

## СО Д Е Р Ж А Н И Е

---

### Обзорные и проблемные статьи

Роль аутофагии в ишемическом и реперфузионном повреждении сердца <i>Н. С. Воронков, Л. Н. Маслов</i>	135
Экспериментальные модели когнитивных нарушений при нейродегенеративных и органических расстройствах <i>М. В. Дорофейкова, Н. Н. Петрова, А. Ю. Егоров</i>	157
Чувствительность слизистой оболочки желудка к ulcerогенным факторам и активность гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы при развитии стрептозотоцин-индуцированного диабета <i>Т. Т. Подвигина, Л. П. Филаретова</i>	176
Механизмы взаимодействия сердечно-сосудистой и дыхательной систем <i>В. И. Евлахов, И. З. Поясов, В. И. Овсянников</i>	189

---

### Экспериментальные статьи

Связь периодических модуляций сердечного ритма с уровнем активности сенсомоторной коры <i>К. И. Павлов, В. Н. Мухин, А. В. Сырцев, А. Н. Архимук, Н. М. Андиева, М. И. Петренко</i>	205
Парвальбумин-содержащие энтеральные метасимпатические нейроны в постнатальном онтогенезе <i>А. Д. Ноздрачев, А. Ф. Будник, П. М. Маслюков</i>	224
Gly-Pro и адаптивные реакции при многокомпонентном стрессе <i>Т. А. Толова, Т. А. Замощина, М. В. Светлик, М. Л. Седокова, А. А. Гостюхина, А. М. Фатюшина</i>	231
Исследование роли нерцепторной тирозинкиназы c-Abl в регуляции p53-зависимой активации ERK1/2-зависимого каскада <i>Е. А. Олейник, А. А. Наумова, Д. В. Немирич, С. Д. Николаева, В. Т. Бахтеева, А. С. Березовская, Е. В. Черниговская, М. В. Глазова</i>	243
Ранние стероидогенные эффекты гонадотропина и низкомолекулярного агониста рецептора лютеинизирующего гормона при введении их субмаксимальных доз самцам крыс <i>А. А. Бахтюков, К. В. Деркач, А. О. Шпаков</i>	254

---

# CONTENTS

---

## Reviews and Topical Articles

The Role of Autophagy in Ischemic and Reperfusion Injury of the Heart <i>N. S. Voronkov and L. N. Maslov</i>	135
Animal Models of Cognitive Impairment in Neurodegenerative and Organic Disorders <i>M. V. Dorofeikova, N. N. Petrova, and A. Yu. Egorov</i>	157
Sensitivity of the Gastric Mucosa to Ulcerogenic Factors and Activity of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical System in Development of Streptozotocin-Induced Diabetes <i>T. T. Podvigina and L. P. Filaretova</i>	176
The Mechanisms of Cardiopulmonary Interaction <i>V. I. Evlakhov, I. Z. Poyassov, and V. I. Ovsyannikov</i>	189

---

## Experimental Articles

Association between Periodic Modulations of the Heart Rate and Sensomotor Cortex Activation <i>K. I. Pavlov, V. N. Mukhin, A. V. Syrtsev, A. N. Archimuk, N. M. Andieva, and M. I. Petrenko</i>	205
Parvalbumin-Containing Enteric Metasympathic Neurons in Postnatal Ontogenesis <i>A. D. Nozdrachev, A. F. Budnik, and P. M. Masliukov</i>	224
Gly-Pro and Adaptive Reactions under Multicomponent Stress <i>T. A. Tomova, T. A. Zamoshchina, M. V. Svetlik, M. L. Sedokova, A. A. Gostyukhina, and A. M. Fatyushina</i>	231
The Role of Non-Receptor Tyrosine Kinase c-Abl in the Regulation of p53-Dependent Activation of ERK1/2 Signaling Cascade <i>E. A. Oleynik, A. A. Naumova, D. V. Nemirich, S. D. Nikolaeva, V. T. Bachteeva, A. S. Berezovskaya, E. V. Chernigovskaya, and M. V. Glazova</i>	243
Early Steroidogenic Effects of Gonadotropin and a Low-Molecular-Weight Agonist of Luteinizing Hormone Receptor when Administered to Male Rats at Submaximal Doses <i>A. A. Bakhtyukov, K. V. Derkach, and A. O. Shpakov</i>	254

---

---

---

---

ОБЗОРНЫЕ  
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

---

---

РОЛЬ АУТОФАГИИ В ИШЕМИЧЕСКОМ  
И РЕПЕРФУЗИОННОМ ПОВРЕЖДЕНИИ СЕРДЦА

© 2020 г. Н. С. Воронков<sup>1, 2, \*</sup>, Л. Н. Маслов<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт кардиологии, Томск, Россия

<sup>2</sup>Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск, Россия

\*E-mail: maslov@cardio-tomsk.ru

Поступила в редакцию 09.09.2019 г.

После доработки 07.11.2019 г.

Принята к публикации 07.11.2019 г.

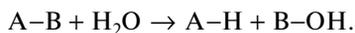
Ишемия/реперфузия (И/Р) сердца приводит к усилению аутофагического потока. Прекондиционирование стимулирует аутофагический поток за счет активации киназы АМРК и Р13-киназы при ингибировании киназы mTOR. Кардиопротекторный эффект посткондиционирования связан с активацией аутофагии и повышением активности NO-синтазы и АМРК. И/Р стимулирует аутофагию, а гонадэктомия ее подавляет. Адаптация к гипоксии оказывает кардиопротекторный эффект, который, возможно, связан с активацией аутофагии. Возможно, что негативный эффект жировой диеты на толерантность сердца к И/Р связан с ингибированием аутофагии. Голодание стимулирует аутофагию, этот эффект сопровождается повышением толерантности сердца к действию И/Р. Окислительный стресс стимулирует аутофагию при И/Р сердца. Супероксидный радикал, генерируемый НАДФН-оксидазой, выступает в роли триггера аутофагии, по-видимому, за счет активации киназы АМРК. Есть основания полагать, что киназы АМРК, GSK-3 $\beta$ , JNK, MEK и ERK стимулируют аутофагию, а mTOR, Akt- и Р13-киназа ингибируют аутофагию при И/Р сердца. Установлено, что транскрипционные факторы FoxO1, FoxO3, NF- $\kappa$ B и HIF-1 $\alpha$  усиливают аутофагию при И/Р сердца. Транскрипционные факторы STAT1 и p53 ингибируют аутофагию в условиях И/Р сердца. miR-325, miR-145 и miR-144 симулируют аутофагию, а miR-30a, miR-221, miR-638 и miR-144 ингибируют аутофагию при И/Р сердца. Представленные данные свидетельствуют, что H<sub>2</sub>S повышает толерантность сердца к действию И/Р и ингибирует аутофагию. Гемоксигеназа-1 стимулирует аутофагию и предупреждает повреждение митохондрий при гипоксии/реоксигенации кардиомиоцитов. Активация аутофагии во время И/Р может быть протекторной или повреждающей в зависимости от экспериментальной модели. Инфаркт-лимитирующий эффект зависит не только от того, как влияет то или иное соединение на аутофагию, но и от того, как оно влияет на апоптоз, некроптоз и некроз кардиомиоцитов при И/Р сердца.

*Ключевые слова:* аутофагия, сердце, ишемия, реперфузия

DOI: 10.31857/S0869813920020119

Аутофагия или аутофагоцитоз – это процесс энзиматической деградации белков, жиров, нуклеиновых кислот и целых органелл в лизосомах. Термин аутофагия происходит от древнегреческого αὐτός ауто – “сам” и φαγεῖν – “есть”. История аутофагии началась с открытия лизосом, которое было сделано в 1955 г. коллективом исследователей, возглавляемых С. de Duve [1]. Он же предложил термин лизосомы от греческого λύσις – “разложение” и σῶμα – “тело” [1]. Лизосомы пред-

ставляют из себя везикулу, окруженную двойной клеточной мембраной и содержащую около 50 кислых гидролаз, катализирующих реакцию [2]:



Кислые гидролазы включают фосфатазы, нуклеазы, гликозидазы, протеазы, пептидазы, сульфатазы, липазы, которые активны при кислой pH 4.7 [3].

В январе 1962 г. K.R. Porter и T. Ashford показали, что после применения глюкогона лизосомы клеток печени начинают поглощать клеточные органеллы, в том числе митохондрии [4]. В исследовании, опубликованном в 1963 г., у крыс моделировали различные патологические состояния и проводили морфологические исследования печени, почек и поджелудочной железы. Было обнаружено секвестирование цитоплазмы с последующей деградацией в лизосомах, то есть аутофагия. Сам термин “аутофагия” впервые прозвучал на the Ciba Foundation Symposium on Lysosomes, который проходил в Лондоне 12–14 февраля 1963 г. [5]. Термин “аутофагоцитоз” (autophagocytosis) впервые использовал J. Radewa [6]. Позднее появились статьи, которые подтвердили существование аутофагии [7, 8].

Известно, что существует три типа аутофагии. Макроаутофагия включает образование везикул с двойной мембраной, называемых аутофагосомами, которые связывают клеточные белки, глюкоиды, липиды и органеллы, а затем доставляют их в лизосомы для деградации. Микроаутофагия относится к процессу, посредством которого клеточные элементы, которые подвержены деградации, непосредственно поглощаются лизосомами [9]. Опосредованная шапероном аутофагия характеризуется связыванием белков, содержащих последовательность KFERQ, с шапероном Hsc70, который транспортирует целевые белки в лизосомы с участием белка 2A лизосомальной мембраны (Lamp2A) [9]. Макроаутофагия (ее обычно называют аутофагией) имеет решающее значение для деградации органелл и адаптации к клеточному стрессу, тогда как две другие формы аутофагии постоянно участвуют в специализированных клеточных функциях [9, 10]. Мы многим обязаны своими знаниями о природе аутофагии Yoshinori Ohsumi, лауреату Нобелевской премии 2016 г.

На начальном этапе аутофагия сопровождается образованием фрагмента мембраны, который происходит из эндоплазматического ретикулума, его обычно называют фагофором (phagophore). При участии белкового комплекса Beclin–Vps34 и при участии белка LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3) образуется везикула, называемая аутофагосомой [9, 11]. Около 80 белков Atg, кодируемых генами, связанными с аутофагией (autophagy-related genes, Atg), участвуют в образовании аутофагосом [9, 11, 12]. Белки паркин (parkin) и P62 (sequestosome 1/SQSTM1) играют ключевую роль в митофагии [9, 13]. Обычно при усилении аутофагического потока (an autophagic flow) увеличивается уровень беклина-1, повышается соотношение LC3-II/LC3-I, а уровень P62 снижается [14–18]. Вместе с тем, некоторые авторы сообщают об увеличении уровня P62 в ответ на ишемию/реперфузию (И/Р) сердца [19, 20]. На заключительной стадии аутофагии аутофагосома сливается с лизосомой и образуется аутолизосома, в которой происходит расщепление внутриклеточных структур. В слиянии аутофагосом и лизосом принимает участие белок митофузин [21].

**Ишемия/реперфузия и аутофагия.** В ряде исследований было показано, что И/Р стимулирует аутофагию кардиомиоцитов [22–28]. Некоторые исследователи полагают, что аутофагия во время ишемии носит протекторный эффект, а во время реперфузии аутофагия вызывает повреждения сердца [24]. Утверждают, что аутофагия усиливается при ишемии сердца, но еще в большей степени она увеличивается во время реперфузии [23]. Коронароокклюзия (30 мин) стимулирует аутофагию особенно сильно в зоне, граничащей с областью инфаркта [22]. В культивируемых неонатальных кардиомиоцитах крысы депривация глюкозы ведет к усилению экспрессии белков, участвующих в аутофагии LC3 и Atg12 [29]. Показано, что у свиней

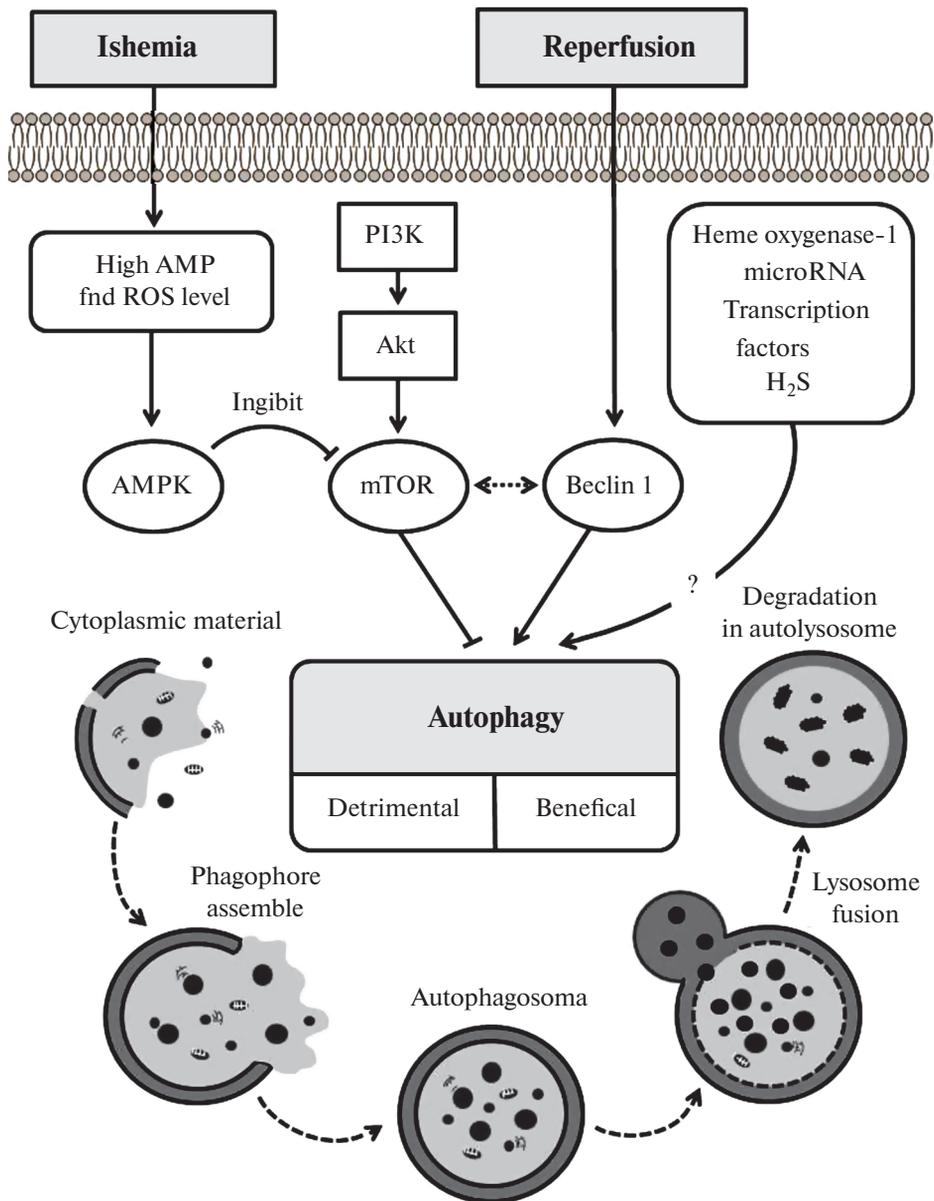
три эпизода ишемии (90 мин), вызванные снижением коронарного кровотока на 30%, вызывают усиление аутофагии, которая, по мнению авторов, способствует снижению интенсивности апоптоза [30]. Авторы считают, что аутофагия – это гомеостатический механизм, который способствует выживанию кардиомиоцитов в условиях И/Р [30]. Как ни парадоксально, но аутофагия может иметь защитное значение при И/Р сердца [13]. Например, у свиней, подвергшихся 45-минутной окклюзии и реперфузии коронарной артерии, индуктор аутофагии хлорамфеникол уменьшал размер инфаркта [31]. Сообщают, что аутофагия активируется в миокарде человека после воздействия И/Р [12]. В исследовании, выполненном в 2014 г., использовали ушко правого предсердия сердца человека, полученное после кардиолегической остановки сердца [12]. Экспрессию Atg оценивали с помощью ПЦР. Оказалось, что И/Р приводит к усилению экспрессии 11-ти и даунрегуляции 3-х из 84-х белков Atg. Усиливается шаперон-опосредованная аутофагия, о чем свидетельствует увеличение уровня HSPA8, HSP90AA1. Соотношение LC3-II/LC3-I также увеличивается [12]. Представленные данные свидетельствуют, что И/Р сердца человека способствует появлению аутофагии. В исследовании, выполненном на мышцах, воспроизводили коронароокклюзию (120 мин) или коронароокклюзию (30 мин) и реперфузию (90 мин) [32]. Ишемия не влияла на уровень маркеров аутофагии LC3-II, P62, беклина-1 и LAMP2 (lysosome-associated membrane protein-2). Во время реперфузии уровень LC3-II, P62, беклина-1 увеличивался, а уровень LAMP2 снижался [32]. Стимуляцию аутофагии в ответ на И/Р сердца отмечают другие исследователи [19, 33–38]. Активация аутофагии наблюдается в ответ на гипоксию/реоксигенацию изолированных кардиомиоцитов [36, 39–42].

Следует отметить, что некоторым исследователям не удалось обнаружить усиление аутофагии кардиомиоцитов в ответ на гипоксию/реоксигенацию [43]. У мышей вызывали коронароокклюзию (1 и 4 ч) и реперфузию (24 ч). Кроме того, использовали непрерывную коронароокклюзию (24 ч). Ни в одном из этих случаев не было обнаружено увеличение соотношения LC3-II/LC3-I [44]. Изолированные неонатальные кардиомиоциты крыс и кардиомиобласты H9c2 подвергали гипоксии/реоксигенации (Г/Р) [45]. Г/Р вызывала увеличение экспрессии беклина-1 и LC3-II у неонатальных кардиомиоцитов, но снижала уровень этих маркеров аутофагии в клетках H9c2. Есть данные о том, что И/Р сердца *in vivo* вызывает снижение интенсивности аутофагии [46].

Таким образом, большинство данных свидетельствует, что И/Р сердца приводит к усилению аутофагического потока (рис. 1).

**Преко́ндициони́рование и постко́ндициони́рование.** Ишемическое преко́ндициони́рование (ИПре) и постко́ндициони́рование (ИПост) – это два феномена, обеспечивающих повышение толерантности сердца к действию длительной И/Р. Преко́ндициони́рование достигается с помощью нескольких сеансов кратковременной И/Р перед длительной ишемией [47]. Постко́ндициони́рование обеспечивает устойчивость сердца к действию реперфузии с помощью нескольких сеансов кратковременной реперфузии/ишемии после длительной ишемии [47]. Дистантное преко́ндициони́рование – это повышение устойчивости сердца к длительной И/Р с помощью кратковременной И/Р дистантного органа [47].

В исследовании, выполненном на изолированном перфузируемом сердце крысы, ИПре воспроизводили с помощью четырех циклов ишемии (5 мин) и реперфузии (10 мин) перед длительной ишемией (30 мин) [48]. Ингибитор PI3-киназы вортманнин вводили внутривенно за 30 мин до изоляции сердца. Преко́ндициони́рование вызвало усиление экспрессии белков, участвующих в аутофагии LC3-II и беклин-1. Кроме того, усиливается экспрессия белка BAG-1 (Bcl-2-associated athanogene), который увеличивает выживаемость клеток в неблагоприятных условиях и является кошапероном, взаимодействующим с Hsc70/Hsp70 (heat shock proteins). Вортманнин устранял кардиопротекторный эффект ИПре и ингибировал экспрес-



**Рис. 1.** Процесс аутофагии и его роль в ишемическом/реперфузионном повреждении кардиомиоцитов.  
**Fig. 1.** The process of autophagy and its role in ischemic/reperfusion injury of cardiomyocytes.

сию LC3-II, беклина-1 и BAG-1. Интрамиокардиальная инъекция BAG-1 siРНК (small interfering RNA) уменьшала индукцию LC3-II и устраняла кардиопротекцию, вызванную ИПре [48]. Исследования проводили на обычных C57BL/6J мышях (wild-type) и животных с нокаутом гена, кодирующего паркин (Parkin<sup>-/-</sup>) [13]. Пре-кондиционирование воспроизводили с помощью трех сеансов ишемии (3 мин) и реперфузии (3 мин), для биохимических исследований сердце иссекали. Длитель-

ную И/Р воспроизводили с помощью коронароокклюзии (20 мин) и реперфузии (22 ч). Прекондиционирование приводило к увеличению экспрессии паркина и накоплению его в митохондриях. Прекондиционирование вызывало увеличение экспрессии белка P62, участвующего в аутофагии. ИПре уменьшало соотношение размер инфаркта/область риска (РИ/ОР) у обычных мышей, но не влияло на РИ/ОР у мышей Parkin<sup>-/-</sup> [13]. Областью риска принято называть зону И/Р. Представленные данные свидетельствуют, что ИПре стимулируют аутофагию, а белок паркин участвует в инфаркт-лимитирующем эффекте прекондиционирования.

