа точек разворота, что существенно для скрининга. Во-вторых, для решения задачи скрининга не требуется высокой точности определения величины порога. В-третьих, в ситуации, когда ширина области перехода психометрической кривой сравнима с шагом изменения варьируемого параметра, обе методики с учетом шага измерения приведут к близкому результату.

В реальных условиях двухальтернативная адаптивная психоакустическая методика "один вверх-один вниз" приводит флуктуации варьируемого параметра к значению, обеспечивающему вероятность правильных ответов, близкую к 50%, но не равную ей, т.к. шаг измерения достаточно велик. Это значение соответствует участку психометрической кривой, в котором стимулы начинают различаться испытуемым. Повторное измерение порога в двух частях эксперимента показало сходные результаты, что свидетельствует об отсутствии грубых ошибок при использовании данного способа измерения. При повторных измерениях порога у одного испытуемого результаты различались в пределах шага изменения варьируемого параметра, что также указывает на отсутствие в представленных данных грубых ошибок. Еще одним аргументом в пользу применения в скрининговых целях методики "один вверх—один вниз" служит тот факт, что при малом количестве точек разворота (до 10) оцениваемые пороги, как правило, оказываются завышенными [24]. Используя вместо методики "один вверх-два вниз" методику "один вверх-один вниз", мы предполагали скомпенсировать влияние малого числа точек разворота на величину определяемого порога. О наличии такой компенсации свидетельствуют гистограммы распределения величин индивидуальных порогов по азимуту и суммарные по группе испытуемых психометрические кривые, отражающие вероятность правильного опознания направления движения в зависимости от углового смещения звукового образа (рис. 4). Как для контрольных стимулов, так и для стимулов со снижением доли высоких частот максимумы гистограмм приходятся на угловые смещения около 1°, которые соответствуют участку суммарной психометрической кривой, лежащему в диапазоне вероятностей опознания движения 0.6-0.7 (т.е. 60–70%). Таким образом, применение методики "один вверх—один вниз" в совокупности с малым количеством точек разворота приводило к определению порога на уровне 60–70% опознания направления движения. Полученные в группе испытуемых с нормальным слухом результаты соответствовали величинам порогов для движущихся по азимуту реальных источников звука с широкополосным спек-





По оси абсцисс – угловое смещение звукового образа в градусах, по оси ординат слева – суммарная по группе испытуемых вероятность правильного ответа, полученная при реализации адаптивной методики. По оси ординат справа – доля случаев оценки индивидуального порога, соответствующая значению углового смещения

I, *3* – контрольные стимулы; *2*, *4* – стимулы со снижением доли высоких частот в спектре.

Fig. 4. Summarized psychometric curves reflecting probability of a sound image direction of motion discrimination and histograms of minimum audible movement angles, obtained by "one up—one down" adaptive procedure.

Abscissa – angular displacement of a sound image, deg.; left ordinate – summarized probability of correct responses resulted from the adaptive method; right ordinate – the share of threshold values corresponding to a certain angular displacement.

1, 3 - control stimuli; 2, 4 - stimuli with reduced fraction of high-frequency spectral components

тром, которые при скорости $2.8^{\circ}/c$ составили $1^{\circ}-2^{\circ}$ [14]. При оценке порогов по азимуту в нашей работе расчетные скорости движущихся звуковых образов составили 1.6° до $15.1^{\circ}/c$, т.е. находились в оптимальном диапазоне скоростей, для которого получали минимальные пороги по азимуту [16]. В этом исследовании применяли 30 громкоговорителей, размещенных напротив слушателя под разными азимутальными углами с шагом 0.46° , на которые последовательно подавали звуковые широкополосные щелчки длительностью 1.8 мс. Изменение скорости движения звукового образа по азимутальной координате получали изменением задержки по времени. Пороги составили от 1.5° до 4° в диапазоне скоростей $1.8^{\circ}/c$ — $57.5^{\circ}/c$. Таким образом, оценки порогов по азимуту в наших экспериментах совпадали с результатами, полученными для реального движения и в случае его моделирования 30 громкоговорителями.