Исследование выполнялось на пациентах с коронарным шунтированием, которое включало кардиоплегическую остановку (ишемия) сердца [49]. Дистантное ИПре воспроизводили с помощью трех циклов ишемии (5 мин) и реперфузии (5 мин) левой руки перед разрезом кожи. Трансмуральную миокардиальную биопсию (2–5 мг) забирали перед началом искусственного кровообращения и через 5–10 мин после начала реперфузии. Дистантное ИПре способствовало снижению уровня маркера некроза миокарда тропонина I в сыворотке крови после операции, то есть оказывало кардиопротекторный эффект. В качестве маркеров аутофагии определяли беклин-1, фосфорилированный беклин-1, P62, LC3-II. Исследователям не удалось обнаружить разницу по этим маркерам между группой плацебо и группой дистантного посткондиционирования [49]. Следовательно, кардиопротекторный эффект дистантного прекондиционирования при коронарном шунтировании не зависит от аутофагии. Дистантное ИПре воспроизводили у мышей с помощью четырех циклов ишемии (5 мин) и реперфузии (5 мин) конечностей [50]. Сердце изолировали сразу после прекондиционирования (first window) или через 24 ч после прекондиционирования (отсроченное прекондиционирование) и подвергали глобальной ишемии (30 мин) и реперфузии (60 мин). В обоих случаях прекондиционирование сопровождалось уменьшением размера инфаркта и увеличением давления, развиваемого левым желудочком. При раннем прекондиционировании происходило увеличение количества фосфорилированной p-AMPK (AMP-activated protein kinase), снижение количества фосфорилированной киназы p-mTOR (mammalian target of rapamycin) и повышение соотношения LC3-II/LC3-I при неизменном уровне беклина-1, Atg5 и P62. При отсроченном прекондиционировании происходило снижение количества p-AMPK, p-mTOR, наблюдалось снижение уровня беклина-1 при неизменном уровне Atg5, P62 и соотношения LC3-II/LC3-I. Авторы заключили, что только раннее дистантное прекондиционирование стимулирует аутофагию [50]. В исследовании, выполненном на изолированном перфузируемом сердце крысы, было показано, что прекондиционирование повышает толерантность сердца к действию И/Р [14]. Показано, что прекондиционирование способствовало увеличению соотношения LC3-II/LC3-I при одновременном снижении количества P62, что авторы расценивают как увеличение аутофагического потока. Вортманнин, ингибитор PI3-киназы, устранял усиление аутофагического потока и кардиопротекторный эффект прекондиционирования [14]. Представленные данные свидетельствуют, что кардиопротекторный эффект прекондиционирования может быть следствием активации PI3-киназы и усиления аутофагии. Вместе с тем, есть данные, свидетельствующие о том, что кардиопротекторное действие дистанционного ИПре реализуется без участия аутофагии [49].

Культуру неонатальных кардиомиоцитов подвергали аноксии (30 мин) и реоксигенации (60 мин) [51]. Посткондиционирование воспроизводили с помощью трех циклов реоксигенации (1 мин) и аноксии (1 мин). ИПост уменьшало количество клеток в состоянии некроза, апоптоза и аутофагии. У крыс вызывали коронароокклюзию (30 мин) и реперфузию (30 мин) [52]. Посткондиционирование воспроизводили с помощью трех циклов реперфузии (30 с) и реокклюзии (30 с). Рапамицин, ингибитор киназы mTOR и активатор аутофагии, устранял инфаркт-лимитирующий эффект ИПост. Следовательно, есть основания предполагать, что

ИПост супрессирует аутофагию. Исследования проводили на крысах, выполняли коронароокклюзию (30 мин) и реперфузию (120 мин) [21]. Хлороквин вводили внутрибрюшинно (10 мг/кг) за 90 мин до коронароокклюзии. Ингаляцию севофлураном начинали во время реперфузии. Севофлуран имитировал феномен ИПост и уменьшал соотношение РИ/ОР. Ингибитор аутофагии хлороквин устранял инфаркт-лимитирующий эффект севофлурана, при этом сам не влиял на размер инфаркта [21]. Сходные данные получили другие исследователи, использовавшие севофлуран [33]. У крыс воспроизводили коронароокклюзию (30 мин) и реперфузию (120 мин) [53]. Посткондиционирование моделировали с помощью трех циклов реперфузии (10 с) и ишемии (10 с). Ингибитор аутофагии 3-метиладенин (3-МА) вводили внутрибрюшинно перед ишемией. ИПост приводило к многократному увеличению количества аутофагических вакуолей, увеличению соотношения LC3-II/LC3-I и повышению количества беклина-1 и белка LAMP-2. Посткондиционирование способствовало уменьшению соотношения РИ/ОР примерно на 50%, а 3-МА устранял этот эффект [53]. Эти факты указывают на то, что ИПост стимулирует аутофагию, которая участвует в инфаркт-лимитирующем эффекте посткондиционирования. У крыс воспроизводили коронароокклюзию (30 мин) и реперфузию (1, 2, 3, 6, 12 и 24 ч) [35]. ИПост вызывали с помощью трех циклов реперфузии (30 с) и ишемии (30 с) после длительной ишемии. Ишемия/реперфузия способствовали увеличению соотношения LC3-II/LC3-I, повышению уровня беклина-1, LC3-II и P62, что говорит об активации аутофагии. Посткондиционирование ингибировало аутофагическую активность в первый час реперфузии, усиливало аутофагию в течение 2–6 ч реперфузии, уменьшало аутофагию через 12–24 ч аутофагии согласно величине соотношения LC3-II/LC3-I. Динамика изменения беклина-1 была иной, ИПост увеличивало этот показатель в первый час реперфузии, снижало через 2–6 ч после возобновления кровотока и увеличивало через 12–24 ч. Ингибитор аутофагии хлороквин устранял инфаркт-лимитирующий эффект ИПост при коронароокклюзии и реперфузии (3 ч) [35]. Представленные данные свидетельствуют о том, что ИПост оказывает неоднозначный эффект на аутофагию, которая участвует в инфаркт-лимитирующем эффекте ИПост. У мышей воспроизводили коронароокклюзию (30 мин) и реперфузию (60 мин) [20]. Посткондиционирование индуцировали с помощью трех циклов реперфузии (30 с) и ишемии (30 с). Посткондиционирование H9c2 клеток включало три цикла гипоксии (5 мин) и реоксигенации (5 мин). Посткондиционирование оказывало инфаркт-лимитирующий эффект, 3-МА устранял кардиопротекторное действие ИПост, также действовал ингибитор NO-синтазы (NOS) L-NIO. Посткондиционирование способствовало увеличению соотношения LC3-II/LC3-I и снижению уровня P62. L-NIO устранял этот эффект ИПост. ИПост способствовало увеличению уровня эндотелиальной NOS и p-AMPK, что говорит об активации этих ферментов. Компаунд C, ингибитор AMPK, устранял эти изменения. ИПост увеличивало выживаемость H9c2 клеток в условиях Г/Р, 3-МА устранял этот эффект [20]. Следовательно, кардиопротекторный эффект ИПост связан с активацией аутофагии и повышением активности NOS и AMPK.

Представленные данные свидетельствуют, что ИПост стимулирует аутофагию за счет активации AMPK и Р13-киназы при ингибировании mTOR. Кардиопротекторный эффект ИПост связан с активацией аутофагии и повышением активности NOS и AMPK.

**Половые различия в аутофагии.** У крыс воспроизводили коронароокклюзию (30 мин) и реперфузию (24 ч) [54]. Размер инфаркта и количество апоптотических клеток были существенно меньше у самок, чем у самцов крыс. Ишемия/реперфузия приводила к существенному увеличению соотношения LC3-II/LC3-I у самок крыс. У самцов, напротив, происходило уменьшение соотношения LC3-II/LC3-I [54]. К сожалению, исследователи не определяли другие маркеры аутофагии, поэтому

утверждать, что И/Р приводит к активации аутофагии у самок и ингибированию аутофагии у самцов крыс, нельзя. В исследовании, выполненном на изолированном перфузируемом сердце крысы, выполняли коронароокклюзию (30 мин) и реперфузию (150 мин) [55]. Соотношение РИ/ОР было меньше у самок крыс, чем у самцов этих животных. Гонадэктомия приводит к уменьшению соотношения РИ/ОР у самцов и к увеличению соотношения РИ/ОР у самок. Тестостерон и дигидротестостерон способствовали увеличению соотношения РИ/ОР у самцов, еще более выраженный инфаркт-потенцирующий эффект оказывал  $17\beta$ -эстрадиол. У гонадэктомированных самок тестостерон не оказывал эффекта на размер инфаркта,  $17\beta$ -эстрадиол оказывал инфаркт-лимитирующий эффект. У интактных самцов коронароокклюзия и реперфузия приводила к увеличению уровня р-АМПК, р-mTOR, беклина-1, Atg5 и увеличению соотношения LC3-II/LC3-I. У гонадэктомированных самок после И/Р отмечался только подъем уровня р-mTOR. Представленные данные показывают, что И/Р стимулирует аутофагию, а гонадэктомия ее подавляет. Терапия тестостероном или  $17\beta$ -эстрадиолом не оказывает влияния на аутофагию у самцов при И/Р сердца. У интактных самок при коронароокклюзии и реперфузии также наблюдается подъем уровня р-АМПК, р-mTOR, беклина-1, Atg5 и увеличение соотношения LC3-II/LC3-I. Гонадэктомия у самок приводила к заметному снижению уровня беклина-1, Atg5 и снижению соотношения LC3-II/LC3-I. Применение тестостерона или  $17\beta$ -эстрадиола у гонадэктомированных самок крыс не вызывало заметного усиления аутофагии [55]. Авторы сделали заключение, что половые гормоны регулируют аутофагию у крыс при коронароокклюзии и реперфузии. Следует отметить, что заместительная терапия гормонами не подтверждает эту точку зрения.

Представленные данные показывают, что И/Р стимулирует аутофагию, а гонадэктомия ее подавляет. И/Р сопровождается активацией АМПК (рис. 1).

**Адаптация к гипоксии и аутофагия.** В исследование были включены жители Тибета, жившие на высоте более 3000 м, и 12 граждан Китая народа хань, жившие на высоте менее 500 м [56]. Этим пациентам выполнялось кардиохирургическое вмешательство по поводу дефекта межпредсердной или межжелудочковой перегородки. Операция проводилась в условиях искусственного кровообращения и кардиоплегической остановки сердца, которая по сути является ишемией миокарда. Для исследования использовали ушко правого предсердия, образцы которого забирали до и после операции. Уровень тропонина I после операции был меньше у жителей Тибета, чем у народа хань, это указывает на кардиопротекторный эффект адаптации к гипоксии. У жителей Тибета был выше уровень LC3II и LAMP2 до и после операции. Однако разницы по уровню беклина-1 выявить не удалось. Авторы полагают, что кардиопротекторный эффект адаптации к гипоксии связан с усилением аутофагии [56]. Однако им не удалось обнаружить подъема уровня беклина-1 у жителей Тибета, что не укладывается в гипотезу об усилении аутофагии при адаптации к гипоксии.

Адаптация к гипоксии оказывает кардиопротекторный эффект, который, возможно, связан с активацией аутофагии.

**Метаболический синдром и аутофагия.** Метаболический синдром вызывали у мышей с помощью диеты с высоким содержанием жиров (high-fat diet) [57]. Метаболический синдром способствовал увеличению соотношения РИ/ОР, стимулирует аутофагию рапамицин устранял этот негативный эффект жировой диеты. Нокаут гена, кодирующего белок беклин-1 (beclin-1+/-), устранял инфаркт-лимитирующий эффект рапамицина у мышей с метаболическим синдромом [57]. Этот факт говорит о том, что инфаркт-лимитирующий эффект ингибитора mTOR рапамицина связан с активацией аутофагии. Возможно, что негативный эффект жировой диеты на толерантность сердца к И/Р связан с ингибированием аутофагии.

**Голодание и аутофагия.** Установлено, что голодание перед ишемией миокарда способствовало уменьшению размера инфаркта и стимулировало аутофагию [22]. У мышей индуцировали коронароокклюзию (30 мин) и реперфузию (24 ч) [58].

Часть животных подвергали периодическому голоданию в течение 6 недель. Голодание способствовало уменьшению соотношения РИ/ОР приблизительно на 50%. Этот кардиопротекторный эффект не выявлялся у гетерозиготных мышей с нокаутом белка LAMP2, что подтверждает участие аутофагии в инфаркт-лимитирующем эффекте периодического голодания. Кратковременное (24 или 48 ч) голодание приводило к увеличению соотношения LC3-II/LC3-I и повышению уровня P62 при неизменном уровне LAMP2 и беклина-1. Периодическое голодание не влияло на уровень маркеров аутофагии [58]. К сожалению, исследователи не оценивали влияние ингибиторов аутофагии на инфаркт-лимитирующий эффект периодического голодания, поэтому нельзя утверждать, что этот эффект связан с активацией аутофагии.

Голодание стимулирует аутофагию, этот эффект сопровождается повышением толерантности сердца к действию И/Р.

**Роль активных форм кислорода в аутофагии.** Исследования проводили на изолированных кардиомиоцитах крыс и мышей.  $H_2O_2$  усиливал аутофагию изолированных кардиомиоцитов [59]. Антиоксидант N-2-mercaptopyrionyl glycine (MPG) устранял этот эффект  $H_2O_2$ , что говорит об участии активных форм кислорода (АФК) в индукции аутофагии. У мышей воспроизводили коронароокклюзию (45 мин) и реперфузию (2 и 24 ч). MPG вводили внутривенно за 24 и 1 ч до коронароокклюзии. Миокардиальная И/Р приводила к увеличению количества аутофагосом и аутолизосом. Предварительное введение MPG вызывало уменьшение количества аутофагосом, снижение экспрессии беклина-1 и уменьшение соотношения РИ/ОР [59]. Эти данные указывают на то, что окислительный стресс стимулирует аутофагию, которая принимает участие в И/Р повреждении сердца. Способность  $H_2O_2$  стимулировать аутофагию кардиомиоцитов была подтверждена другими исследователями [60, 61]. “Ловушка” супероксидных радикалов MnTMPyP устраняла подъем уровня LC3-II после И/Р сердца [32]. В исследовании, выполненном на изолированных кардиомиоцитах, MnTMPyP устранял подъем количества аутофагосом, вызванный Г/Р [32]. Эти данные указывают на то, что супероксидный радикал может быть триггером аутофагии. Авторы связывают образование АФК при Г/Р с увеличением экспрессии беклина-1. Снижение уровня беклина-1, по их мнению, способствует процессингу аутофагосом в том числе за счет увеличения уровня белка LAMP2, что снижает гибель клеток при Г/Р [32]. В исследовании, выполненном на изолированных кардиомиоцитах, было показано, что депривация глюкозы вызывает усиление экспрессии НАДФН-оксидазы изоформы Nox-4 [62], которая, как известно, генерирует супероксидный радикал [63]. Поэтому депривация глюкозы сопровождается увеличением продукции АФК, одновременно увеличивается соотношение LC3-II/LC3-I, а уровень белка P62, напротив, снижается. Нокаут Nox-4 приводит к уменьшению количества АФК и уменьшению соотношения LC3-II/LC3-I, а также к снижению уровня P62 и повышению количества аутолизосом [62]. Представленные данные указывают на то, что супероксидный радикал, генерируемый Nox-4, выступает в роли триггера аутофагии. Изолированное сердце морской свинки подвергали глобальной ишемии (30 мин) и реперфузии (150 мин) [64]. Сердце перед ишемией перфузировали в течение 10 мин раствором, содержащим севофлуран. В качестве “ловушки” АФК использовали MPG. Севофлуран способствовал уменьшению размера инфаркта, а MPG устранял этот эффект севофлурана. Севофлуран увеличивал количество аутофагических вакуолей, увеличивал соотношение LC3-II/LC3-I, повышал количество фосфорилированной (активной) АМРК. Антиоксидант MPG устранял все указанные эффекты [64]. Эти данные говорят о том, что АФК и АМРК играют ключевую роль в севофлуран-индуцированной аутофагии.

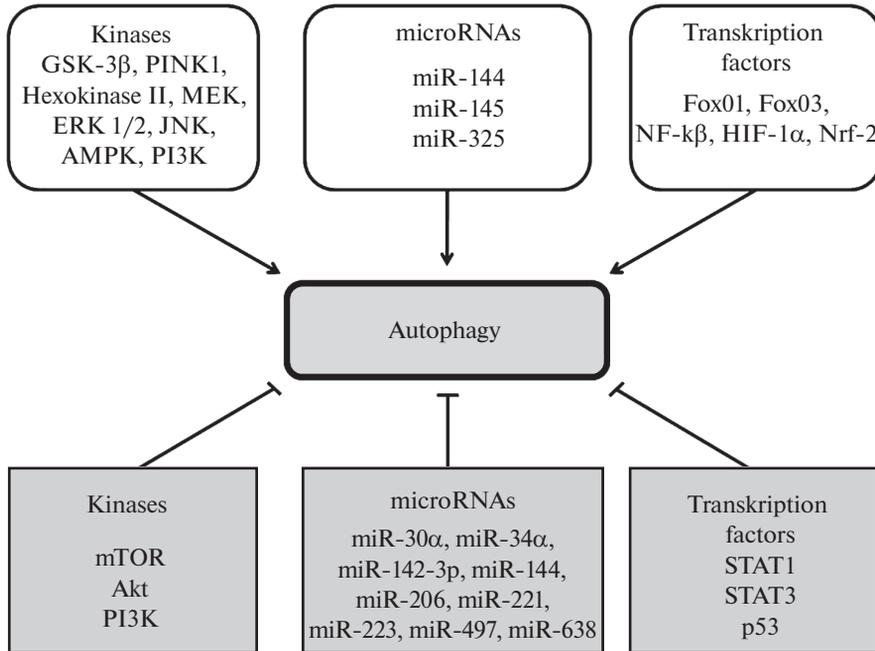
Таким образом, окислительный стресс стимулирует аутофагию при И/Р сердца. Супероксидный радикал, генерируемый Nox-4, выступает в роли триггера аутофагии, по-видимому, за счет активации АМРК (рис. 1).

**Роль киназ в аутофагии.** В экспериментах на изолированных кардиомиоцитах имитировали ишемию, удаляя из среды инкубации глюкозу, что приводило к появлению аутофагии [65]. Ингибитор аутофагии 3-метиладенин снижал выживаемость кардиомиоцитов в условиях депривации глюкозы. Ингибирование АМПК приводило к угнетению аутофагии [65]. Эти факты говорят о том, что АМПК играет пусковую роль в аутофагии, а аутофагия играет протекторную роль в условиях депривации глюкозы. Известно, что ингибирование GSK-3 $\beta$  (glycogen synthase kinase-3 $\beta$ ) защищает сердце от действия И/Р [47]. Исследования проводили на обычных мышах (wild-type); на трансгенных мышах с доминантной мутацией гена, кодирующего GSK-3 $\beta$  (Tg-DnGSK-3 $\beta$ ); гетерозиготных “нокаутированных” мышах (GSK-3 $\beta$ +/-) и на мышах с генетической активацией GSK-3 $\beta$  ( $\beta$ KI) [47]. Генетическое ингибирование GSK-3 $\beta$  приводило к уменьшению соотношения РИ/ОР. Активация GSK-3 $\beta$ , напротив, способствовала увеличению соотношения РИ/ОР. Ингибирование GSK-3 $\beta$  снижало аутофагию по рапамицин-чувствительному (mTOR-зависимому) механизму. Рапамицин усиливал аутофагию и устранял кардиопротекторный эффект генетического ингибирования GSK-3 $\beta$  [47]. Авторы полагают, что ингибирование GSK-3 $\beta$  повышает толерантность сердца к И/Р за счет ингибирования аутофагии. Следующее исследование проводили на обычных мышах (wild-type) и животных mTOR-Tg с избыточной экспрессией mTOR [66]. Ишемическое и реперфузионное повреждение сердца воспроизводили на двух моделях: (1) *in vivo* коронароокклюзия и реперфузия; (2) *in vitro* глобальная И/Р изолированного сердца. Смертность в течение 28 дней была меньше у mTOR-Tg по сравнению с обычными мышами. Эхокардиографическое исследование выявило, что функция сердца лучше сохраняется у mTOR-Tg. Исследование *in vitro* показало, что функциональное восстановление улучшается в сердцах mTOR-Tg [66]. У трансгенных мышей меньше соотношение РИ/ОР. Экспрессия провоспалительных цитокинов меньше у mTOR-Tg. Эти данные указывают на то, что избыточная экспрессия ингибитора аутофагии mTOR оказывает кардиопротекторный и противовоспалительный эффект. Показано, что И/Р ушка правого предсердия человека сопровождается активацией аутофагии, появлением фосфорилированной (активной) АМПК и снижением экспрессии mTOR, которая ингибирует аутофагию [12]. Следующее исследование было сделано на клетках H9c2, которые подвергали воздействию гипоксии (8 ч) реоксигенации. Ацетилхолин использовали в качестве цитопротекторного соединения [67]. Ацетилхолин-индуцированная аутофагия сопровождалась увеличением уровня фосфорилированной (активной) АМПК и снижением уровня фосфорилированной киназы mTOR. АМПК siРНК способствовала снижению LC3-II/LC3-I и сопровождалась исчезновением цитопротекторного эффекта ацетилхолина. Эти данные показывают важную роль АМПК в индукции аутофагии. Атипичная серин/треонинкиназа mTOR представлена двумя изоформами: mTORC1 и mTORC2 [68]. В регуляции аутофагии принимает участие mTORC1 [68]. Известно, что киназа JNK (c-Jun N-terminal kinase) участвует в активации апоптоза и вовлечена в повреждение сердца при И/Р [69]. Показано, что митохондриальная JNK индуцирует аутофагию, апоптоз и усугубляет ишемическое и реперфузионное повреждение сердца [69]. Вортманнин, ингибитор PI3-киназы, не влиял на уровень LC3-II в изолированных кардиомиоцитах в условиях нормоксии и аноксии/реоксигенации [39]. Установлено, что Г/Р кардиомиоцитов H9c2 приводит к появлению p-АМПК и p-mTOR [36]. Коронароокклюзия без реперфузии приводила к активации аутофагии, повышению уровня p-АМПК и снижению содержания p-mTOR в миокарде [37]. Изолированные неонатальные кардиомиоциты мышей подвергали Г/Р [70]. Активатор АМПК РТ1 и ингибитор mTOR ЗНО1-ВА-01 стимулировали аутофагию и повышали выживаемость кардиомиоцитов в условиях Г/Р. Эти данные подтверждают участие АМПК и mTOR в регуляции аутофагии. В исследовании, выполненном на изолированных кардиомиоцитах мыши,

было показано, что Г/Р приводит к увеличению уровня беклина-1, LC3-II, снижению уровня p62, что рассматривается исследователями как активация аутофагии [71]. Ингибитор ERK киназы U0126 вызывал прямо противоположные изменения. Авторы полагают, что активация киназ MEK и ERK приводит к стимуляции аутофагии кардиомиоцитов в условиях Г/Р. Показано, что симвастатин оказывает кардиопротекторный эффект у пациентов с кардиохирургическим вмешательством, сопровождающимся И/Р сердца [17]. Симвастатин ингибировал аутофагию и увеличивал уровень p-AMPK. Авторы заключили, что симвастатин уменьшает повреждение миокарда за счет ингибирования аутофагии и активации AMPK [17]. Совместное культивирование васкулярных гладкомышечных клеток (ВГК) способствует выживанию клеток H9c2 в условиях гипоксии [18]. Цитопротекторный эффект осуществляется за счет секреции bFGF (basic fibroblast growth factor), который активирует PI3-киназу и киназу Akt. Эти киназы, по мнению исследователей, ингибируют аутофагию и апоптоз кардиомиоцитов [18].

Таким образом, есть основания полагать, что AMPK, GSK-3 $\beta$ , JNK, MEK и ERK стимулируют аутофагию, а mTOR, Akt и PI3-киназа ингибируют аутофагию при И/Р сердца (рис. 1, 2). Вместе с тем, есть данные о том, что PI3-киназа является триггером аутофагии [48].

**Роль транскрипционных факторов в аутофагии.** Показано, что избыточная экспрессия транскрипционных факторов FoxO1 и FoxO3 усиливает аутофагию в кардиомиоцитах [29]. Изучали роль транскрипционного фактора STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1) в аутофагии [72]. Было показано, что нокаут гена, кодирующего STAT1, способствует уменьшению размера инфаркта миокарда, что сопровождается увеличением соотношения LC3-II/LC3-I, увеличением экспрессии белков Atg12 и беклин-1, участвующих в аутофагии. Ингибитор аутофагии 3-метиладенин устранял кардиопротекторный эффект дефицита STAT1 [72]. Представленные данные указывают на то, что STAT1 контролирует процессы аутофагии, которые играют протекторную роль при И/Р сердца. Другое исследование проводили на обычных мышцах (wild-type) и мышцах с нокаутом гена *TP53* p53(-/-) [73]. Через 8 ч после коронароокклюзии у мышей p53(-/-) количество аутофагических вакуолей, содержащих митохондрии, в пограничной зоне было в 5 раз больше, чем у обычных мышей. Через 28 дней после перманентной коронароокклюзии область фиброза у мышей p53(-/-) была на 34% меньше, чем у обычных мышей. У нокаутированных мышей в зоне инфаркта было меньше TUNEL-позитивных (апоптотических) клеток. Ингибитор аутофагии хлороквин устранял антапоптотический эффект у мышей p53(-/-) и устранял позитивный эффект нокаута гена *TP53* в отношении постинфарктного ремоделирования сердца [73]. Эти факты говорят о том, что транскрипционный фактор p53 может регулировать процессы аутофагии и апоптоза во время ишемии миокарда. Установлено, что транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B cells) участвует в аутофагии [74]. У кроликов воспроизводили коронароокклюзию (1.5 ч) и реперфузию (1 ч). Ишемия/реперфузия приводила к увеличению уровня малонового диальдегида (МДА) в области риска и в зоне невосстановленного кровотока. Ингибитор NF- $\kappa$ B (pyrrolidine dithiocarbamate (PDTС)) устранял подъем уровня МДА. Ишемия/реперфузия приводила к увеличению в области риска уровня p65, который является субъединицей NF- $\kappa$ B. Уровень беклина-1 также увеличивался в зоне риска. Ингибитор NF- $\kappa$ B PDTС устранял подъем уровня p65 и беклина-1 [74]. Представленные данные свидетельствуют, что И/Р способствует активации NF- $\kappa$ B, увеличению продукции АФК и стимуляции аутофагии. Транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B, по всей видимости, способствует аутофагии. Данные других исследователей подтверждают эту точку зрения [75]. В исследовании, выполненном на мышцах, воспроизводили коронароокклюзию (30 мин) и реперфузию (24 ч) [75]. Исследование проводили на обычных мышцах (wild-type) и трансгенных животных с



**Рис. 2.** Роль киназ, транскрипционных факторов и микроРНК в регуляции аутофагии кардиомиоцитов в условиях ишемии/реперфузии сердца.

**Fig. 2.** The role of kinases, transcription factors and miRNAs in the regulation of autophagy of cardiomyocytes in conditions of ischemia/reperfusion of the heart.

доминантной негативной мутацией IκBα (2M), что приводило к нарушению экспрессии NF-κB. Кратковременная диета, богатая жирами (a high-fat diet), в течение 24 ч, 7 дней оказывала инфаркт-лимитирующий эффект, который исчезал, если диета продолжалась в течение 6 недель. Высокожировая диета приводила к усилению экспрессии беклина-1 и LC3. Мутация IκBα приводила к исчезновению инфаркт-лимитирующего эффекта жировой диеты и уменьшению уровня беклина-1 и LC3 [75]. Представленные данные свидетельствуют, что NF-κB принимает участие в кардиопротекторном эффекте жировой диеты. Кроме того, эти данные позволяют утверждать, что NF-κB регулирует аутофагию. Исследование проводили на кардиомиобластах H9c2, которые подвергали Г/Р [76]. Было показано, что Г/Р приводит к увеличению соотношения LC3-II/LC3-I, повышению уровня беклина-1, Atg5, Atg6. Избыточная экспрессия HIF-1α (hypoxia-inducible factor 1α) в этих условиях приводила к дальнейшему усилению аутофагии, а нокаут HIF-1α вызывал ингибирование аутофагии. Индуктор аутофагии рапамицин повышал выживаемость клеток H9c2 в условиях Г/Р, так же действовала избыточная экспрессия HIF-1α. Нокаут HIF-1α способствовал гибели клеток в условиях Г/Р [76]. Эти данные свидетельствуют, что HIF-1α стимулирует аутофагию кардиомиоцитов, что может способствовать увеличению их выживаемости в условиях Г/Р.

Установлено, что экспрессия транскрипционных факторов FoxO1, FoxO3, NF-κB и HIF-1α усиливает аутофагию при И/Р сердца (рис. 1, 2). Транскрипционные факторы STAT1 и p53 ингибируют аутофагию в условиях И/Р сердца.

**МикроРНК и аутофагия.** МикроРНК – это некодирующие короткие молекулы РНК, способные ингибировать трансляцию мРНК [77]. Показано, что коронаро-окклюзия (30 мин) и реперфузия (2 ч) способствуют увеличению уровня LC3-II в

миокарде [78]. Кроме того, исследователи установили, что И/Р способствует снижению в миокарде уровня miR-204, которая регулирует экспрессию LC3-II. Исследование, выполненное на трансгенных мышцах с избыточной экспрессией miR-325, показало, что повышение уровня miR-325 способствует увеличению соотношения LC3-II/LC3-I и размера инфаркта при коронароокклюзии и реперфузии [79]. Нокаут miR-325, напротив, ингибирует аутофагию. Дистантное preconditionирование воспроизводили у мышей с помощью четырех циклов ишемии (5 мин) и реперфузии (5 мин) конечностей перед изоляцией сердца [80]. Изолированное сердце подвергали глобальной ишемии (30 мин) и реперфузии (60 мин). Дистантное ИПре способствовало увеличению уровня miR-144 в миокарде, а И/Р вызывала снижение уровня miR-144 почти до нуля. Preconditionирование приводило к уменьшению размера инфаркта, а внутривенное введение анти-miR-144 устраняло этот кардиопротекторный эффект. Внутривенное введение miR-144 вызывало уменьшение размера инфаркта. miR-144 способствовала уменьшению уровня фосфорилированной mTOR и mTOR, увеличивала уровень Atg5 и катепсина L, соотношение LC3-II/LC3-I и уровень P62 при этом не менялись [80]. Представленные данные свидетельствуют о том, что miR-144 повышает толерантность сердца к действию И/Р и стимулирует аутофагию. Исследование было выполнено на мышцах и изолированных кардиомиоцитах крыс [81]. У мышей воспроизводили коронароокклюзию (45 мин) и реперфузию (24 ч). Кардиомиоциты подвергали аноксии (3–24 ч) и реоксигенации (2 ч). С помощью трансфекции индуцировали избыточную экспрессию miR-497 в кардиомиоцитах или, наоборот, снижали экспрессию miR-497. С помощью аденовирусной плазмиды индуцировали избыточную экспрессию miR-497 *in vivo* или, напротив, подавляли экспрессию miR-497. Ингибирование экспрессии miR-497 способствовало уменьшению соотношения РИ/ОР, а избыточная экспрессия miR-497 вызывала увеличение соотношения РИ/ОР. Избыточная экспрессия miR-497 снижала выживаемость кардиомиоцитов при аноксии/реоксигенации, способствовала снижению уровня LC3-II, беклина-1, антиапоптотического белка Bcl-2, снижала количество аутофагосом и усиливала апоптоз кардиомиоцитов во время аноксии/реоксигенации. Подавление экспрессии miR-497 снижало апоптоз кардиомиоцитов во время аноксии/реоксигенации и способствовало увеличению уровня LC3-II, беклина-1, Bcl-2 и уменьшало уровень P62 и проапоптотического белка Bax [81]. Представленные данные свидетельствуют, что miR-497 снижает устойчивость кардиомиоцитов к Г/Р, усиливает апоптоз и ингибирует аутофагию кардиомиоцитов. Другое исследование было выполнено на пациентах с острым инфарктом миокарда (ОИМ) и кардиомиобластах H9c2, которые подвергали гипоксии (0,5, 2, 4, 12 и 24 ч) [41]. В экзосомах больных ОИМ было обнаружено большое количество miR-30a, эта же РНК была найдена в культуральной среде клеток H9c2 после воздействия гипоксии. Кратковременная гипоксия (4 и 12 ч) не влияла на уровень miR-30a в кардиомиобластах. В экзосомах в культуральной среде клеток H9c2 miR-30a повышалась уже через 4 ч гипоксии. Диметиламмонид, ингибитор формирования экзосом, предупреждал появление miR-30a в экзосомах. Гипоксия/реоксигенация приводила к усилению экспрессии Atg12, беклина-1 и увеличению соотношения LC3-II/LC3-I. Максимум изменений наблюдался через 30 мин и 2 ч гипоксии. Ингибирование экспрессии miR-30a вело к усилению аутофагии [41]. Представленные данные указывают на то, что miR-30a ингибирует аутофагию кардиомиоцитов в условиях Г/Р. Кардиомиобласты H9c2 и неонатальные кардиомиоциты крыс подвергали Г/Р [82]. Использовали трансфекцию miR-221 и ингибитор miR-221-i. Было показано, что miR-221 оказывает цитопротекторный эффект, снижает соотношение LC3-II/LC3-I, уменьшает количество аутофагосом, повышает уровень P62 и не влияет на уровень беклина-1. miR-221-i повышает соотношение LC3-II/LC3-I и уровень P62 [82]. Следовательно, miR-221 оказывает цитопротекторный эффект и ингибирует аутофагию. У крыс индуцировали коро-

нароокклюзию (30 мин) и реперфузию (120 мин) [46]. Фактор роста фибробластов (FGF21) вводили внутрибрюшинно в течение 4 недель. FGF21 оказывал инфаркт-лимитирующий и антиапоптотический эффект. Исследователи обнаружили снижение в миокарде уровня miR-145, беклина-1 и снижение соотношения LC3-II/LC3-I при И/Р сердца, то есть было обнаружено угнетение аутофагии. FGF21 повышал уровень miR-145 и стимулировал аутофагию. В исследовании, выполненном на H9c2 клетках, которые подвергали Г/Р, было показано, что FGF21 увеличивает уровень беклина-1 и соотношение LC3-II/LC3-I. Трансфекция клеток ингибитором miR-145 (miR-145 inhibitor) приводила к ингибированию аутофагии, индуцированной FGF21. Ингибитор miR-145 устранял антиапоптотический эффект FGF21 *in vitro* [46]. Представленные данные свидетельствуют, что кардиопротекторный эффект FGF21 может быть следствием увеличения уровня miR-145, которая стимулирует аутофагию. Кардиомиоциты человека подвергали гипоксии (4 ч) и реоксигенации (4 ч) [83]. С помощью трансфекции обеспечивали избыточную экспрессию miR-638 или ингибирование экспрессии miR-638. Г/Р вызвала гибель кардиомиоцитов, апоптоз и снижение уровня miR-638. В условиях Г/Р избыточная экспрессия miR-638 способствовала увеличению выживаемости и снижала апоптоз кардиомиоцитов. Избыточная экспрессия miR-638 способствовала снижению уровня Atg5, а miR-638-ингибитор увеличивал уровень Atg5. К сожалению, исследователи не определяли другие маркеры аутофагии [83]. Представленные данные указывают на то, что miR-638 повышает толерантность кардиомиоцитов к Г/Р и, возможно, ингибирует аутофагию.

Таким образом, установлено, что miR-325 и miR-144 имитируют аутофагию при И/Р сердца. miR-325 увеличивает размер инфаркта. miR-144 повышает толерантность сердца к действию И/Р. miR-497 снижает устойчивость кардиомиоцитов к Г/Р, усиливает апоптоз и ингибирует аутофагию кардиомиоцитов. miR-30a ингибирует аутофагию кардиомиоцитов в условиях Г/Р. miR-221 оказывает цитопротекторный эффект и ингибирует аутофагию. miR-145 стимулирует аутофагию *in vitro*. Таким образом, miR-325, miR-145 и miR-144 имитируют аутофагию, а miR-30a, miR-221, miR-638 и miR-144 ингибируют этот процесс (рис. 1, 2).

**H<sub>2</sub>S как регулятор аутофагии.** В исследовании, выполненном на крысах, воспроизводили коронароокклюзию (30 мин) и реперфузию (4 ч) [19]. Использовали H<sub>2</sub>S-донор ADT (5-(4-methoxyphenyl)-3H-1,2-dithiole-3-thione) и ингибитор АМПК компаунд С. И/Р приводила к увеличению в миокарде уровня беклина-1, P62, соотношения LC3-II/LC3-I при снижении уровня LAMP-2. ADT при И/Р ограничивал размер инфаркта, способствовал увеличению уровня р-АМПК, вызывал снижение уровня беклина-1, P62, соотношения LC3-II/LC3-I и повышал уровень LAMP-2. В то же время ADT не влиял на уровень маркеров аутофагии у ложно-оперированных животных. Компаунд С устранял инфаркт-лимитирующий эффект ADT, снижал уровень р-АМПК, нивелировал изменения маркеров аутофагии, вызванные введением ADT, что свидетельствует об участии АМПК в развитии эффектов ADT [19]. Представленные данные свидетельствуют, что H<sub>2</sub>S способствует ингибированию аутофагии и повышению толерантности сердца к действию И/Р. Дальнейшие исследования проводили на изолированных неонатальных кардиомиоцитах крыс, которые подвергали гипоксии (24 ч) и реоксигенации (6 ч) [40]. В качестве донора H<sub>2</sub>S использовали NaHS. Было показано, что H<sub>2</sub>S увеличивает выживаемость кардиомиоцитов и ингибирует аутофагию. Ингибитор PI3-киназы LY294002 устранял ингибирование аутофагии и ослаблял, но не устранял цитопротекторный эффект H<sub>2</sub>S. Представленные данные свидетельствуют, что PI3-киназа участвует в цитопротекторном эффекте H<sub>2</sub>S и обеспечивает ингибирование аутофагии под действием H<sub>2</sub>S. Кроме того, способность H<sub>2</sub>S ингибировать аутофагию связывают с активацией mTOR [84]. Вместе с тем, есть данные о том, что H<sub>2</sub>S может стимулировать аутофагию, если исследование проводилось на старых животных [85].

Представленные данные свидетельствуют, что  $H_2S$  повышает толерантность сердца к действию И/Р и может ингибировать аутофагию у молодых животных, но стимулирует аутофагию у старых животных (рис. 1).

**Гемоксигеназа-1 и аутофагия.** Известно, что гемоксигеназа-1 (ГО-1) оказывает антиапоптотический эффект за счет синтеза СО [86]. В исследовании, выполненном на клетках H9c2, которые подвергали Г/Р, было показано, что избыточная экспрессия ГО-1 способствует увеличению уровня LC3II и снижению уровня P62. Кроме того, ГО-1 предупреждала падение митохондриального мембранного потенциала, а уровень АФК в митохондриях снижался. Авторы сделали вывод, что ГО-1 стимулирует аутофагию и предупреждает повреждение митохондрий при Г/Р [86] (рис. 1).