Иллюзия движения звуковых источников по азимуту в условиях свободного поля при помощи двух громкоговорителей была впервые предложена в работе [15]. В приложении к этой работе автор приводит подробные измерения межушной фазовой задержки для сигнала частотой 500 Гц в случае модельного и реального движения источника звука, которые проводились при помощи акустического манекена KEMAR. Сопоставление данных для модельного и реального источника показало практически полное совпадение межушных задержек при реальном движении источника и при его моделировании. Таким образом, данная модель формирует иллюзию движения не только на основе межушных различий по интенсивности сигнала (высокочастотный бинауральный механизм), но и создавать межушные фазовые задержки, аналогичные таковым при реальном движении (низкочастотный бинауральный механизм). В предложенном нами варианте модели в качестве стимулов применялись идентичные посылки широкополосного шума с фронтами по 4 мс, которые подавались на динамические громкоговорители одного типа. Это позволяет рассматривать формирование низкочастотных составляющих сигнала в местах расположения ушей испытуемого как аналогичное тому, которое было продемонстрировано в работе Grantham [15]. Высокочастотные компоненты шума формировали межушную разницу по интенсивности. Таким образом, при формировании движения последовательностями посылок широкополосного шума были задействованы оба бинауральных механизма слуха. Возможно, поэтому мы получили значительно меньшие величины порогов, чем в исследовании [15], в котором применяли тональный звуковой образ, и где пороги обнаружения движения по расстоянию вблизи 0° азимута составили $4^{\circ}-10^{\circ}$ при скоростях от $7^{\circ}/c$ до $17^{\circ}/c$. Кроме того, угловое расстояние между громкоговорителями, которое мы использовали, было в 2 раза больше, чем в упомянутой работе. Это дает возможность оценивать пороги при патологии слуха, т.к. у пациентов они, как правило, в несколько раз выше, чем в норме.

Применявшаяся нами модель движения обеспечивала произвольное изменение скорости и длины траектории движения звукового образа, она позволила нам оценить как пороги по азимуту при постоянной и комфортной для испытуемого длительности звучания, так и пороги по времени при максимальной траектории движения звукового образа, что существенно для пациентов с нарушением слуха. В отличие от модели реальное движение источника звука обеспечивает наиболее адекватную оценку способности к локализации [14], но в очень ограниченных условиях, т.к. создание движения реального источника с произвольной скоростью и траекторией при отсутствии посторонних шумов является сложной и дорогостоящей технической задачей. Эти обстоятельства исключают рутинное применение данного подхода. Поэтому применение моделей движения в условиях свободного поля или в замкнутом помещении при снижении уровня реверберации, которого можно достигнуть в условиях клиники при помощи применения звукопоглощающих материалов, оказывается оптимальным способом для оценки пространственного слуха.

Наряду с моделями движения, создаваемыми в условиях свободного поля, для оценки пространственной разрешающей способности применяли технологии виртуальной реальности и подавали звуковые сигналы в головные телефоны [13, 25]. В отличие от нашей модели положение виртуального источника изменяли путем обработки исходного сигнала с использованием передаточных функций головы, полученных для разных точек траектории движения. Этот способ предъявления стимулов, несмотря на его широкое применение в эксперименте в последние годы, имеет существенный недостаток. Он исключает небольшие сканирующие движения головы, которые существенно улучшают разрешающую способность слуха и, тем самым, не позволяет получить представление о способности локализации в реальных условиях [4, 17, 25]. Помимо этого необходимость записи индивидуальных передаточных функций для каждого испытуемого делает исследование очень трудоемким, а в случае применения обобщенных передаточных функций или функций, полученных при использовании манекенов типа КЕМАR, существенно снижается пространственная точность разрешения при воспроизведении в головных телефонах. В результате пороги по угловому смещению в упомянутых работах оказываются существенно больше, чем полученные нами в условиях свободного поля, что подтверждает высокую точность измерений и наибольшее соответствие наших



Рис. 5. Величины порогов смещения источников звука или звуковых образов, движущихся по азимутальной координате, в зависимости от скорости и длительности звучания сигнала.

По оси абсцисс – длительность сигнала, с; по оси аппликат – скорость источника/звукового образа, град./с.; по оси ординат – порог смещения, град.

I – реальные движущиеся источники звука [14, 18, 16, 13, 25];

2-модель движения [16];

3 – звуковые образы, полученные с применением технологий виртуальной акустической реальности [13, 25];

4 – звуковые образы, полученные изменением баланса амплитуды шумовых посылок на двух громкоговорителях (наши данные).

Fig. 5. Dependence of minimum audible movement azimuthal angles for sound sources or sound images on velocity of movement and duration of the signal.

Abscissa - signal duration, s; ordinate - sound source/image velocity, deg./s; applicate - MAMA, deg.