**Позитивная и негативная роль аутофагии.** Изолированное перфузируемое сердце кролика подвергали гипоксической перфузии (95%  $N_2$  + 5%  $CO_2$ ) в течение 20, 40 и 60 мин [27]. При часовой гипоксической перфузии повреждения носили необратимый характер. Реперфузия сердца после гипоксической перфузии вела к усилению аутофагии. Авторы предположили, что аутофагия играет важную роль в репарации кардиомиоцитов во время реоксигенации [27]. В исследовании, выполненном в 2010 г, свиней подвергали коронароокклюзии (45 мин) и реперфузии (3 ч). Стимулятор аутофагии хлорамфеникол (20 мг/кг) вводили до ишемии [31]. Кроме того, хлорамфеникол вводили через 30 мин после окклюзии. Хлорамфеникол уменьшал соотношение РИ/ОР как при введении перед ишемией, так и при инъекции после ишемии. При введении перед ишемией инфаркт-лимитирующий эффект был сильнее, чем при инъекции после ишемии. Хлорамфеникол усиливал экспрессию беклина-1 и LC3-II. Эти факты указывают на то, что инфаркт-лимитирующий эффект хлорамфеникола может быть следствием стимуляции аутофагии. По мнению авторов, индукция аутофагии может быть новой стратегией, направленной на повышение толерантности сердца к действию И/Р [31, 87]. Полагают, что активация аутофагии во время ишемии важна для выживания клеток и сохранения функции сердца [23]. Считают, что активация аутофагии во время реперфузии может быть протекторной либо повреждающей в зависимости от экспериментальной модели [23]. Показано, что индуктор аутофагии рапамицин улучшал сократимость изолированного сердца во время реперфузии [88]. Бафиломидин, ингибитор аутофагии, увеличивал размер инфаркта при коронароокклюзии [22]. Показано, что рапамицин оказывает инфаркт-лимитирующий эффект у мышей [57]. Индуктор аутофагии рапамицин не влиял на смерть изолированных кардиомиоцитов во время реоксигенации, а ингибитор аутофагии хлороквин усиливал гибель кардиомиоцитов во время реоксигенации [32]. Вместе с тем, есть данные о том, что хлороквин не влияет на соотношение РИ/ОР при коронароокклюзии и реперфузии [21, 33]. Показано, что рапамицин у мышей с коронароокклюзией (35 мин) и реперфузией (4 ч) стимулирует аутофагию, уменьшает соотношение РИ/ОР на 45% и снижает интенсивность апоптоза в зоне риска [89]. Эти факты указывают на то, что аутофагия имеет протекторное значение при И/Р сердца. Однако к результатам исследований с использованием рапамицина нужно относиться осторожно, поскольку есть данные о том, что его кардиопротекторный эффект может быть связан с активацией p13-киназы и митохондриальных АТФ-чувствительных  $K^+$ -каналов, а не с блокадой mTOR [90]. Клетки H9c2 подвергали воздействию гипоксии (8 ч) реоксигенации (4, 8, 12 и 16 ч). По мере увеличения продолжительности реоксигенации снижалось количество аутофагосом и уменьшалось количество жизнеспособных клеток [67]. Ацетилхолин во время реоксигенации увеличивал количество аутофагосом и соотношение LC3-II/LC3-I, но уменьшал количество белка P62, что авторы расценивают как усиление аутофагического потока. Атропин устранял эти эффекты ацетилхолина, что говорит об участии М-холинорецепторов. Индукция аутофагии коррелировала с увеличением выживаемости клеток и уменьшением апоптоза. Ингибирование аутофагии с помощью хлороквина или Atg7 siРНК сопровождалось ослабле-

нием цитопротекторного эффекта ацетилхолина [67]. Эти данные свидетельствуют о цитопротекторном эффекте аутофагии. Другое исследование было выполнено на неонатальных кардиомиоцитах мыши, которые подвергались Г/Р [91]. Показано, что активатор АМПК D942 и неселективный ингибитор mTOR куркумин стимулировали аутофагию и повышали выживаемость кардиомиоцитов в условиях Г/Р. Эти данные указывают на протекторную роль аутофагии. У крыс воспроизводили коронароокклюзию (30 мин) и реперфузию (120 мин) [92]. Антагонист рецепторов ангиотензина II валсартан вводили ежедневно в течение 7 дней до коронароокклюзии. Валсартан способствовал уменьшению соотношения РИ/ОР и увеличивал соотношение LC3-II/LC3-I. Ингибитор аутофагии 3-МА устранял инфаркт-лимитирующий эффект валсартана и устранял подъем соотношения LC3-II/LC3-I [92]. Эти данные указывают на то, что кардиопротекторный эффект валсартана может быть следствием активации аутофагии. Исследования проводили на обычных мышцах (wild-type) и нокаутированных животных (*Perkin<sup>-/-</sup>*) [93]. Симвастатин вводили внутривентриально за 4 ч до коронароокклюзии (20 мин) и реперфузии (22 ч). Симвастатин оказывал инфаркт-лимитирующий эффект у обычных мышей, но не влиял на размер инфаркта у нокаутированных животных. Представленные данные показывают, что паркин и митофагия играют позитивную роль в инфаркт-лимитирующем эффекте симвастатина. Следующее исследование проводили на мышцах и кроликах с коронароокклюзией и реперфузией [94]. Кроме того, проводили исследования на изолированных неонатальных кардиомиоцитах крыс, которые подвергались Г/Р. Использовали ингибитор гистондиацетилазы SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid), который ограничивал размер инфаркта. SAHA снижал смерть клеток на 40%. SAHA индуцировал увеличение LC3-II, повышал количество аутофагосом и аутолизосом в пограничной зоне инфаркта. Atg5 siРНК и Atg7 siРНК устраняли цитопротекторный SAHA [94]. Эти данные указывают на то, что усиление аутофагии под действием SAHA может иметь отношение к его цитопротекторному эффекту. Изолированное предсердие крысы подвергали ишемии (75 мин) и реперфузии (75 мин) [95]. Ингибирование аутофагии с помощью 3-МА способствовало увеличению частоты возникновения тахикардий во время реперфузии и снижало инотропный эффект стимуляции  $\beta$ -адренорецепторов [95]. Перманентная коронароокклюзия вызывала у мышей в первый день повышение уровня беклина-1 и соотношения LC3-II/LC3-I, позднее эти показатели возвращались к значениям, характерным для ложнооперированных животных [96]. Ежедневно животным вводили рапамицин или 3-МА. Активатор аутофагии рапамицин способствовал уменьшению размера инфаркта через 7 и 21 дней после окклюзии. Кроме того, рапамицин способствовал увеличению фракции выброса левого желудочка. 3-Метилгладенин, напротив, увеличивал размер инфаркта через 7 и 21 дней после окклюзии. Авторы заключили, что рапамицин ослабляет, а 3-МА усугубляет постинфарктное ремоделирование сердца. Аутофагия является механизмом, который защищает сердце от неблагоприятного ремоделирования [96]. Будет ли фармакологический агент, стимулирующий аутофагию, повышать толерантность кардиомиоцитов к Г/Р или, напротив, усугублять гибель клеток, во многом зависит от использованной модели Г/Р. Так, показано, что индуктор аутофагии рапамицин увеличивал выживаемость неонатальных кардиомиоцитов крысы в условиях аноксии (6 ч) и реоксигенации (4 ч), но снижал выживаемость кардиомиоцитов, если продолжительность аноксии составляла 24 ч с последующей реоксигенацией [39]. Показано, что рапамицин повышает выживаемость клеток H9c2 в условиях Г/Р [76]. Кардиопротекторный эффект многих соединений связывают с усилением аутофагии [97–103].

Вместе с тем, есть данные о том, что аутофагия усугубляет ишемическое и реперфузионное повреждение сердца. Изолированные неонатальные кардиомиоциты и кардиомиоциты взрослых крыс подвергали Г/Р, что вызывало активацию аутофагии [25]. Авторы использовали siРНК, которая ингибирует экспрессию

беклина-1. Оказалось, что эта РНК ингибировала аутофагию кардиомиоцитов и увеличивала выживаемость клеток в условиях Г/Р. Пептид урокортин, который повышает толерантность кардиомиоцитов к действию Г/Р, также ингибировал аутофагию и экспрессию беклина-1 [25]. Этот эффект урокортина был связан с активацией PI3-киназы/Akt-киназы и не зависел от киназы ERK1/2. Исследования проводили на изолированном перфузируемом сердце мыши, которое подвергали глобальной ишемии (25 мин) и реперфузии (80 мин) [104]. Было обнаружено, что уровень беклина-1 и соотношение LC3-II/LC3-I выше в сердцах с фибрилляцией по сравнению с сердцами без фибрилляции. Этот результат позволил авторам сделать вывод о возможной взаимосвязи фибрилляции желудочков и аутофагии [104]. Гипоксия/реоксигенация клеток H9c2 приводила к увеличению экспрессии беклина-1 и увеличению соотношения LC3-II/LC3-I [105]. Липоиковая кислота ингибировала аутофагию и увеличивала выживаемость клеток. Эти данные говорят о негативной роли аутофагии в регуляции толерантности кардиомиоцитов к действию Г/Р [105]. Показано, что белок нетрин-1 в дозе 5 и 10 мкг/кг уменьшал соотношение RI/OR, но не влиял на размер инфаркта в дозе 50 мкг/кг [106]. Кроме того, нетрин-1 снижал соотношение LC3-II/LC3-I, что авторы расценивают, как ингибирование аутофагии. Эти данные показывают, что препарат может ограничивать размер инфаркта и одновременно угнетать аутофагию. Показано, что улинастатин (ulinastatin) повышает толерантность сердца крыс к действию И/Р *in vivo* [107]. Этот эффект сопровождался снижением соотношения LC3-II/LC3-I и фосфорилированием mTOR. Следовательно, инфаркт-лимитирующий эффект улинастатина сопровождается снижением интенсивности аутофагии. Есть данные о том, что кальцитриол, активная форма витамина D, повышает устойчивость сердца к И/Р, ингибируя апоптоз и аутофагию кардиомиоцитов [108]. Список статей, в которых различные соединения оказывают кардиопротекторный эффект и ингибируют аутофагию, можно продолжить [16, 18, 19, 34, 36, 38, 83, 109–111]. Эти соединения часто ингибируют не только аутофагию, но и апоптоз [16, 18, 34, 38, 83, 110].

Следовательно, активация аутофагии во время И/Р может быть протекторной или повреждающей в зависимости от экспериментальной модели.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Большинство данных свидетельствует, что И/Р сердца приводит к усилению аутофагического потока. Представленные данные показывают, что ИПре стимулирует аутофагию за счет активации AMPK и PI3-киназы при ингибировании mTOR. Кардиопротекторный эффект ИПост связан с активацией аутофагии и повышением активности NOS и AMPK. И/Р стимулирует аутофагию, а гонадэктомия ее подавляет. Адаптация к гипоксии оказывает кардиопротекторный эффект, который, возможно, связан с активацией аутофагии. Возможно, что негативный эффект жировой диеты на толерантность сердца к И/Р связан с ингибированием аутофагии. Голодание стимулирует аутофагию, этот эффект сопровождается повышением толерантности сердца к действию И/Р. Окислительный стресс стимулирует аутофагию при И/Р сердца. Супероксидный радикал, генерируемый Nox-4, выступает в роли триггера аутофагии, по-видимому, за счет активации AMPK. Есть основания полагать, что AMPK, GSK-3 $\beta$ , JNK, MEK и ERK стимулируют аутофагию, а mTOR, Akt и PI3-киназа ингибируют этот процесс при И/Р сердца. Вместе с тем, есть данные о том, что PI3-киназа является триггером аутофагии. Установлено, что экспрессия транскрипционных факторов FoxO1, FoxO3, NF- $\kappa$ B и HIF-1 $\alpha$  усиливает аутофагию при И/Р сердца. Транскрипционные факторы STAT1 и p53 ингибируют аутофагию в условиях И/Р сердца. miR-325, miR-145 и miR-144 стимулируют аутофагию, а miR-30a, miR-221, miR-638 и miR-144 ее ингибируют при И/Р сердца. Представленные данные свидетельствуют, что H<sub>2</sub>S повышает толерантность сердца

к действию И/Р и может ингибировать аутофагию у молодых животных, но стимулирует аутофагию у старых животных. НО-1 стимулирует аутофагию и предупреждает повреждение митохондрий при Г/Р кардиомиоцитов. В зависимости от модели, которую выбрали исследователи, аутофагия может носить защитный или повреждающий характер. Конечный результат, то есть ограничение размера инфаркта, зависит не только от того, как влияет то или иное соединение на аутофагию, но и от того, как оно влияет на апоптоз, некроптоз и некроз кардиомиоцитов при И/Р сердца.

### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Статья подготовлена при поддержке гранта РФФИ № 19-15-00037. Материалы по микроРНК подготовлены в рамках государственного задания АААА-А15-115120910024-0.

### БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выражают признательность Н.А. Данильченко за техническую помощь.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *De Duve C., Pressman B.C., Gianetto R., Wattiaux R., Appelmanns F.* Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem. J.* 60(4): 604–617. 1955.
2. *Bainton D.F.* The discovery of lysosomes. *J. Cell Biol.* 91(3 Pt 2): 66s–76s. 1981.
3. *De Duve C.* Lysosomes revisited. *Eur. J. Biochem.* 137(3): 391–397. 1983.
4. *Ashford T.P., Porter K.R.* Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *J. Cell Biol.* 12: 198–202. 1962.
5. *Klionsky D.J.* Autophagy revisited: A conversation with Christian de Duve. *Autophagy.* 4(6): 740–743. 2008.
6. *Radewa J.* Observations on autophagocytosis phenomena in the blood. *Z Rheumaforsch.* 22: 36–46. 1963.
7. *Deter R.L., Baudhuin P., De Duve C.* Participation of lysosomes in cellular autophagy induced in rat liver by glucagon. *J. Cell Biol.* 35(2): C11–C16. 1967.
8. *Deter R.L., De Duve C.* Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J. Cell Biol.* 33(2): 437–449. 1967.
9. *Sciarretta S., Maejima Y., Zablocki D., Sadoshima J.* The role of autophagy in the heart. *Annu. Rev. Physiol.* 80: 1–26. 2018.
10. *Shintani T., Klionsky D.J.* Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science.* 306(5698): 990–995. 2004.
11. *Ravikumar B., Sarkar S., Davies J.E., Futter M., Garcia-Arencibia M., Green-Thompson Z.W., Jimenez-Sanchez M., Korolchuk V.I., Lichtenberg M., Luo S., Massey D.C., Menzies F.M., Moreau K., Narayanan U.,* in physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 90(4): 1383–1435. 2010.
12. *Renna M., Siddiqi F.H., Underwood B.R., Winslow A.R., Rubinsztein D.C.* Regulation of mammalian autophagy. *Singh K.K., Yanagawa B., Quan A., Wang R., Garg A., Khan R., Pan Y., Wheatcroft M.D., Lovren F., Teoh H., Verma S.* Autophagy gene fingerprint in human ischemia and reperfusion. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 147(3): 1065–1072. 2014.
13. *Huang C., Andres A.M., Raliff E.P., Hernandez G., Lee P., Gottlieb R.A.* Preconditioning involves selective mitophagy mediated by parkin and p62/SQSTM1. *PLoS One.* 6(6): e20975. 2011.
14. *Vélez D.E., Hermann R., Barreda Frank M., Mestre Cordero V.E., Savino E.A., Varela A., Marina Prendes M.G.* Effects of wortmannin on cardioprotection exerted by ischemic preconditioning in rat hearts subjected to ischemia-reperfusion. *J. Physiol. Biochem.* 72(1): 83–91. 2016.
15. *García-Rúa V., Feijóo-Bandín S., Rodríguez-Penas D., Mosquera-Leal A., Abu-Assi E., Beiras A., María Seoane L., Lear P., Parrington J., Portolés M., Roselló-Lletí E., Rivera M., Gualillo O., Parra V., Hill J.A., Rothermel B., González-Juanatey J.R., Lago F.* Endolysosomal two-pore channels regulate autophagy in cardiomyocytes. *J. Physiol.* 594(11): 3061–3077. 2016.
16. *Wang B., Zhong S., Zheng F., Zhang Y., Gao F., Chen Y., Lu B., Xu H., Shi G.* N-n-butyl haloperidol iodide protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury by inhibiting autophagy. *Oncotarget.* 6(28): 24709–24721. 2015.
17. *Hua P., Liu J., Tao J., Zou R., Lin X., Zhang D., Yang S.* Efficacy and mechanism of preoperative simvastatin therapy on myocardial protection after extracorporeal circulation. *Biomed. Res. Int.* 2017: 6082430. 2017.

18. Ye G., Fu Q., Jiang L., Li Z. Vascular smooth muscle cells activate PI3K/Akt pathway to attenuate myocardial ischemia/reperfusion-induced apoptosis and autophagy by secreting bFGF. *Biomed. Pharmacother.* 107: 1779–1785. 2018.
19. Xie H., Xu Q., Jia J., Ao G., Sun Y., Hu L., Alkayed N.J., Wang C., Cheng J. Hydrogen sulfide protects against myocardial ischemia and reperfusion injury by activating AMP-activated protein kinase to restore autophagic flux. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 458(3): 632–638. 2015.
20. Shao J., Miao C., Geng Z., Gu M., Wu Y., Li Q. Effect of eNOS on ischemic postconditioning-induced autophagy against ischemia/reperfusion injury in mice. *Biomed. Res. Int.* 2019: 5201014. 2019.
21. Zhao T., Huang X., Han L., Wang X., Cheng H., Zhao Y., Chen Q., Chen J., Cheng H., Xiao R., Zheng M. Central role of mitofusins 2 in autophagosome-lysosome fusion in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 287(28): 23615–23625. 2012.
22. Kanamori H., Takemura G., Goto K., Maruyama R., Ono K., Nagao K., Tsujimoto A., Ogino A., Takeyama T., Kawaguchi T., Watanabe T., Kawasaki M., Fujiwara T., Fujiwara H., Seishima M., Minatoguchi S. Autophagy limits acute myocardial infarction induced by permanent coronary artery occlusion. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 300(6): H2261–H2271. 2011.
23. Qian J., Ren X., Wang X., Zhang P., Jones W.K., Molkenkin J.D., Fan G.C., Kranias E.G. Blockade of Hsp20 phosphorylation exacerbates cardiac ischemia/reperfusion injury by suppressed autophagy and increased cell death. *Circ. Res.* 105(12): 1223–1231. 2009.
24. De Meyer G.R., Martinet W. Autophagy in the cardiovascular system. *Biochim. Biophys. Acta.* 1793(9): 1485–1495. 2009.
25. Valentim L., Laurence K.M., Townsend P.A., Carroll C.J., Soond S., Scarabelli T.M., Knight R.A., Latchman D.S., Stephanou A. Urocortin inhibits Beclin 1-mediated autophagic cell death in cardiac myocytes exposed to ischaemia/reperfusion injury. *J. Mol. Cell Cardiol.* 40(6): 846–852. 2006.
26. Yan L., Vatner D.E., Kim S.J., Ge H., Masurekar M., Massover W.H., Yang G., Matsui Y., Sadoshima J., Vatner S.F. Autophagy in chronically ischemic myocardium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102(39): 13807–13812. 2005.
27. Decker R.S., Wildenthal K. Lysosomal alterations in hypoxic and reoxygenated hearts. I. Ultrastructural and cytochemical changes. *Am. J. Pathol.* 98(2): 425–444. 1980.
28. Sybers H.D., Ingwall J., DeLuca M. Autophagy in cardiac myocytes. *Recent Adv. Stud. Cardiac. Struct. Metab.* 12: 453–463. 1976.
29. Sengupta A., Molkenkin J.D., Yutzey K.E. FoxO transcription factors promote autophagy in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 284(41): 28319–28331. 2009.
30. Yan L., Sadoshima J., Vatner D.E., Vatner S.F. Autophagy in ischemic preconditioning and hibernating myocardium. *Autophagy.* 5(5): 709–712. 2009.
31. Sala-Mercado J.A., Wider J., Undyala V.V., Jahania S., Yoo W., Mentzer R.M. Jr., Gottlieb R.A., Przyklenk K. Profound cardioprotection with chloramphenicol succinate in the swine model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation.* 122(11 Suppl): S179–S184. 2010.
32. Ma X., Liu H., Foyil S.R., Godar R.J., Weinheimer C.J., Hill J.A., Diwan A. Impaired autophagosome clearance contributes to cardiomyocyte death in ischemia/reperfusion injury. *Circulation.* 125(25): 3170–3181. 2012.
33. Zhang Y.L., Yao Y.T., Fang N.X., Zhou C.H., Gong J.S., Li L.H. Restoration of autophagic flux in myocardial tissues is required for cardioprotection of sevoflurane postconditioning in rats. *Acta Pharmacol. Sin.* 35(6): 758–769. 2014.
34. Wang Z.G., Wang Y., Huang Y., Lu Q., Zheng L., Hu D., Feng W.K., Liu Y.L., Ji K.T., Zhang H.Y., Fu X.B., Li X.K., Chu M.P., Xiao J. bFGF regulates autophagy and ubiquitinated protein accumulation induced by myocardial ischemia/reperfusion via the activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Sci. Rep.* 5: 9287. 2015.
35. Guo L., Xu J.M., Mo X.Y. Ischemic postconditioning regulates cardiomyocyte autophagic activity following ischemia/reperfusion injury. *Mol. Med. Rep.* 12(1): 1169–1176. 2015.
36. Huang Z., Han Z., Ye B., Dai Z., Shan P., Lu Z., Dai K., Wang C., Huang W. Berberine alleviates cardiac ischemia/reperfusion injury by inhibiting excessive autophagy in cardiomyocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 762: 1–10. 2015.
37. Ma M.Q., Thalalia B.A., Lin X.H. A 6 hour therapeutic window, optimal for interventions targeting AMPK synergism and apoptosis antagonism, for cardioprotection against myocardial ischemic injury: an experimental study on rats. *Am. J. Cardiovasc. Dis.* 5(1): 63–71. 2015.
38. Yu P., Zhang J., Yu S., Luo Z., Hua F., Yuan L., Zhou Z., Liu Q., Du X., Chen S., Zhang L., Xu G. Protective effect of sevoflurane postconditioning against cardiac ischemia/reperfusion injury via ameliorating mitochondrial impairment, oxidative stress and rescuing autophagic clearance. *PLoS One.* 10(8): e0134666. 2015.
39. Xu Q., Li X., Lu Y., Shen L., Zhang J., Cao S., Huang X., Bin J., Liao Y. Pharmacological modulation of autophagy to protect cardiomyocytes according to the time windows of ischaemia/reperfusion. *Br. J. Pharmacol.* 172(12): 3072–3085. 2015.
40. Jiang H., Xiao J., Kang B., Zhu X., Xin N., Wang Z. PI3K/SGK1/GSK3 $\beta$  signaling pathway is involved in inhibition of autophagy in neonatal rat cardiomyocytes exposed to hypoxia/reoxygenation by hydrogen sulfide. *Exp. Cell Res.* 345(2): 134–140. 2016.
41. Yang Y., Li Y., Chen X., Cheng X., Liao Y., Yu X. Exosomal transfer of miR-30a between cardiomyocytes regulates autophagy after hypoxia. *J. Mol. Med. (Berl).* 94(6): 711–724. 2016.

42. Wang J.J., Bie Z.D., Sun C.F. Long noncoding RNA AK088388 regulates autophagy through miR-30a to affect cardiomyocyte injury. *J. Cell Biochem.* 120(6): 10155–10163. 2019.
43. Gurusamy N., Lekli I., Mukherjee S., Ray D., Ahsan M.K., Gherghiceanu M., Popescu L.M., Das D.K. Cardioprotection by resveratrol: a novel mechanism via autophagy involving the mTORC2 pathway. *Cardiovasc. Res.* 86(1): 103–112. 2010.
44. French C.J., Taatjes D.J., Sobel B.E. Autophagy in myocardium of murine hearts subjected to ischemia followed by reperfusion. *Histochem. Cell Biol.* 134(5): 519–526. 2010.
45. Cao X., Wang X., Ling Y., Song X., Yang P., Liu Y., Liu L., Wang L., Guo J., Chen A. Comparison of the degree of autophagy in neonatal rat cardiomyocytes and H9c2 cells exposed to hypoxia/reoxygenation. *Clin. Lab.* 60(5): 809–814. 2014.
46. Hu S., Cao S., Tong Z., Liu J. FGF21 protects myocardial ischemia-reperfusion injury through reduction of miR-145-mediated autophagy. *Am. J. Transl. Res.* 10(11): 3677–3688. 2018.
47. Heusch G. Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ. Res.* 116(4): 674–699. 2015.
48. Gurusamy N., Lekli I., Gorbunov N.V., Gherghiceanu M., Popescu L.M., Das D.K. Cardioprotection by adaptation to ischaemia augments autophagy in association with BAG-1 protein. *J. Cell Mol. Med.* 13(2): 373–387. 2009.
49. Gedik N., Thielmann M., Kottenberg E., Peters J., Jakob H., Heusch G., Kleinbongard P. No evidence for activated autophagy in left ventricular myocardium at early reperfusion with protection by remote ischemic preconditioning in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *PLoS One.* 9(5): e96567. 2014.
50. Rohailla S., Clarizia N., Sourour M., Sourour W., Gelber N., Wei C., Li J., Redington A.N. Acute, delayed and chronic remote ischemic conditioning is associated with downregulation of mTOR and enhanced autophagy signaling. *PLoS One.* 9(10): e111291. 2014.
51. Dosenko V.E., Nagibin V.S., Tumanovskaya L.V., Zagoriy V.Y., Moibenko A.A., Vaage J. Proteasome inhibitors eliminate protective effect of postconditioning in cultured neonatal cardiomyocytes. *Fiziol. Zh.* 52(3): 15–24. 2006.
52. Wagner C., Tillack D., Simonis G., Strasser R.H., Weinbrenner C. Ischemic post-conditioning reduces infarct size of the in vivo rat heart: role of PI3-K, mTOR, GSK-3beta, and apoptosis. *Mol. Cell Biochem.* 339(12): 135–147. 2010.
53. Wei C., Li H., Han L., Zhang L., Yang X. Activation of autophagy in ischemic postconditioning contributes to cardioprotective effects against ischemia/reperfusion injury in rat hearts. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 61(5): 416–422. 2013.
54. Chen C., Hu L.X., Dong T., Wang G.Q., Wang L.H., Zhou X.P., Jiang Y., Murao K., Lu S.Q., Chen J.W., Zhang G.X. Apoptosis and autophagy contribute to gender difference in cardiac ischemia-reperfusion induced injury in rats. *Life Sci.* 93(7): 265–270. 2013.
55. Le T.Y., Ashton A.W., Mardini M., Stanton P.G., Funder J.W., Handelsman D.J., Mihailidou A.S. Role of androgens in sex differences in cardiac damage during myocardial infarction. *Endocrinology.* 155(2): 568–575. 2014.
56. Hu Y., Sun Q., Li Z., Chen J., Shen C., Song Y., Zhong Q. High basal level of autophagy in high-altitude residents attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 148(4): 1674–1680. 2014.
57. Sciarretta S., Zhai P., Shao D., Maejima Y., Robbins J., Volpe M., Condorelli G., Sadoshima J. Rheb is a critical regulator of autophagy during myocardial ischemia: pathophysiological implications in obesity and metabolic syndrome. *Circulation.* 125(9): 1134–1146. 2012.
58. Godar R.J., Ma X., Liu H., Murphy J.T., Weinheimer C.J., Kovacs A., Crosby S.D., Saftig P., Diwan A. Repetitive stimulation of autophagy-lysosome machinery by intermittent fasting preconditions the myocardium to ischemia-reperfusion injury. *Autophagy.* 11(9): 1537–1560. 2015.
59. Hariharan N., Zhai P., Sadoshima J. Oxidative stress stimulates autophagic flux during ischemia/reperfusion. *Antioxid. Redox. Signal.* 14(11): 2179–2190. 2011.
60. Sengupta A., Molkentin J.D., Paik J.H., DePinho R.A., Yutzey K.E. FoxO transcription factors promote cardiomyocyte survival upon induction of oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 286(9): 7468–7478. 2011.
61. Liu L., Jin X., Hu C.F., Li R., Zhou Z., Shen C.X. Exosomes derived from mesenchymal stem cells rescue myocardial ischaemia/reperfusion injury by inducing cardiomyocyte autophagy via AMPK and Akt pathways. *Cell Physiol. Biochem.* 43(1): 52–68. 2017.
62. Sciarretta S., Zhai P., Shao D., Zablocki D., Nagarajan N., Terada L.S., Volpe M., Sadoshima J. Activation of NADPH oxidase 4 in the endoplasmic reticulum promotes cardiomyocyte autophagy and survival during energy stress through the protein kinase RNA-activated-like endoplasmic reticulum kinase/eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$ /activating transcription factor 4 pathway. *Circ. Res.* 113(11): 1253–1264. 2013.
63. Krylatov A.V., Maslov L.N., Voronkov N.S., Boshchenko A.A., Popov S.V., Gomez L., Wang H., Jaggi A.S., Downey J.M. Reactive oxygen species as intracellular signaling molecules in the cardiovascular system. *Curr. Cardiol. Rev.* 14(4): 290–300. 2018.
64. Shiomi M., Miyamae M., Takemura G., Kaneda K., Inamura Y., Onishi A., Koshinuma S., Mota Y., Minami T., Figueredo V.M. Sevoflurane induces cardioprotection through reactive oxygen species-mediated upregulation of autophagy in isolated guinea pig hearts. *J. Anesth.* 28(4): 593–600. 2014.

65. *Matsui Y., Takagi H., Qu X., Abdellatif M., Sakoda H., Asano T., Levine B., Sadoshima J.* Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ. Res.* 100(6): 914–922. 2007.
66. *Aoyagi T., Kusakari Y., Xiao C.Y., Inouye B.T., Takahashi M., Scherrer-Crosbie M., Rosenzweig A., Hara K., Matsui T.* Cardiac mTOR protects the heart against ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 303(1): H75–H85. 2012.
67. *Zhao M., Sun L., Yu X.J., Miao Y., Liu J.J., Wang H., Ren J., Zang W.J.* Acetylcholine mediates AMPK-dependent autophagic cytoprotection in H9c2 cells during hypoxia/reoxygenation injury. *Cell Physiol. Biochem.* 32(3): 601–613. 2013.
68. *Sciarretta S., Volpe M., Sadoshima J.* Mammalian target of rapamycin signaling in cardiac physiology and disease. *Circ. Res.* 114(3): 549–564. 2014.
69. *Xu J., Qin X., Cai X., Yang L., Xing Y., Li J., Zhang L., Tang Y., Liu J., Zhang X., Gao F.* Mitochondrial JNK activation triggers autophagy and apoptosis and aggravates myocardial injury following ischemia/reperfusion. *Biochim. Biophys. Acta.* 1852(2): 262–270. 2015.
70. *Huang L., Dai K., Chen M., Zhou W., Wang X., Chen J., Zhou W.* The AMPK agonist PT1 and mTOR inhibitor 3HOI-BA-01 protect cardiomyocytes after ischemia through induction of autophagy. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 21(1): 70–81. 2016.
71. *Wang A., Zhang H., Liang Z., Xu K., Qiu W., Tian Y., Guo H., Jia J., Xing E., Chen R., Xiang Z., Liu J.* U0126 attenuates ischemia/reperfusion-induced apoptosis and autophagy in myocardium through MEK/ERK/EGR-1 pathway. *Eur. J. Pharmacol.* 788: 280–285. 2016.
72. *McCormick J., Suleman N., Scarabelli T.M., Knight R.A., Latchman D.S., Stephanou A.* STAT1 deficiency in the heart protects against myocardial infarction by enhancing autophagy. *J. Cell Mol. Med.* 16(2): 386–393. 2012.
73. *Hoshino A., Matoba S., Iwai-Kanai E., Nakamura H., Kimata M., Nakaoka M., Katamura M., Okawa Y., Ariyoshi M., Mita Y., Ikeda K., Ueyama T., Okigaki M., Matsubara H.* p53-TIGAR axis attenuates mitophagy to exacerbate cardiac damage after ischemia. *J. Mol. Cell Cardiol.* 52(1): 175–184. 2012.
74. *Zeng M., Wei X., Wu Z., Li W., Li B., Zhen Y., Chen J., Wang P., Fei Y.* NF- $\kappa$ B-mediated induction of autophagy in cardiac ischemia/reperfusion injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 436(2): 180–185. 2013.
75. *Haar L., Ren X., Liu Y., Koch S.E., Goines J., Tranter M., Engevik M.A., Nieman M., Rubinstein J., Jones W.K.* Acute consumption of a high-fat diet prior to ischemia-reperfusion results in cardioprotection through NF- $\kappa$ B-dependent regulation of autophagic pathways. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 307(12): H1705–P1713. 2014.
76. *Gui L., Liu B., Lv G.* Hypoxia induces autophagy in cardiomyocytes via a hypoxia-inducible factor 1-dependent mechanism. *Exp. Ther. Med.* 11(6): 2233–2239. 2016.
77. *Fromm B., Billipp T., Peck L.E., Johansen M., Tarver J.E., King B.L., Newcomb J.M., Sempere L.F., Flatmark K., Hovig E., Peterson K.J.* A uniform system for the annotation of vertebrate microRNA genes and the evolution of the human microRNAome. *Annu. Rev. Genet.* 49: 213–242. 2015.
78. *Xiao J., Zhu X., He B., Zhang Y., Kang B., Wang Z., Ni X.* MiR-204 regulates cardiomyocyte autophagy induced by ischemia-reperfusion through LC3-II. *J. Biomed. Sci.* 18: 35. 2011.
79. *Bo L., Su-Ling D., Fang L., Lu-Yu Z., Tao A., Stefan D., Kun W., Pei-Feng L.* Autophagic program is regulated by miR-325. *Cell Death Differ.* 21(6): 967–977. 2014.
80. *Li J., Rohaila S., Gelber N., Rutka J., Sabah N., Gladstone R.A., Wei C., Hu P., Kharbanda R.K., Redington A.N.* MicroRNA-144 is a circulating effector of remote ischemic preconditioning. *Basic Res. Cardiol.* 109(5): 423. 2014.
81. *Li X., Zeng Z., Li Q., Xu Q., Xie J., Hao H., Luo G., Liao W., Bin J., Huang X., Liao Y.* Inhibition of microRNA-497 ameliorates anoxia/reoxygenation injury in cardiomyocytes by suppressing cell apoptosis and enhancing autophagy. *Oncotarget.* 6(22): 18829–18844. 2015.
82. *Chen Q., Zhou Y., Richards A.M., Wang P.* Up-regulation of miRNA-221 inhibits hypoxia/reoxygenation-induced autophagy through the DDIT4/mTORC1 and Tp53inp1/p62 pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 474(1): 168–174. 2016.
83. *Zhao P., Zhang B.L., Liu K., Qin B., Li Z.H.* Overexpression of miR-638 attenuated the effects of hypoxia/reoxygenation treatment on cell viability, cell apoptosis and autophagy by targeting ATG5 in the human cardiomyocytes. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 22(23): 8462–8471. 2018.
84. *Xiao J., Zhu X., Kang B., Xu J., Wu L., Hong J., Zhang Y., Ni X., Wang Z.* Hydrogen sulfide attenuates myocardial hypoxia-reoxygenation injury by inhibiting autophagy via mTOR activation. *Cell Physiol. Biochem.* 37(6): 2444–2453. 2015.
85. *Chen J., Gao J., Sun W., Li L., Wang Y., Bai S., Li X., Wang R., Wu L., Li H., Xu C.* Involvement of exogenous H<sub>2</sub>S in recovery of cardioprotection from ischemic post-conditioning via increase of autophagy in the aged hearts. *Int. J. Cardiol.* 220: 681–692. 2016.
86. *Chen D., Jin Z., Zhang J., Jiang L., Chen K., He X., Song Y., Ke J., Wang Y.* HO-1 protects against hypoxia/reoxygenation-induced mitochondrial dysfunction in H9c2 cardiomyocytes. *PLoS One.* 11(5): e0153587. 2016.
87. *Przyklenk K., Undyala V.V., Wider J., Sala-Mercado J.A., Gottlieb R.A., Mentzer R.M Jr.* Acute induction of autophagy as a novel strategy for cardioprotection: getting to the heart of the matter. *Autophagy.* 7(4): 432–433. 2011.

88. *Loos B., Genade S., Ellis B., Lochner A., Engelbrecht A.M.* At the core of survival: autophagy delays the onset of both apoptotic and necrotic cell death in a model of ischemic cell injury. *Exp. Cell Res.* 317(10): 1437–1453. 2011.
89. *Chen H.H., Mekkaoui C., Cho H., Ngoy S., Marinelli B., Waterman P., Nahrendorf M., Liao R., Josephson L., Sosnovik D.E.* Fluorescence tomography of rapamycin-induced autophagy and cardioprotection in vivo. *Circ. Cardiovasc. Imaging.* 6(3): 441–447. 2013.
90. *Yang S.S., Liu Y.B., Yu J.B., Fan Y., Tang S.Y., Duan W.T., Wang Z., Gan R.T., Yu B.* Rapamycin protects heart from ischemia/reperfusion injury independent of autophagy by activating PI3 kinase-Akt pathway and mitochondrial K<sub>ATP</sub> channel. *Pharmazie.* 65(10): 760–765. 2010.
91. *Yang K., Xu C., Li X., Jiang H.* Combination of D942 with curcumin protects cardiomyocytes from ischemic damage through promoting autophagy. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 18(6): 570–581. 2013.
92. *Wu X., He L., Cai Y., Zhang G., He Y., Zhang Z., He X., He Y., Zhang G., Luo J.* Induction of autophagy contributes to the myocardial protection of valsartan against ischemia-reperfusion injury. *Mol. Med. Rep.* 8(6): 1824–1830. 2013.
93. *Andres A.M., Hernandez G., Lee P., Huang C., Raliff E.P., Sin J., Thornton C.A., Damasco M.V., Gottlieb R.A.* Mitophagy is required for acute cardioprotection by simvastatin. *Antioxid. Redox Signal.* 21(14): 1960–1973. 2014.
94. *Xie M., Kong Y., Tan W., May H., Battiprolu P.K., Pedrozo Z., Wang Z.V., Morales C., Luo X., Cho G., Jiang N., Jessen M.E., Warner J.J., Lavandero S., Gillette T.G., Turer A.T., Hill J.A.* Histone deacetylase inhibition blunts ischemia/reperfusion injury by inducing cardiomyocyte autophagy. *Circulation.* 129(10): 1139–1151. 2014.
95. *Hermann R., Vélez D.E., Rusiecki T.M., Fernández Pazos Mde L., Mestre Cordero V.E., Marina Prendes M.G., Perazzo Rossini J.C., Savino E.A., Varela A.* Effects of 3-methyladenine on isolated left atria subjected to simulated ischaemia-reperfusion. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 42(1): 41–51. 2015.
96. *Wu X., He L., Chen F., He X., Cai Y., Zhang G., Yi Q., He M., Luo J.* Impaired autophagy contributes to adverse cardiac remodeling in acute myocardial infarction. *PLoS One.* 9(11): e112891. 2014.
97. *Zhang J., Nadtochiy S.M., Urciuoli W.R., Brookes P.S.* The cardioprotective compound cloxyquin uncouples mitochondria and induces autophagy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 310(1): H29–H38. 2016.
98. *Liu L., Wu Y., Huang X.* Orientin protects myocardial cells against hypoxia-reoxygenation injury through induction of autophagy. *Eur. J. Pharmacol.* 776: 90–98. 2016.
99. *Ma Y., Gai Y., Yan J., Li J., Zhang Y.* Puerarin attenuates anoxia/reoxygenation injury through enhancing Bcl-2 associated athanogene 3 expression, a modulator of apoptosis and autophagy. *Med. Sci. Monit.* 22: 977–983. 2016.
100. *Wang Y., Yang Z., Zheng G., Yu L., Yin Y., Mu N., Ma H.* Metformin promotes autophagy in ischemia/reperfusion myocardium via cytoplasmic AMPK $\alpha$ 1 and nuclear AMPK $\alpha$ 2 pathways. *Life Sci.* 225: 64–71. 2019.
101. *Zhao R., Xie E., Yang X., Gong B.* Alliin alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury by promoting autophagy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 512(2): 236–243. 2019.
102. *Ren Z., Xiao W., Zeng Y., Liu M.H., Li G.H., Tang Z.H., Qu S.L., Hao Y.M., Yuan H.Q., Jiang Z.S.* Fibroblast growth factor-21 alleviates hypoxia/reoxygenation injury in H9c2 cardiomyocytes by promoting autophagic flux. *Int. J. Mol. Med.* 43(3): 1321–1330. 2019.
103. *Qiao S.G., Sun Y., Sun B., Wang A., Qiu J., Hong L., An J.Z., Wang C., Zhang H.L.* Sevoflurane postconditioning protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by restoring autophagic flux via an NO-dependent mechanism. *Acta Pharmacol. Sin.* 40(1): 35–45. 2019.
104. *Meyer G., Czompa A., Reboul C., Csepanyi E., Czeglédi A., Bak I., Balla G., Balla J., Tosaki A., Lekli I.* The cellular autophagy markers Beclin-1 and LC3B-II are increased during reperfusion in fibrillated mouse hearts. *Curr. Pharm. Des.* 19(39): 6912–6918. 2013.
105. *Cao X., Chen A., Yang P., Song X., Liu Y., Li Z., Wang X., Wang L., Li Y.* Alpha-lipoic acid protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury by inhibiting autophagy. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 441(4): 935–940. 2013.
106. *Bouhidel J.O., Wang P., Siu K.L., Li H., Youn J.Y., Cai H.* Netrin-1 improves post-injury cardiac function in vivo via DCC/NO-dependent preservation of mitochondrial integrity, while attenuating autophagy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1852(2): 277–289. 2015.
107. *Xiao J., Zhu X., Ji G., Yang Q., Kang B., Zhao J., Yao F., Wu L., Ni X., Wang Z.* Ulinastatin protects cardiomyocytes against ischemia-reperfusion injury by regulating autophagy through mTOR activation. *Mol. Med. Rep.* 10(4): 1949–1953. 2014.
108. *Yao T., Ying X., Zhao Y., Yuan A., He Q., Tong H., Ding S., Liu J., Peng X., Gao E., Pu J., He B.* Vitamin D receptor activation protects against myocardial reperfusion injury through inhibition of apoptosis and modulation of autophagy. *Antioxid. Redox. Signal.* 22(8): 633–650. 2015.
109. *Xie H., Liu Q., Qiao S., Jiang X., Wang C.* Delayed cardioprotection by sevoflurane preconditioning: a novel mechanism via inhibiting Beclin 1-mediated autophagic cell death in cardiac myocytes exposed to hypoxia/reoxygenation injury. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8(1): 217–226. 2015b.