I – real moving sound sources [14, 18];

2-model of moving sound source [16];

3- sound images created by virtual acoustic reality technologies [13, 25];

4 - sound images created by changing of balance of sound bursts amplitude emitted by two loudspeakers (our data).

данных результатам для реального движения по сравнению с другими способами моделирования движения источников звука (рис. 5).

Апробация методики включала сравнительный анализ порогов по азимуту для движущихся звуковых образов в контрольной серии с плоским спектром и при моделировании потери слуха на высоких частотах, а также пороги по времени в контрольной группе с нормальным слухом и в группе с сенсоневральной тугоухостью. Снижение доли высоких частот в спектре не оказывало влияния на пороги у испытуемых моложе 40 лет, но приводило к заметному повышению этих порогов среди испытуемых старшего возраста, что было хорошо заметно по корреляции между возрастом и порогом при снижении доли высоких частот ($R^2 = 0.71$) (рис. 3). Поскольку для сигналов с плоским спектром (контроль) такой корреляции не наблюдали, можно сделать вывод о том, что для испытуемых старшего возраста присутствие высоких частот в спектре оказывалось более критичным для определения направления движения, чем для молодых испытуемых. Возможно, это связано с тем, что у слушателей старше 40 лет, даже при возрастной норме слуха, часть волосковых клеток, которые отвечают за восприятие высоких частот, уже не функционируют, в то время как у молодых испытуемых эти клетки еще сохранены [26]. Таким образом, даже небольшое снижение доли высоких частот в спектре могло приводить к дефициту слуховой информации в высокочастотной области у испытуемых старшего возраста, и, таким образом, вызывать наблюдавшееся нами повышение порогов.

В разработанной нами методике при помощи оригинальной компьютерной программы был реализован адаптивный метод оценки порогов. У всех 11 испытуемых с нормальным слухом порог по длительности был не выше 0.1 с. Этот результат согласовался с данными, полученными для разных способов имитации движения. При бинауральном предъявлении сигнала порог по длительности составил около 0.1 с [27, 28]. В условиях моделирования в свободном поле продолжительность движения источника звука, необходимая для возникновения ощущения движения, составила от 60 до 90 мс в зависимости от скорости движения источника звука, которая изменялась в пределах от 90°/с до 360°/с [20]. При оценке порога по времени разработанной нами методикой у пациентов с СНТ в среднем порог составил 0.7 с, а индивидуальные значения этого порога варьировали от 0.1 до 1.5 с. Повышение порога наблюдали не у всех испытуемых. Это обстоятельство может быть обусловлено тем, что нарушение временного слухового анализа возникает при вовлечении в патологический процесс центральных отделов, что не обязательно возникает при СНТ. Тем не менее, время, необходимое для оценки направления движения, как правило, увеличивалось в несколько раз у пациентов с СНТ по сравнению с нормой и при локализации приближающихся, и удаляющихся звуковых образов [29]. Это свидетельствует об общем ухудшении способности быстро реагировать на движущиеся звуковые источники при СНТ 2-3 степени.