110. Cao J., Xie H., Sun Y., Zhu J., Ying M., Qiao S., Shao Q., Wu H., Wang C. Sevoflurane post-conditioning reduces rat myocardial ischemia reperfusion injury through an increase in NOS and a decrease in phosphorylated NHE1 levels. *Int. J. Mol. Med.* 36(6): 1529–1337. 2015.
111. Zhou L.Y., Zhai M., Huang Y., Xu S., An T., Wang Y.H., Zhang R.C., Liu C.Y., Dong Y.H., Wang M., Qian L.L., Ponnusamy M., Zhang Y.H., Zhang J., Wang K. The circular RNA ACR attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury by suppressing autophagy via modulation of the Pink1/FAM65B pathway. *Cell Death Differ.* 26(7): 1299–1315. 2019.

## The Role of Autophagy in Ischemic and Reperfusion Injury of the Heart

N. S. Voronkov<sup>a,\*</sup> and L. N. Maslov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the RAS, Tomsk, Russia

\*e-mail: maslov@cardio-tomsk.ru

Ischemia/reperfusion (I/R) of the heart leads to increased autophagic flow. Preconditioning stimulates autophagic flow by activating the AMPK-kinase and PI3-kinase while inhibiting the mTOR kinase. The cardioprotective effect of postconditioning is associated with activation of autophagy and increased activity of NO-synthase and AMPK. I/R stimulates autophagy, and gonadectomy suppresses it. Adaptation to hypoxia has a cardioprotective effect, which is possibly associated with the activation of autophagy. It is possible that the negative effect of the fat diet on heart tolerance to I/R is associated with inhibition of autophagy. Starvation stimulates autophagy, this effect is accompanied by an increase in the tolerance of the heart to the I/R. Oxidative stress stimulates autophagy in heart during I/R. The superoxide radical generated by NADPH-oxidase acts as a trigger for autophagy, apparently due to the activation of AMPK-kinase. There is reason to believe that AMPK, GSK-3 $\beta$ , JNK, MEK, and ERK kinases stimulate autophagy, while mTOR, Akt and PI3-kinase inhibit autophagy in the heart during I/R. It has been established that transcription factors FoxO1, FoxO3, NF- $\kappa$ B, and HIF-1 $\alpha$  enhance autophagy in heart during I/R. Transcriptional factors STAT1 and p53 inhibit autophagy in I/R conditions of the heart. miR-325, miR-145 and miR-144 simulate autophagy, and miR-30a, miR-221, miR-638 and miR-144 inhibit autophagy in the heart with I/R. The data presented indicate that H<sub>2</sub>S increases the tolerance of the heart to the action of I/R and inhibits autophagy. Hemoxygenase-1 stimulates autophagy and prevents mitochondrial damage during hypoxia/reoxygenation of cardiomyocytes. Autophagy activation during I/R can be protective and damaging depending on the experimental model. The infarction-limiting effect depends not only on how compounds affect autophagy, but also on how they affect apoptosis, necroptosis, and necrosis cardiomyocytes in the heart with I/R.

*Keywords:* autophagy, heart, ischemia, reperfusion

### ЦИТИРОВАТЬ:

Воронков Н.С., Маслов Л.Н. Роль аутофагии в ишемическом и реперфузионном повреждении сердца. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 106(2): 135–156.

DOI: 10.31857/S0869813920020119

### TO CITE THIS ARTICLE:

Voronkov N.S., Maslov L.N. The Role of Autophagy in Ischemic and Reperfusion Injury of the Heart. *Russian Journal of Physiology.* 106(2): 135–156.

DOI: 10.31857/S0869813920020119

---

---

ОБЗОРНЫЕ  
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

---

---

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ КОГНИТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ  
ПРИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ И ОРГАНИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВАХ**

© 2020 г. М. В. Дорофейкова<sup>1, \*</sup>, Н. Н. Петрова<sup>2</sup>, А. Ю. Егоров<sup>1, 2, 3</sup>

<sup>1</sup>*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова,  
Санкт-Петербург, Россия*

<sup>2</sup>*Санкт-Петербургский государственный университет,  
Санкт-Петербург, Россия*

<sup>3</sup>*Северо-западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова,  
Санкт-Петербург, Россия*

*\*E-mail: mvdorofeykova@mail.ru*

Поступила в редакцию 30.10.2019 г.

После доработки 19.11.2019 г.

Принята к публикации 19.11.2019 г.

Моделирование психических расстройств на животных играет важную роль в изучении патофизиологических основ поведения и трансляции этих данных для выявления новых механизмов развития, биомаркеров и потенциальных методов терапии психических расстройств у человека. В статье представлен обзор литературы, посвященной моделированию болезни Альцгеймера, когнитивных нарушений при деменции сосудистого типа и органическом заболевании головного мозга на животных. Освещены фармакологические и генетические модели, их механизмы и характерные проявления. В то время как фармакологические модели широко применяются в исследованиях патогенеза и терапии когнитивных нарушений на протяжении многих лет, более современные, обладающие своими преимуществами трансгенные модели становятся все более популярными в последние годы. Сейчас не существует модели, которая бы сочетала в себе все когнитивные, поведенческие, биохимические и гистологические нарушения, характерные для определенного вида деменции, однако разнообразие модельных животных открывает широкие возможности для доклинических исследований.

*Ключевые слова:* доклиническое исследование, моделирование, болезнь Альцгеймера, когнитивное функционирование, когнитивный дефицит

**DOI:** 10.31857/S086981392002003X

Моделирование психических расстройств на животных играет важную роль в изучении патофизиологических основ поведения и трансляции этих данных для выявления новых механизмов развития, биомаркеров и потенциальных методов терапии психических расстройств у человека.

Сложнейшей задачей остается создание животных моделей расстройств с воспроизведением их симптомов и механизмов с достаточной полнотой, особенно учитывая гетерогенность пациентов. Поскольку когнитивные функции многообразны, и при разных расстройствах и у разных индивидов когнитивные нарушения возникают в одном или многих различных доменах, разумно пытаться воспроизвести лишь отдельные симптомы в процессе их моделирования на животных. Поскольку многие когнитивные функции взаимосвязаны, при моделировании их нарушений на животных необходимо использовать множество тестов для точного описания

профиля когнитивных нарушений и обнаружения их влияния друг на друга (эффективности манипуляций в отношении одной или нескольких функций). Существует несколько типов валидности для оценки соответствия модели: конструктивная валидность (соответствие этиологических факторов), содержательная валидность (воспроизведение основных клинических проявлений расстройства) и прогностическая валидность (пригодность модели для предсказания эффективности препаратов) [1]. Когнитивные нарушения у людей возникают в результате зачастую плохо изученных генетических, внешних факторов, нарушений развития, которые невозможно точно воспроизвести у экспериментальных животных. Несмотря на это, моделирование на животных необходимо для дальнейшего изучения когнитивных нарушений, взаимодействия способствующих их развитию факторов и потенциальных терапевтических вмешательств. В последние годы проходят исследования воздействия факторов окружающей среды с целью предотвращения наступления заболевания; например, было показано, что раннее вмешательство у мышей, представляющих собой генетическую модель синдрома Ретта (с дефицитом белка MeCP2), приводит к отсутствию у них нарушений памяти, координации и проявлений тревоги [2], что дает надежду на эффективность дальнейшего углубления знаний в области нейробиологии нейродегенеративных расстройств, которые играют все более значимую роль в нашем стареющем обществе.

Разработка методов лечения болезни Альцгеймера (БА) является одной из наиболее значимых и сложных задач, стоящих перед современным здравоохранением. Неоднократные неудачи клинических исследований потенциальных методов терапии при их эффективности на этапе доклинического тестирования (например, вакцинации для избавления от бета-амилоидных бляшек) заставляют обратить внимание в том числе и на экспериментальные модели, которые использовались в этих испытаниях [3].

Целью данного обзора стало рассмотрение существующих экспериментальных моделей нейродегенеративных и органических расстройств головного мозга, позволяющих изучать механизмы и методы терапии когнитивных нарушений при данных заболеваниях.

## 1. МОДЕЛИРОВАНИЕ ДЕМЕНЦИИ ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

В настоящее время для создания моделей деменции используются разные животные: грызуны, обезьяны, черви и мухи. Поскольку обезьяны дороги в содержании, а нервные системы червей и насекомых сильно отличаются от человеческих, на первом месте в доклинических исследованиях когнитивных нарушений стоят модели с использованием грызунов [4].

Ранее для тестирования потенциальных препаратов для терапии деменции применялись различные химические соединения (стрептозотозин, скополамин, колхицины, тяжелые металлы и др.), однако такие модели не предполагали постепенного прогрессирования патологии после однократного введения [5]. Ряд трансгенных мышей (PDAPP, Tg2576, App23, JNLP3, ApoE и т.д.) был разработан специально для изучения БА; у них наблюдаются такие гистологические проявления, как сенильные бляшки и нейрофибрилярные клубочки. Также существуют генетические модели болезни Паркинсона и Гентингтона на животных. К сожалению, такие модели тоже неидеальны: они дороги и не позволяют наблюдать постепенное развитие заболевания [6, 7].

### 1.2. Спонтанные модели

Спонтанные модели деменции делят на модели, связанные с обычным и ускоренным старением.

**Возрастная деменция.** Стареющие животные широко используются в исследованиях, посвященных возрастному когнитивному снижению и разработке соответствующей

ющих лекарственных средств, поскольку они не только демонстрируют типичные для людей изменения нейрохимии и морфологии головного мозга, но и снижение холинергической передачи, что является одним из проявлений БА [8]. Такая модель естественна и не требует вмешательств, что также является ее преимуществами. Собаки [9], кошки [10], медведи [11] и нечеловекообразные обезьяны [12] также могут служить хорошими моделями деменции, однако этические нормы препятствуют их широкому использованию, и чаще всего в исследованиях применяются грызуны [5]. У нечеловекообразных обезьян встречается спонтанно возникающая патология, характерная для БА, однако отдельные проявления характерны для разных видов, к примеру, у макак происходит отложение амилоида, а у бабуинов – формирование нейрофибрилярных клубочков.

**Модели ускоренного старения.** Линия мышей SAMP8 (senescence-accelerated prone 8) появилась в 1980-х годах с помощью фенотипического отбора мышей линии AKR/J [13]. Для нее характерны нарушения памяти и обучаемости при низкой частоте других проявлений старения [14]. В России с помощью отбора наиболее склонных к развитию катаракты на фоне галактозной диеты особей была создана линия крыс OXYS, которым свойственны поведенческие нарушения и снижение памяти, начиная с 4 недели жизни, которые появляются на фоне избыточной экспрессии белка-предшественника амилоида (amyloid precursor protein, APP), накопления бета-амилоида и гиперфосфорилирования белка тау, а также нарушение функций митохондрий печени, что может говорить о недостаточной селективности данной линии как модели БА: ее следует рассматривать как модель раннего старения в целом [15].

### *1.3. Фармакологические модели*

Основой данных моделей является воздействие на нейронные пути и уровень нейротрансмиттеров с помощью различных химических соединений.

**1.3.1. Скополаминная модель нарушений памяти.** Скополамин является препаратом, блокирующим центры связывания мускариновых рецепторов в коре головного мозга, что приводит к избыточному выбросу ацетилхолина и повреждению гиппокампа. Снижение холинергической активности у людей приводит к развитию таких проявлений деменции, как потеря памяти и дезориентация, которые характерны для БА [16]. Введение скополамина мышам дозозависимо вызывает нарушения памяти и обучаемости [17]. Данная модель активно применяется, поскольку требует лишь системного (внутрибрюшинного) введения препарата без иных сложных процедур.

**1.3.2. Модель деменции, вызванной внутрижелудочковым введением стрептозотоцина.** Производное нитрозомочевины, стрептозотин обладает цитостатическим действием. На животных он широко изучался как препарат, вызывающий диабет, а в конце 1990-х годов была создана модель деменции на грызунах, достигаемая с помощью локального двукратного введения его в субдиабетогенной дозе в желудочки головного мозга с интервалом в 48 ч [18]. В результате данной манипуляции у грызунов развивается прогрессивное снижение памяти из-за оксидативного стресса, гиперфосфорилирования тау-белка, накопления бета-амилоида, снижения активности ферментов гликолиза, что приводит к снижению уровня АТФ и креатинфосфата (нарушению энергетического обмена в головном мозге), и др. В результате апоптоза, нарушения функционирования митохондрий, воспаления нервной ткани и оксидативного стресса нарастает атрофия [19–21]. Несомненным преимуществом данной модели является воспроизведение ряда патофизиологических проявлений БА [22], а недостатком – большое требуемое количество животных из-за высокой смертности [7].

**1.3.3. Нарушения памяти, связанные с воздействием бета-амилоида.** Острое введение и хронические инфузии бета-амилоида в головной мозг вызывают нейродеген-

нерацию и нарушения обучаемости и памяти, напоминающие таковые при БА [23]. 14-дневное введение бета-амилоида в третий желудочек мозга крысы приводит к накоплению его в различных структурах, включая гиппокамп и кору головного мозга [24]. Данная модель применяется для скрининга потенциальных лекарств для БА и позволяет изучать роль бета-амилоида в нарушении функционирования конкретных нейронных путей изолированно от избыточной экспрессии APP, которая характерна для популярных генетических моделей, однако следует отметить, что в данной модели нарушения памяти обусловлены острыми эффектами бета-амилоида, что сильно отличается от течения БА у людей.

**1.3.4. Деменция, вызванная введением L-метионина.** Хроническое введение L-метионина ведет к гиперомоцистеинемии и соответственно эндотелиальной дисфункции, накоплению бета-амилоида, гиперфосфорилирования тау-белка и когнитивным нарушениям [25, 26]. Всего 4 нед. перорального приема крысами L-метионина в дозе 1.7 г/кг приводят к значительным нарушениям обучаемости и памяти [27].

**1.3.5. Деменция, вызванная введением колхицина.** Колхицин имеет нейротоксические свойства, связанные с гибелью холинергических нейронов, потерей соответствующих путей и снижением холинергической передачи преимущественно в гиппокампе [28]. Также нарушения памяти при введении колхицина связаны со снижением уровней дофамина, норадреналина и серотонина в коре, хвостом ядра и гиппокампе, повышением экспрессии циклооксигеназ, оксидативным стрессом, избыточной активацией N-метил-D-аспартатных (NDMA) рецепторов [7, 29, 30]. Через 2 недели после введения колхицина в желудочки головного мозга грызунов наблюдают выраженные нарушения памяти [30, 31]. Преимуществом данной модели является то, что она воспроизводит некоторые характерные для деменции альцгеймеровского типа изменения – в поведении и биохимических показателях, а также их временные характеристики [30], а недостатками – отсутствие гиперфосфорилирования белка тау, временные затраты, высокая смертность животных, снижение аппетита и ряд других побочных эффектов, включая сниженный болевой порог, повышенную агрессивность, миоклонические подергивания и т.д. [32].

**1.3.6. Нарушения памяти, связанные с воздействием омега-3 жирных кислот.** Одним из механизмов развития БА является нарушение баланса между фосфорилированием и дефосфорилированием тау-белка [33]. Омега-3 жирные кислоты вызывают нарушения памяти в результате усиления фосфорилирования тау-белка и отложения бета-амилоида [34]. Ее вводят в дорсальную часть гиппокампа в течение 14 дней взрослым крысам, в результате чего у них появляются когнитивные нарушения (нарушения памяти в водном лабиринте Морриса), сопровождающиеся характерной патологической картиной, включающей гиперфосфорилирование тау-белка и оксидативный стресс, а также следующий за нейродегенерацией воспалительный ответ [35, 36].

**1.3.7. Нарушения памяти, связанные с воздействием эксайтотоксинов, нейротоксинов и холинотоксинов.** Эксайтотоксичность, возникающая в результате чрезмерной стимуляции глутаматных рецепторов и избытка поступления ионов кальция в клетки, является одной из важнейших причин гибели нейронов при ряде психоневрологических заболеваний, включая БА и эпилепсию [37]. NMDA-агонисты являются одними из представителей группы эксайтотоксинов, в частности, иботеновая кислота, которая способна повреждать холинергические нейроны в базальном ядре Мейнрета, что является валидированной моделью БА [38]. Одностороннее введение иботеновой кислоты в базальное ядро приводит к значимым нарушениям памяти [39]. Другими веществами, обладающими холино- и нейротоксичностью, способными привести к гибели нейронов, являются каиновая, хинолиновая кислоты, NMDA-антагонист дизоцилпин, альфа-аминометилизоксазолпропионовая кислота (AMPA) и агонисты AMPA-рецепторов [7]. В качестве модели БА предлагалось, в том числе, введение холинотоксина этилхолина азиридиния (AF64A) в

крупноклеточное ядро, что, в результате снижения холинергической передачи и последующий гибели нейронов приводит к снижению обучаемости в задачах активного и пассивного избегания, нарушению пространственной памяти, двигательной активности и эмоциональных реакций [40].

**1.3.8. Деменция, связанная с воздействием тяжелых металлов.** Такие металлы, как железо, медь, хром, кобальт, алюминий и цинк могут способствовать повышенному образованию активных форм кислорода, что приводит к развитию деменции (как альцгеймеровского типа, так и других) [41, 42]. Кадмий, мышьяк и свинец оказывают токсическое воздействие через связывание сульфгидрильных групп белков и снижение уровня антиоксиданта глутатиона. Цинк, вовлеченный в развитие и прогрессирование БА, способствует димеризации бета-амилоида. Избыток алюминия в питьевой воде вызывает БА, поскольку нарушает метаболизм бета-амилоида, взаимодействуя с инсулин-разрушающим ферментом (insulin degrading enzyme, IDE), перерабатывающим в том числе бета-амилоид [7]. Введение алюминия мышам приводит к накоплению тау-белка, апоптозу и соответственно нарушению функционирования нейронов [43]. При преодолении им желудочно-кишечного и гематоэнцефалического барьера алюминий накапливается в пирамидальных нейронах гиппокампа, которые являются одной из основных мишеней БА [44]. На данный момент деменции, связанные с избыточным поступлением тяжелых металлов, нельзя назвать типичными, но соответствующие модели позволяют точно воспроизвести изолированные патофизиологические механизмы; описания гистологических изменений при них существенно превалируют над фенотипическими характеристиками.

**1.3.9. Деменция, связанная с воздействием азид натрия ( $\text{NaN}_3$ ).** Данная модель позволяет воспроизвести характерную для БА митохондриальную дисфункцию, достигаемую за счет ингибирования азидом натрия дыхательной цепи (части окислительного фосфорилирования), образования свободных радикалов, снижения аэробного метаболизма и эксайтотоксичности. Нарушение холинергической передачи и др. ведут к нарушениям обучаемости и памяти, напоминающим таковые при БА [45]. Для получения данной модели азид натрия хронически вводится крысам в течение месяца (подкожно или локально) либо интраперитонеально на протяжении 2 недель [46, 47].

**1.3.10. Другие фармакологические модели.** Существуют данные о том, что липидный медиатор лизофосфатидная кислота способна вызывать втягивание (ретракцию) отростков нейронов, что приводит к патологии, свойственной БА, в частности, фосфорилированию тау-белка [48]. Было показано, что оксид азота (NO) важен для обучения и памяти, а его ингибиторы (например, NG-нитро-L-аргинин) вызывают их нарушения через генерацию активных форм азота [49]. Другими веществами, способными вызывать нарушения памяти, являются клонидин, клозапин, лигнокаин, фенитоин [7].

С точки зрения поведенческих исследований, фармакологические модели, в отличие от генетических, позволяют проводить эксперименты на крысах, а не только мышах, и, соответственно, получать более углубленные данные о когнитивных функциях и других поведенческих изменениях на фоне моделирования патологии и терапевтических вмешательств.

#### 1.4. Трансгенные модели БА

**1.4.1. Модели, связанные с бета-амилоидом.** Изначальные трансгенные модели БА на крысах позволяли получить накопление бета-амилоида внутри клеток, но не образование сенильных бляшек. Экспрессия у животных человеческих генов *APP*, мутации в котором приводят к семейным формам БА, позволила сильно повысить качество и создать целый ряд различных моделей [50, 51].

Первая такая модель БА на мышах, PDAPP, появилась в 1995 г. с помощью доставки гена *APP* с мутацией V717F, вызывающей семейную форму БА, промотором тромбоцитарного фактора роста бета [52]. Такие мыши демонстрируют внеклеточные отложения бета-амилоида, сенильные бляшки, потерю синапсов, микроглиоз и астроцитоз, которые прогрессивно распространяются от гиппокампа к коре головного мозга. Амилоидные бляшки обнаруживаются у них в возрасте 6–9 мес. [24]. Нарушения в эмоциональной сфере (реакции страха) и исследовательской активности появляются у них в возрасте 11 мес., а памяти – 12–15 мес. [53].

Мыши линии Tg2576 представляют собой одну из наиболее активно используемых моделей БА с экспрессией человеческого APP695. Двойная мутация K670N/M671L приводит к гибели нейронов в регионе гиппокампа CA1 и нарушениях обучаемости, а также глиозу и дистрофии отростков нейронов – эффектам, схожим с таковыми у PDAPP-мышей. У Tg-мышей амилоидные отложения, связанные с более чем в 5 раз повышенной экспрессией APP, появляются к 8-му месяцу жизни [54]. Однако отдельные сенсомоторные нарушения, дефицит пространственной рабочей памяти и/или интереса к новому в Y-образном лабиринте, нарушения кратковременной памяти появляются у них лишь в возрасте 9–14 мес., а значительные когнитивные нарушения не развиваются даже в старости. Преимуществами мышей линии Tg2576 является их давняя история и подробная характеристика, а недостатками – долгое ожидание поведенческих нарушений, не типичная для БА последовательность развития патологии (амилоидная патология предшествует тау-патологии). Нередки побочные эффекты в виде агрессивности, стереотипий, нарушения родительских инстинктов [53]. Ни для PDAPP, ни для Tg2576-мышей не характерна гибель нейронов, что снижает их ценность.

В 2000 г. появилась схожая с Tg2576 модель, несущая двойную мутацию, – APP23 [55]. Амилоидные бляшки в коре головного мозга и гиппокампе, окруженные дистрофическими отростками нейронов, появляются у этих животных в возрасте 6 мес. По сравнению с предыдущими двумя линиями у данных мышей существенно снижается количество пирамидальных нейронов в области CA1 гиппокампа, которое обратно коррелирует с наличием бляшек в данной части мозга [56].

**1.4.2. Модели, связанные с нейрофибрилярными клубочками и тау-белком.** Для воспроизведения нейрофибрилярных клубочков, характерных для БА, были созданы линии мышей, у которых происходит экспрессия мутированной формы человеческого тау-белка и наблюдается его гиперфосфорилирование [57]. Среди них – мыши с мутациями тау-белка JNLP3 (у таких мышей появляются нейрофибрилярные клубочки и астроглиоз в стволе головного мозга и спинном мозге, но не гиппокампе и коре головного мозга), R406W (наблюдается нарушение ассоциативной памяти), “трижды трансгенные мыши” 3 × Tg-AD, несущие трансгены PS1M146V, APPSwe и TauP301L (у них наблюдаются отложения амилоида с 6-месячного возраста и патология, связанная с тау-белком, с 10–12 месяцев, которая начинает появляться в гиппокампе и распространяется в область коры головного мозга), 5xFAD мыши, несущие 3 мутации в гене *APP* и 2 – в гене пресенилина 1, которым свойственны гибель нейронов, когнитивные и моторные нарушения [7, 58]. Мыши с сочетанием нескольких мутаций зачастую не отражают реальные генетические причины БА (количества мутаций) у людей, что заставляет с осторожностью говорить об их валидности. Они представляют собой скорее сочетание двух различных заболеваний, которые обычно не возникают одновременно. Следует отметить, что лишь сочетание многих мутаций, даже одной из которых достаточно для развития БА у человека, у мышей приводит к потере нейронов.

В последние годы вышеупомянутые трансгенные мыши представляют собой одни из наиболее популярных моделей БА и активно используются при изучении патофизиологических путей, поиске потенциальных мишеней терапии и разработке лекарств, однако у них гораздо меньше, чем у людей при БА, выражена воспали-

тельная реакция, появляется она после гиперфосфорилирования тау и отложения бляшек, а не наоборот, и последовательность развития патологической картины заметно отличается от БА у людей. В принципе, в подавляющем большинстве случаев БА представляет собой спорадическое заболевание, поэтому результаты исследований с использованием трансгенных экспериментальных животных могут быть лишь очень ограниченно экстраполированы на БА у человека; возможно, в этом кроется одна из причин неудач клинических исследований потенциальных фармакологических препаратов [59].

**1.4.3. Модели, связанные с аполипопротеином E (ApoE).** Как известно, аллель  $\epsilon 4$  гена *ApoE*, который участвует в накоплении и переработке бета-амилоида, является одним из важнейших факторов риска БА. У мышей Tg2576  $\times$  ApoE не появляются амилоидные бляшки, зато бета-амилоид откладывается в паренхиме мозга, в процессе чего содержание ApoE в их мозгу вырастает на 60% по сравнению с контрольными животными, что дополнительно ведет к образованию нейритических бляшек; мыши Pdapp  $\times$  ApoE демонстрируют отложения амилоида в коре лобных долей [60]. Следует отметить, что половые особенности патологии, связанной с аллелем  $\epsilon 4$  гена *ApoE*, у людей и мышей различаются: в то время как его наличие приводит к микроинсультам у мужчин и клубочкам и бляшкам у женщин, сочетание этих проявлений наблюдается у мышей женского пола [61]. В целом, гендерные особенности моделей БА на мышах остаются предметом живой дискуссии [62].

**1.4.4. Модели, связанные с геном секретазы.** На мышах были разработаны генетические модели БА с помощью модификации активности секретаз бета и гамма, что приводит к отложению бета-амилоида и нарушениям памяти [63].

**1.4.5. Модели, связанные с геном пресенилина.** Мутация в гене пресенилина 1, располагающемся в 14 хромосоме, — одна из основных причин семейной формы БА [64]. Соответствующие трансгенные мыши демонстрируют образование бляшек, нарушение функционирования синапсов и нарушения памяти — характерные проявления БА [65]. В то же время мыши с избыточной экспрессией одного лишь пресенилина 1 или 2 не демонстрируют ожидаемого фенотипа с когнитивными нарушениями. Для его достижения используются линии мышей, созданные в результате скрещивания животных с мутациями в гене пресенилина 1 и Tg2576 (или других линий с мутациями в гене *APP*), что ведет к повышенному отложению амилоида. Такие модели активно используются для изучения механизмов синаптической дисфункции и нарушений памяти при БА, а также тестирования новых терапевтических подходов; для них характерны прогрессирующие отложения бляшек бета-амилоида, нарушения долговременной потенциации, кратковременной и пространственной эмоциональной памяти, которые наступают уже в возрасте 3 мес., и нарушения долговременной памяти и базальной синаптической передачи в возрасте 6 мес. Таким образом, данные модели позволяют относительно быстро наблюдать когнитивные нарушения, однако не предполагают тау-патологии и гибели нейронов, т.е., как и у большинства генетических моделей БА, серьезно страдает их конструктивная валидность [53].

**1.4.6. Модели, связанные с нарушением аксонального транспорта.** У мышей линии *Klc+/-* наблюдаются нарушения аксонального транспорта, связанные с недостатком легких цепей кинезина, а также образование амилоида в связи с нарушением переработки APP при скрещивании с трансгенными мышами APP [66].

## 1.5. Нокаутные животные

Помимо трансгенных животных, которые демонстрируют такие типичные для БА проявления, как избыток бета-амилоида и гиперфосфорилирование тау-белка, для моделирования БА используются также животные с отсутствием некоторых генов. В их числе — мыши hTau, результат скрещивания животных, экспрессирующих че-

ловеческий тау-белок, и нокаутов по гену тау-белка, у которых гиперфосфорилированный тау-белок накапливается в телах и дендритах нейронов в гиппокампе и коре головного мозга, что сопровождается нарушениями памяти, ассоциированными с дефицитом долговременной потенциации [67]; мышцы с нокаутированным геном неприлизина, фермента, участвующего в переработке бета-амилоида [68]; мышцы с нокаутированным геном инсулиндеградирующего фермента, для которых характерно накопление бета-амилоида. Предполагается, что этот фермент вовлечен в патогенез БА с поздним началом, поскольку способен расщеплять предшественник амилоида [69].

### *1.6. Другие трансгенные животные*

#### **1.6.1. Модели, связанные с мутированным человеческим альфа-синуклеином.**

Трансгенным мышам, у которых происходит экспрессия обычного или мутантного человеческого альфа-синуклеина, свойственны такие схожие с БА проявления, как нейродегенеративные изменения с нарушениями моторных функций и разрушение аксонов [70].

#### **1.6.2. Мыши с излишней экспрессией человеческой циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2).**

Трансгенные мыши, у которых происходит оверэкспрессия ЦОГ-2 под контролем промотора *Thy-1* в нейронах гиппокампа, коры и миндалевидных тел, демонстрируют постепенно нарастающий с возрастом когнитивный дефицит [71].

**1.6.3. Мыши с недостатком фактора роста нервов.** Известно, что хронический недостаток фактора роста нервов ведет к дефициту холинергической передачи и нейродегенерации, схожими с наблюдаемыми при БА [72]. У взрослых мышей линии AD11, которым свойственна экспрессия антител к фактору роста нервов, происходят нейроденеративные изменения, сопровождающиеся нарушениями когнитивных функций, проявляющихся в тестах на пространственную память, что связано со снижением холинергической передачи, гибелью нейронов, гиперфосфорилированием и нерастворимостью тау-белка, изменениями цитоскелета нейронов, появлением бета-амилоидных бляшек и нарушением синаптической пластичности в коре головного мозга [7, 73]. Следует подчеркнуть многообразие нейродегенеративных проявлений у данных животных; роль воспаления в этой экспериментальной модели пока что не была охарактеризована в достаточной мере.

### *1.7. Модели, основанные на активации иммунного ответа*

Актуальным вопросом является воспроизведение играющего значительную роль в патофизиологии БА с поздним началом воспалительного ответа. Одним из распространенных методов индуцирования иммунного ответа в нервной ткани является введение липополисахарида (ЛПС), который, взаимодействуя с ко-рецептором CD14 на мембране клеток микроглии, активирует транскрипцию и выброс провоспалительных цитокинов, хемокинов, белков системы комплемента. В то время как хроническое введение ЛПС в головной мозг (четвертый желудочек) крыс вызывает нарушения памяти и обучения, аналогичные когнитивному снижению при БА, системное его введение приводит к избирательному нарушению узнавания объектов, связанному с дисфункцией гиппокампа, с сохранением пространственной памяти, причем воспалительный ответ различается в зависимости от возраста животных: повышение уровня интерлейкина  $1\beta$  характерно только для молодых животных, а интерферона-гамма — для более пожилых [59].

Альтернативным методом активации иммунного ответа в головном мозге является индуцирование системной воспалительной реакции. Одним из предложенных методов является внутриутробная активация иммунного ответа с помощью однократной внутрибрюшинной инъекции беременному животному (мышь) полири-

боинозиновой-полирибозитидиловой кислоты (polyriboinosinic-polyribocytidilic acid, PolyI:C), которая представляет собой синтетическую двуцепочечную РНК, вызывающую аналог вирусной инфекции, а также хроническое воспаление у потомства, включая активацию микроглии, повышение уровней цитокинов начиная с 3-недельного возраста, гиперфосфорилирование белка тау с 3-месячного возраста, амилоидогенез с 1 года. В возрасте 20 месяцев у потомства наблюдаются нарушения пространственной памяти [74]. Несмотря на то, что данная модель не воспроизводит в полной мере такие патологические проявления БА, как амилоидные бляшки и нейрофибриллярные клубочки, она интересна тем, что позволяет исследовать воспалительную теорию развития БА с поздним началом, ее ранние стадии, а также изучать последствия инфекционных заболеваний, перенесенных в раннем возрасте, которые способны приводить к повышенной реактивности глиальных клеток впоследствии.

### *1.8. Деменция, индуцированная диетой с высоким содержанием жиров*

Было показано, что у животных с высоким уровнем холестерина развивается не только атеросклероз, но и нарушения памяти [74], а также повышается риск развития БА [75]. Трансгенные мыши, содержащиеся в условиях диеты с высоким содержанием холестерина, демонстрируют повышенное отложение бета-амилоида [76]. Деменцию у крыс можно вызвать с помощью кормления их в течение 3 месяцев пищей с высоким содержанием жиров, в том числе сала и холестерина [77], поскольку холестерин в головном мозге играет важную роль в переработке и отложении амилоида, а его уровень зависит от такового в крови [75]. Повышенное потребление холестерина приводит к повышению производства и накопления амилоида, который вызывает воспалительную реакцию, оксидативный и нитрозативный стресс [78]. Преимуществом данной модели является то, что она позволяет воспроизвести характерные для БА когнитивные нарушения и важную роль холестерина в ее патофизиологии, а недостатком – времязатратность.

## 2. МОДЕЛИРОВАНИЕ КОГНИТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ ПРИ СОСУДИСТОМ ОРГАНИЧЕСКОМ ЗАБОЛЕВАНИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА И ДЕМЕНЦИИ СОСУДИСТОГО ТИПА

Нарушение кровоснабжения головного мозга является важным фактором развития когнитивных нарушений и деменции, причем механизмы, связанные с развитием деменций сосудистого и альцгеймеровского типа, пересекаются и способствуют большей вероятности гибели нейронов и развитию деменции смешанного генеза: ухудшение кровоснабжения может приводить к замедлению элиминации бета-амилоида [79]. Потенциальным общим механизмом деменций основных двух типов (альцгеймеровского и сосудистого) также являются особенности иммунной системы: хроническое воспаление вокруг амилоидных бляшек и клубочков приводит к нейродегенерации, и типичное для патологоанатомической картины деменции нарушение гематоэнцефалического барьера связывают с иммунологическими реакциями [80].

Вклад сосудистых заболеваний в развитие когнитивных нарушений изучают ряд моделей на животных:

### *2.1. Модель гипергомоцистеинемии (ГГЦ)*

ГГЦ является независимым фактором риска развития сердечно-сосудистых и цереброваскулярных заболеваний [81], а изолированный избыток гомоцистеина у мышей и крыс достаточен для развития у них когнитивного дефицита [82].

В экспериментальных условиях ГГЦ может быть достигнута как путем использования генетических моделей (делеции генов цистатионин-бета-синтазы или ме-

тилентетрагидрофолатредуктазы), так и применением диеты с недостатком витаминов В6, В12 и В9 и избытком метионина в течение 14 недель—полугода [81]. Как было показано в исследованиях на мышах, ГГЦ не влияет на уровень бета-амилоида как таковой, но способствует развитию амилоидной ангиопатии (снижению содержания бета-амилоида в паренхиме лобных долей и гиппокампа и повышению амилоидной ангиопатии более чем в два раза по сравнению с контрольной группой животных) [83].

Выделяют два варианта ГГЦ в зависимости от степени подавления активности микроглии: при высоком потреблении метионина происходит очень выраженная супрессия микроглии, что ведет к лишь умеренной степени ГГЦ, зато при слабом подавлении активности микроглии при дефиците витаминов группы В получают ГГЦ тяжелой степени. Умеренная ГГЦ у мышей ведет к значительному количеству микроинсультов и хроническому воспалению мозговой ткани [83].

При содержании трансгенных мышей линии 3ХТg, которая применяется при исследованиях БА, в условиях дефицита фолатов и витаминов В6 и В12, который ведет к ГГЦ, у животных наблюдаются более выраженные нарушения памяти, амилоидоз паренхимы головного мозга, снижается уровень аполипопротеина Е, участвующего в клиренсе бета-амилоида, что говорит о роли ГГЦ в усугублении основных признаков БА (нарушений памяти, амилоидной и тау-патологии) [84].

### *2.2. Модель билатерального стеноза общей сонной артерии (ОСА)*

Двусторонний стеноз ОСА применяется для получения модели подкорковой ишемической сосудистой деменции на мышах. Для индуцирования стеноза используются микроспираль, которые располагаются снаружи артерий и диаметр которых определяет степень окклюзии. У мышей наблюдается повышенная проницаемость гематоэнцефалического барьера минимум в период с 3 до 14 сут после процедуры, активация микроглии, повышение уровня провоспалительных цитокинов и очаги повреждения белого вещества спустя 2 недели. Слои гиппокампа СА1 и СА3 наиболее подвержены атрофии серого вещества. Результаты позитронно-эмиссионной томографии показывают, что через 6 месяцев после стеноза ОСА гиппокамп меньше утилизирует глюкозу, что говорит о его сниженной активности [82].

Применяются также модели на животных с мутациями: чрезмерной экспрессией белка-предшественника амилоида, которые демонстрируют значительное снижение обучаемости, и дефицитом киназы ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1), активирующейся в ответ на, в частности, оксидативный стресс, ингибирование этой киназы снижает выраженность гипоперфузии [85].

### *2.3. Модель асимметричного стеноза ОСА*

Менее распространенной моделью подкорковой сосудистой деменции на мышах является модель асимметричного стеноза ОСА, для чего на одну из ОСА накладывают микроспираль, приводящую к постоянному снижению кровотока через неделю, а на другую — атероидный констриктор из гипроскопического казеина и стальной оболочки, который обеспечивает постепенное сужение просвета артерии до полной окклюзии примерно через 28 дней после операции. Результатом данного вмешательства являются многочисленные инфаркты в подкорковых областях, а также реакция активации микроглии и гибель нейронов в гиппокампе на стороне констриктора. У животных нарушается пространственная рабочая память, координация движений, снижается спонтанная активность, что говорит о данной модели как воспроизводящей преимущественно поражение белого вещества, сопровождающееся моторными нарушениями и деменцией подкоркового типа [86].

#### *2.4. Модель гипоперфузии головного мозга*

Краткие периоды недостаточного кровоснабжения головного мозга могут приводить к долгосрочному повреждению клеток и когнитивным нарушениям. Окклюзии обеих ОСА или одной подключичной и обеих ОСА приводят к выраженному снижению кровоснабжения гиппокампа и коры головного мозга, однако через 2.5–3 мес. после процедуры происходит значительное (почти полное) восстановление нейронов [87, 88].

Транзиторная окклюзия 4 сосудов (ОСА и позвоночных артерий на 10–20 мин) у крыс позволяет достичь максимального когнитивного дефицита, острой гибели нейронов в гиппокампе и апоптоза олигодендроцитов в коре головного мозга и таламусе. В то время как у молодых крыс поведенческие последствия минимальны, у животных среднего возраста выраженное повреждение мозга проявляется когнитивных дефицитом, например, в радиальном и Т-образном лабиринтах [87].

Подобные модели “общей” ишемии можно рассматривать скорее в качестве моделей органического поражения головного мозга на фоне воздействия наркоза и использовать в целях изучения интраоперационной защиты от ишемии мозга [89]. В целом, основной проблемой вышеописанных моделей гипоперфузии головного мозга является затрудненность трансляции результатов в отношении человека, чьи возможности к восстановлению после ишемии существенно уступают таковым у грызунов.

#### *2.5. Модель микрососудистого поражения головного мозга (МППМ)*

МППМ является последствием ремоделирования мелких сосудов под воздействием артериальной гипертонии и проявляется постепенно нарастающим когнитивным дефицитом. Спонтанно-гипертензивные крысы, у которых артериальная гипертония наступает в возрасте до 10 недель, являются моделью раннего МППМ. У них наблюдают нарушение функционирования гемато-энцефалического барьера, активацию микроглии, повреждение белого вещества в первой трети жизни, а также атрофию головного мозга (включая снижение объема мозжечка) с расширением желудочков, утолщение стенок артериол и увеличение периваскулярных пространств, очаги инфарктирования и кровоизлияний. У данных крыс обнаруживают признаки нарушений пространственной рабочей памяти и внимания, однако было показано, что они связаны с двигательными нарушениями, что является недостатком данной модели в отношении изучения когнитивных функций [90].