Апробация разработанного нами метода оценки порогов слуха в условиях клиники при участии 6 пациентов с симметричной СНТ 2–3 степени показала, что для определения порога по времени у одного пациента требовалось в среднем не больше времени, чем у испытуемых с нормальным слухом (табл. 3). За это время пациенты давали меньше ответов на стимулы, однако демонстрировали существенно большие величины порогов по времени, чем испытуемые с нормальным слухом. Таким образом, предложенный нами метод позволил снизить время определения одного показателя в среднем до 1.5 мин, в том числе, для пациентов с нарушением слуха. Это существенно меньше, чем в случае часто используемого метода постоянных рядов, который требует 10–15 мин для оценки одного показателя и не может быть использован в клинике в рамках врачебного осмотра. Таким образом, предложенный нами скрининговый метод оценки пространственного слуха на основе моделирования движения источника звука и оригинальной компьютерной программы, выполняющей генерацию движущихся звуковых образов и реализующей адаптивную методику оценки порогов на основе обратной связи, обеспечивает получение ряда основных показателей пространственного слуха в течение короткого времени. Это обеспечивает широкую перспективу его использования как при обследовании пациентов, так и при различных исследованиях поведения, требующих решения задач слуховой локализации.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы статьи выражают благодарность сотрудникам сурдологического отделения Городского гериатрического медико-социального центра Санкт-Петербурга — Ларисе Евгеньевне Головановой и Евгении Александровне Клишовой за проведение первичной апробации разработанной методики в условиях клиники.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания (тема № АААА-А18-118013090245-6) при частичной поддержке РФФИ (проект № 18-015-00296).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Hofman P.M., Van Opstal A.J.* Spectro-temporal factors in two-dimensional human sound localization. J. Acoust. Soc. Am. 130: 2634–2648. 1998.
- 2. *Populin L.C.* Human sound localization: measurements in untrained, head-unrestrained subjects using gaze as a pointer. Exp. Brain. Res. 190: 11–30. 2008.
- Macpherson E.A., Middlebrooks J.C. Localization of brief sounds: Effects of level and background noise. J. Acoust. Soc. Am. 108: 1834–1849. 2000.
- 4. *Perrett S., Noble W.* The contribution of head motion cues to localization of low-pass noise. Percept. Psychophys. 59: 1018–1026. 1997.
- Ou H., Perreau A., Tyler R.S. Development of a Shortened Version of the Spatial Hearing Questionnaire (SHQ-S) for Screening Spatial-Hearing Ability. Am. J. Audiol. 26(3): 293. 2017.
- 6. *Perreau A.E., Spejcher B., Ou H., Tyler R.* The Spatial Hearing Questionnaire: Data From Individuals With Normal Hearing. Am. J. Audiol. 23(2): 173. 2014.
- 7. Kolarik A.J., Raman R., Moore B.C.J., Cirstea S., Gopalakrishnan S., Pardhan Sh. Partial Visual Loss Affects Self-reports of Hearing Abilities Measured Using a Modified Version of the Speech, Spatial, and Qualities of Hearing Questionnaire. Front. Psychol. 8: 561. 2017.
- 8. Kong T.H., Park Y.Ah., Bong J.P., Park S.Y. Validation of the Korean Version of the Spatial Hearing Questionnaire for Assessing the Severity and Symmetry of Hearing Impairment. Yonsei Med. J. 58: 842–847. 2017.
- 9. *Gatehouse S., Noble W.* The speech, spatial and qualities of hearing scale (SSQ). Int. J. Audiol. 43(2): 85–99. 2004.
- 10. Freeman T.C.A., Leung J., Wufong E., Orchard-Mills E., Carlile S. Discrimination contours for moving sounds reveal duration and distance cues dominate auditory speed perception. PLoS ONE 9(7): e102864. 2014.
- 11. Grantham D.W., Hornsby B.W.Y., Erpenbeck E.A. Auditory spatial resolution in horizontal, vertical, and diagonal planes. J. Acoust. Soc. Am. 114(2): 1009–1022. 2003.
- Han Y., Chen F. Minimum Audible Movement Angle in Virtual Auditory Environment: Effect of Stimulus Frequency. 2019 IEEE Conference on Multimedia Information Processing and Retrieval (MIPR). 175–178. 2019.
- 13. Lundbeck M., Grimm G., Hohmann V., Laugesen S., Neher T. Sensitivity to angular and radial source movements as a function of acoustic complexity in normal and impaired Hearing. Trends. Hear. 21: 1–14. 2017.
- 14. Harris J.D., Sergeant R.L. Monaural/binaural minimum audible angle for a moving sound source. J. Speech. Hear. Res. 14: 618–629. 1971.
- 15. *Grantham D.W.* Detection and discrimination of simulated motion of auditory targets in the horizontal plane. J. Acoust. Soc. Am. 79: 1939–1949. 1986.
- Saberi K., Perrott D.R. Minimum audible movement angles as a function of sound source trajectory. J. Acoust. Soc. Am. 88: 2639–2644. 1990.
- 17. *Thurlow W.R., Runge P.S.* Effect of induced head movements on localization of direction of sounds. J. Acoust. Soc. Am. 42: 480–488. 1967.
- 18. *Strybel T.Z., Manligas C.L., Perrott D.R.* Minimum audible movement angle as a function of the azimuth and elevation of the source. Human. Factors. 34(3): 267–275. 1992.
- 19. *Strybel T.Z., Witty A.M., Perrott D.R.* Auditory apparent motion in the free field: The effects of stimulus duration and separation. Percept. Psychophys. 52(2): 139–143. 1992.
- Perrott D.R., Musicant A.D. Minimum auditory movement angle: Binaural localization of moving sound sources. J. Acoust. Soc. Am. 62: 1463–1466. 1977.
- 21. *Perrott D.R., Tucker J.* Minimum audible movement angle as a function of signal frequency and the velocity of the source. J. Acoust. Soc. Am. 83: 1522–1527. 1988.
- Bauer B.B. Phasor analysis of some stereophonic phenomena. J. Acoust. Soc. Am. 33: 1536– 1539. 1961.
- Levitt H. Transformed up-down methods in psychoacoustics. J. Acoust. Soc. Am. 49: 467–477. 1971
- 24. *Witton C., Talcott J.B., Henning G.B.* Psychophysical measurements in children: challenges, pitfalls, and considerations. Peer J. 5: e3231. 2017.
- 25. *Brimijoin W.O., Akeroyd M.A.* The moving minimum audible angle is smaller during self motion than during source motion. Front. Neurosci. 8: 273. 2014.
- Wu P.Z., Liberman L.D., Bennett K., de Gruttola V., O'Malley J.T., Liberman M.C. Primary Neural Degeneration in the Human Cochlea: Evidence for Hidden Hearing Loss in the Aging Ear. Neuroscience. 407: 8–20. 2018.

- Blauert J. On the lag of lateralization caused by interaural time and intensity differences. Audiology. 11: 265–270. 1972.
- Висков О.В. О восприятии движения слитного звукового образа. Физиология человека. 1: 371–376. 1975. [Viskov O.V. About perception of movement of a whole sound image. Fiziologiya Cheloveka. 1: 371–376. 1975. (In Russ)].
- 29. Гвоздева А.П., Клишова Е.А., Голованова Л.Е., Андреева И.Г. Пороговая длительность звуковых сигналов для оценки приближения и удаления их источника в норме и при сенсоневральной тугоухости 2–3-й степени. Рос. оториноларингология. 104: 19–24. 2020. [Gvozdeva A.P., Klishova E.A., Golovanova L.E., Andreeva I.G. Threshold duration of audio signals for assessment of approaching and receding of their source in normal condition and in 2nd and 3rd degree sensorineural hearing loss. Russ. Otorhinolaryngology. 104: 19–24. 2020. (In Russ)].

A Screening Method for Assessment of Spatial and Temporal Resolution of the Auditory System in Case of Azimuthal Movement Localization

A. P. Gvozdeva^{*a*}, *, V. M. Sitdikov^{*a*}, and I. G. Andreeva^{*a*}

^aSechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Saint-Petersburg, Russia *e-mail: kukumalu@mail.ru

A screening method for assessment of spatial and temporal resolution of the auditory system in case of azimuthal movement localization has been suggested and approbated in this paper. An approach of free-field sound source movement modeling was chosen. It is based on change of volume balance of wideband noise bursts on two loudspeakers, placed in front of the subject and separated by 60° azimuthal angle. An assessment of minimum audible movement angles and temporal thresholds for moving sound images was performed with the usage of an adaptive psychoacoustic procedure in ranges of velocities and trajectories of sound images the hearing system most sensitive to. The assessment was performed with participation of 11 healthy adult subjects for two types of signals: 1) control signals with flat spectrum and 2) signals with the reduced fraction of high-frequencies which corresponded to moderate sensorineural hearing loss. Minimum audible movement angles were 1.3° in average, and individual temporal thresholds did not exceed 0.1 s. Both these values did not depend on spectral profile of the signals. The time for assessment of one threshold was about 1.5 minutes. Preliminary approbation of the method suggested by us on the group of six patients with sensorineural hearing loss revealed a several times increase of temporal thresholds in comparison with the same thresholds for normally hearing subjects. Duration of the experiment for assessment of one threshold for patients did not differ from subjects with normal hearing. Thus, the suggested method allows quick assessment of spatial hearing condition in both healthy subjects and patients with hearing loss.

Keywords: spatial hearing, auditory resolution, hearing thresholds, motion perception, motion modeling, moving sound image, sensorineural hearing loss

ЦИТИРОВАТЬ:

Гвоздева А.П., Ситдиков В.М., Андреева И.Г. Скрининговый метод оценки пространственной и временной разрешающей способности слуха при локализации движения по азимутальной координате. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(9): 1170–1188.

DOI: 10.31857/S0869813920090113

TO CITE THIS ARTICLE:

Gvozdeva A.P., Sitdikov V.M., Andreeva I.G. A Screening Method for Assessment of Spatial and Temporal Resolution of the Auditory System in Case of Azimuthal Movement Localization. Russian Journal of Physiology. 106(9): 1170–1188.

DOI: 10.31857/S0869813920090113