#### *2.6. Модель сахарного диабета 2 типа (СД2)*

Известно, что у людей с СД2 и деменцией наблюдаются сосудистые нарушения, микроинсульты и проявления нейропатологии альцгеймеровского типа. Была создана модель сочетания патологии СД2 и БА с помощью скрещивания лептин-резистентных мышей, страдающих ожирением и диабетом (db/db), и мышей, служащих моделью БА (APP $\Delta$ NL/ $\Delta$ NL  $\times$  PS1P264L/P264L) – линия мышей db/AD [91]. У них развиваются значимые когнитивные нарушения к возрасту 12 мес. Аналогичным образом была создана модель APP23/ob/ob-мышей, у которых наблюдается снижение количества аксонов у холинергических нейронов гиппокампа, астроглиоз, системное воспаление, амилоидная ангиопатия, а к годовалому возрасту – значимая атрофия головного мозга [90]. Такие модели коморбидной патологии представляются весьма ценными, ведь они позволяют существенно приблизиться к клинической реальности.

### 2.7. Амилоидная ангиопатия головного мозга

Амилоидная ангиопатия головного мозга проявляется отложением амилоида в стенках сосудов головного мозга, что ведет к их вторичной дегенерации, и несколько трансгенных моделей были созданы на мышах для воссоздания данной патологии, в том числе животные с чрезмерной экспрессией бета-амилоида (Swedish APP), с мутациями Dutch E22Q, Iowa D23 N, E693Δ Osaka в гене бета-амилоида. К примеру, у последних рано развиваются нарушения памяти, ориентации в пространстве и исполнительных функций [82].

### 2.8. Церебральная аутосомно-доминантная артериопатия с субкортикальными инфарктами и лейкоэнцефалопатией (*cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy, CADASIL*)

CADASIL, вызываемая мутацией в гене *Notch3*, является самой частой генетически обусловленной причиной инсультов и сосудистой деменции (с поражением белого вещества). У мышей TgPAC-Notch3R169C, представляющих собой модель данного заболевания, развивается прогрессивное сегментарное поражение белого вещества без потери олигодендроцитов [92]; подробное описание поведенческих проявлений данной патологии пока что ждет своего часа.

### 2.9. Гипоксия в результате воздействия химических веществ

Сосудистая деменция — результат хронической гипоксии, и для моделирования таких когнитивных расстройств у грызунов можно вызвать нарушения памяти с помощью воздействия гипоксии, гиперкапнии и ишемии. Всего 12 с нахождения крысы (8 с — мыши) в окружении чистого углекислого газа и 5 мин гиперкапнии приводят к нарушению их поддержания позы и памяти. Воздействие монооксида углерода (угарного газа, 3 раза по 1 мин с одночасовыми интервалами) также приводит к амнезии [7]. Нитрит натрия ( $\text{NaNO}_2$ ) вызывает нарушения обучаемости и памяти, снижая способность к переносу кислорода. Гидроксиламин вызывает гипоксию и последующие когнитивные нарушения. Есть данные о том, что гипоксия способствует накоплению бета-амилоида, нарушая его деградацию и клиренс, а также воздействуя на фосфорилирование тау-белка, функционирование гемато-энцефалического барьера и дегенерацию нейронов. Гипоксия может влиять на кровоснабжение головного мозга и приводить к воспалительным реакциям, что влияет на фильтрацию бета-амилоида через гемато-энцефалический барьер и способствует его накоплению в головном мозге [93]. Модели гипоксической энцефалопатии позволяют получить разные степени нарушений памяти и применяются для тестирования ноотропов и антиоксидантов с потенциальными эффектами в отношении когнитивных функций [7].

Таким образом, при гипоксии или хронической гипоперфузии головного мозга когнитивные нарушения могут развиваться в результате многочисленных причин: оксидативного стресса, нарушения клиренса токсических продуктов метаболизма, включая бета-амилоид, воспалительной реакции или нарушения функционирования микроглии, астроцитов или клеток эндотелия, и эти механизмы поддаются изучению благодаря многообразию экспериментальных моделей.

## 3. КОГНИТИВНЫЕ НАРУШЕНИЯ, ВЫЗВАННЫЕ ТРАВМОЙ

Известно, что травматизация таких областей головного мозга, как промежуточный мозг или медиальная височная доля, приводит к нарушениям памяти. Такие модели не требуют сложных хирургических вмешательств, что является их преимуществом. Также, повреждение базального крупноклеточного ядра (Мейнерта) при-

водит к нарушениям памяти, сходным с таковыми при БА. Для прицельного повреждения структур головного мозга пользуются, к примеру, нагреванием стереотаксически имплантированного электрода. Воздействие электрошока приводит к ретроградной и антероградной амнезии вследствие снижения количества мускариновых холинэргических рецепторов [7].

Среди моделей физического повреждения головного мозга выделяют 3 основных категории: модели с использованием падающего груза, жидкостно-перкуSSIONного повреждения и контролируемого ушиба коры головного мозга. К примеру, с целью воспроизведения сотрясения на голову мыши с высоты 25 см сбрасывают груз диаметром 10 мм и массой 21 г; при этом не происходит повреждение черепа, а через 1–3 нед. развиваются нарушения памяти [7]. При закрытых черепно-мозговых травмах наблюдаемая патоморфологическая картина с активацией микроглии и астроцитов весьма схожа с таковой у людей. Альтернативные методы предполагают, к примеру, сбрасывание грузов на диск, прикрепленный к поверхности черепа, что, в зависимости от тяжести воздействия, ведет к когнитивным и двигательным нарушениям.

Фокальные травмы в результате гидродинамического удара достигаются с помощью пульсации давления жидкости на неповрежденную твердую мозговую оболочку и представляют собой модели контузии головного мозга. При них наблюдается повышение внутричерепного давления, нарушение проницаемости гематоэнцефалического барьера, кровоизлияния, а среди последствий манифестируют моторные и когнитивные нарушения различной тяжести, причем надо учитывать, что моторные нарушения могут затруднять оценку когнитивных. Наконец, при использовании модели контролируемого ушиба коры головного мозга используют помпу, которой наносят удар по неповрежденной твердой мозговой оболочке в интересующей исследователей области, достигая при этом неврологического дефицита [94]. Можно прийти к выводу, что при хорошей воспроизводимости модели черепно-мозговых травм сложно использовать для исследования когнитивного функционирования по причине их обширного повреждающего характера.

#### 4. ДЕМЕНЦИЯ, СВЯЗАННАЯ С ВОЗДЕЙСТВИЕМ БЕНЗОДИАЗЕПИНОВ

Бензодиазепины способны вызывать амнезию в связи с подавлением долговременной потенциации, клеточного механизма обучения и памяти. Наблюдения показывают, что применение различных бензодиазепинов приводит к нарушениям памяти. Интраперитонеальное введение диазепама (0.5–3 мг/кг) или лоразепама (0.06–0.5 мг/кг) за 30 мин до обучающей сессии вызывает антероградную амнезию [95]. Было показано, что трибензодиазепины (алпразолам, триазолам) также способны индуцировать антеро- и ретроградную амнезию у мышей [7]. Поскольку злоупотребление бензодиазепинами продолжает оставаться проблемой, несмотря на существование более приемлемых методов терапии бессонницы, изучение механизмов их воздействия на когнитивные функции и методов терапии возникающего дефицита, к сожалению, все еще представляется актуальной задачей.

#### 5. КОГНИТИВНЫЕ НАРУШЕНИЯ В РЕЗУЛЬТАТЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ АЛКОГОЛЯ

Высокие дозы этанола способны приводить к ретроградной амнезии и нарушениям всех этапов памяти (кодирования, хранения, консолидации и вспоминания), что связывают с нарушениями внимания, сенсомоторных функций, а также мотивации [96]. Среди острых эффектов этанола – повышение синтеза оксида азота в префронтальной коре, амигдале и гиппокампе, которые обеспечивают когнитивное функционирование, нарушение глутаматергической передачи и др. [97, 98].

При потреблении беременной крысой алкоголя с 11-го по 22-й день беременности у ее потомства наблюдается сниженная обучаемость во взрослом возрасте [99]. Острое (0.5–1 г/кг) и хроническое (2 г/кг перорально в течение 24 дней) введение этанола крысам также вызывает у них нарушения памяти и когнитивной гибкости [98, 100]. Интересным аспектом изучения взаимосвязей между употреблением алкоголя и когнитивными функциями представляется исследование механизмов влияния когнитивной гибкости на развитие алкогольной зависимости.

## 6. КОГНИТИВНЫЕ НАРУШЕНИЯ, ВЫЗВАННЫЕ ДЕФИЦИТОМ ТИАМИНА (ВИТАМИНА В1)

Дефицит тиамина характерен для хронического воздействия алкоголя и соответственно Корсаковского синдрома. 3–4 недели содержания мышей в условиях диеты с недостатком тиамина приводят к гибели холинергических нейронов в переднем мозге и холинергических волокон, иннервирующих гиппокамп, что проявляется нарушениями памяти. Механизм связан со снижением активности ферментов, зависящих от тиамина, что приводит к гибели нейронов, активации глии, воспалению, нарушению окислительных процессов и дегенерации отростков нейронов в определенных частях таламуса. Недостаточность витамина В1 также вызывают с помощью применения пиритиамина, ингибитора абсорбции и метаболизма тиамина, одновременно с диетой с недостатком тиамина; данную модель используют уже больше 40 лет для изучения молекулярных основ и поведенческих проявлений Корсаковского синдрома, индуцированного дефицитом тиамина. Основным механизмом гибели нейронов при данной модели является глутаматная эксцитотоксичность [7, 101, 102].

Таким образом, существует множество моделей когнитивных нарушений, разработанных на животных, отражающих самые разные патофизиологические пути. В то время как фармакологические модели нейродегенеративных заболеваний широко применяются в исследованиях патогенеза и терапии деменций на протяжении многих лет, более современные, обладающие своими преимуществами трансгенные модели становятся все более популярными в последние годы, однако их патофизиология не отражает происходящее при превалирующей спорадической форме БА. Сейчас не существует модели, которая бы сочетала в себе все когнитивные, поведенческие, биохимические и гистологические нарушения, характерные для БА, однако разнообразие модельных животных открывает широкие возможности для доклинических исследований [7]. Следует ожидать применение различных стратегий для сокращения разрыва между деменциями у людей и экспериментальными моделями для более успешной трансляции результатов исследований: как более подробное описание уже существующих моделей с помощью современных методов, так и попытки разработки все более этиологически верных моделей с лучшей предсказательной валидностью.

В то время как такой аспект когнитивного функционирования людей, как речь является недоступным для доклинических исследований, хотелось бы видеть углубление фенотипирования поведенческих проявлений у экспериментальных животных, расширение стандартной батареи тестов для мышей, чаще всего представляющей собой водный лабиринт Морриса, распознавание новых объектов и/или создание условного рефлекса страха. К примеру, внимание можно оценивать с помощью теста с серийными ответами (2-choice/5-choice serial reaction time task), исполнительские функции – с помощью теста на когнитивную гибкость, задачи на переключение внимания (attentional set shifting task). В целом экспериментальное моделирование когнитивных нарушений на животных представляется приоритетным подходом в нейробиологических исследованиях неврологической и психической патологии.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках Государственного задания (тема № АААА-А18-118012290373-7 “Механизмы формирования физиологических функций в фило- и онтогенезе и влияние на них эндогенных и экзогенных факторов”).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Stewart A.M., Kalueff A.V.* Developing better and more valid animal models of brain disorders. *Behav. Brain Res.* 276: 28–31. 2015.
2. *Al Dahhan N.Z., De Felice F.G., Munoz D.P.* Potentials and Pitfalls of Cross-Translational Models of Cognitive Impairment. *Front. Behav. Neurosci.* 13: 48. 2019.
3. *Mangialasche F., Solomon A., Winblad B., Mecocci P., Kivipelto M.* Alzheimer’s disease: clinical trials and drug development. *Lancet Neurol.* 9(7): 702–16. 2010.
4. *Sarasa M., Pesini P.* Natural non-transgenic animal models for research in Alzheimer’s disease. *Curr. Alzheimers Res.* 6(2): 171–178. 2009.
5. *Dam D.V., Deyn P.P.D.* Drug discovery in dementia: the role of rodent models. *Nat. Rev.* 5: 956–970. 2006.
6. *Pype S., Moechars D., Dillen L., Mercken M.* Characterization of amyloid beta peptides from brain extracts of transgenic mice overexpressing the London mutant of human amyloid precursor protein. *J. Neurochem.* 84: 602–609. 2003.
7. *Neha, Sodhi R.K., Jaggi A.S., Singh N.* Animal models of dementia and cognitive dysfunction. *Life Sci.* 109(2): 73–86. 2014.
8. *Erickson C.A., Barnes C.A.* The neurobiology of memory changes in normal aging. *Exp. Gerontol.* 38: 61–69. 2003.
9. *Cummings B.J., Head E., Ruehl W., Milgram N.W., Cotman C.W.* The canine as an animal model of human aging and dementia. *Neurobiol. Aging.* 17: 259–268. 1996.
10. *Head E., Moffat K., Das P., Sarsoza F., Poon W.W., Landsberg G., Cotman C.W., Murphy M.P.*  $\beta$ -Amyloid deposition and tau phosphorylation in clinically characterized aged cats. *Neurobiol. Aging.* 26: 749–763. 2005.
11. *Uchida K., Yoshino T., Yamaguchi R., Tateyama S., Kimoto Y., Nakayama H., Goto N.* Senile plaques and other senile changes in the brain of an American black bear. *Vet. Pathol.* 32: 412–414. 1995.
12. *Sani S., Traul D., Klink A., Niaraki N., Gonzalo-Ruiz A., Wu C.-K., Geula C.* Distribution, progression and chemical composition of cortical amyloid- $\beta$  deposits in aged rhesus monkeys: similarities to the human. *Acta Neuropathol. (Berl)*. 105: 145–156. 2003.
13. *Okuma Y., Nomura Y.* Senescence-accelerated mouse (SAM) as an animal model of senile dementia: pharmacological, neurochemical and molecular biological approach. *Jpn. J. Pharmacol.* 78: 399–404. 1998.
14. *Chen Y., Wei G., Nie H., Lin Y., Tian H., Liu Y., Yu X., Cheng S., Yan R., Wang Q., Liu D.H., Deng W., Lai Y., Zhou J.H., Zhang S.X., Lin W.W., Chen D.F.*  $\beta$ -Asarone prevents autophagy and synaptic loss by reducing ROCK expression in a senescence-accelerated prone 8 mice. *Brain Res.* 1552: 41–54. 2014.
15. *Stefanova N.A., Kozhevnikova O.S., Vitovtov A.O., Maksimova K.Y., Logvinov S.V., Rudnitskaya E.A., Korbolina E.E., Muraleva N.A., Kolosova N.G.* Senescence-accelerated OXYS rats: a model of age-related cognitive decline with relevance to abnormalities in Alzheimer disease. *Cell Cycle.* 13(6): 898–909. 2014.
16. *Chen C., Li X. H., Zhang S., Tu Y., Wang Y.M., Sun H.T.* 7,8-dihydroxyflavone ameliorates scopolamine induced Alzheimer-like pathologic dysfunction. *Rejuvenation Res.* 17(3): 249–254. 2013.
17. *Riedel G., Kanga S.H., Choib D.Y., Platt B.* Scopolamine induced deficits in social memory in mice: reversal by donepezil. *Behav. Brain Res.* 204: 217–225. 2009.
18. *Lannert H., Hoyer S.* Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behav. Neurosci.* 112: 1199–1208. 1998.
19. *Grunblatt E., Koutsilieri E., Hoyer S., Riederer P.* Gene expression alterations in brain areas of intracerebroventricular streptozotocin treated rat. *J. Alzheimers. Dis.* 9: 261–271. 2006.
20. *Grunblatt E., Salkovic-Petrisic M., Osmanovic J., Riederer P., Hoyer S.* Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. *J. Neurochem.* 101: 757–770. 2007.
21. *Lester-Coll E., Rivera S.J., Soscia K., Doiron K., Wands J.R., de la Monte S.M.* Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer’s disease. *J. Alzheimers Dis.* 9: 13–33. 2006.
22. *Mansouri M.T., Naghizadeh B., Ghorbanzadeh B., Farbood Y., Sarkaki A., Bavarsad K.* Gallic acid prevents memory deficits and oxidative stress induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 111: 90–96. 2013.

23. Desrumaux C., Pisoni A., Meunier J., Deckert V., Athias A., Perrier V., Villard V., Lagrost L., Verdier J.M., Maurice T. Increased amyloid- $\beta$  peptide-induced memory deficits in phospholipid transfer protein (PLTP) gene knockout mice. *Neuropsychopharmacology*. 38: 817–825. 2013.
24. Yamada K., Nabeshima T. Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of antidementia drugs. *Pharmacol. Ther.* 88: 93–113. 2000.
25. Abajji T.N., Nill L., Ide N., Keller C., Hoffmann U., Weiss N. Acute hyperhomocysteinemia induces microvascular and macrovascular endothelial dysfunction. *Arch. Med. Res.* 38: 411–416. 2007.
26. Herrmann R.W. Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. *FEBS Lett.* 580: 2994–3005. 2006.
27. Koladiya R.U., Jaggi A.S., Singh N., Sharma B.K. Ameliorative role of atorvastatin and pitavastatin in L-methionine induced vascular dementia in rats. *BMC Pharmacol.* 8: 1–12. 2008.
28. Eyrard P.A., Ragusi C., Boschi G., Verbeeck R.K., Scherrmann J.M. Simultaneous microdialysis in brain and blood of the mouse: extracellular and intracellular brain colchicine disposition. *Brain Res.* 786: 122–127. 1998.
29. Ganguly R., Guha D. Alteration of brain monoamines & EEG wave pattern in rat model of Alzheimer's disease & protection by *Moringa oleifera*. *Indian. J. Med. Res.* 128: 744–751. 2008.
30. Kumar A., Seghal N., Naidu P. S., Padi S.S., Goyal R. Colchicine-induced neurotoxicity as an animal model of sporadic dementia of Alzheimer's type. *Pharmacol. Rep.* 59: 274–283. 2007.
31. Kumar A., Dogra S., Prakash A. Neuroprotective effects of *Centella asiatica* against intracerebroventricular colchicine-induced cognitive impairment and oxidative stress. *Int. J. Alzheimers Dis.* 2009: 1–8. 2009.
32. Tilson H.A., Rogers B.C., Grimes L., Harry G.J., Peterson N.J., Hong J.S., Dyer R.S. Time-dependent neurobiological effects of colchicine administered directly into the hippocampus of rats. *Brain Res.* 408: 163–172. 1987.
33. Medina M., Avila J., Villanueva N. Use of okadaic acid to identify relevant phosphoepitopes in pathology: a focus on neurodegeneration. *Mar. Drugs*. 11: 1656–1668. 2013.
34. Song X.Y., Hu J.F., Chu S.F., Zhang Z., Xu S., Yuan Y.H., Han N., Liu Y., Niu F., He X., Chen N.H. Ginsenoside Rg1 attenuates okadaic acid induced spatial memory impairment by the GSK3 $\beta$ /tau signaling pathway and the A $\beta$  formation prevention in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 710: 29–38. 2013.
35. Kamat P.K., Rai S., Nath C. Okadaic acid induced neurotoxicity: an emerging tool to study Alzheimer's disease pathology. *Neurotoxicology*. 37: 163–172. 2013.
36. Zhang Z., Simpkins J.W. An okadaic acid induced cognitive deficiency and oxidative stress in an experimental model of tauopathy. *Brain Res.* 1359: 233–246. 2009.
37. Ramirez C., Tercero I., Pineda A., Burgos J.S. Simvastatin is the statin that most efficiently protects against kainate-induced excitotoxicity and memory impairment. *J. Alzheimers. Dis.* 24: 161–174. 2011.
38. Zhang J., Li P., Wang Y., Liu J., Zhang Z., Cheng W., Wang Y. Ameliorative effects of a combination of baicalin, jasminoidin and cholic acid on ibotenic acid-induced dementia model in rats. *PLoS One*. 8: e56658. 2013.
39. Hosseini N., Alaei H., Reisi P., Radahmadi M. The effect of treadmill running on passive avoidance learning in animal model of Alzheimer disease. *Int. J. Prev. Med.* 4: 187–192. 2013.
40. Männistö P.T., Tuomainen P., Kutepova O., Borisenko S.A., Zolotov N., Voronina T. Effects of bilateral cholinotoxin infusions on the behavior and brain biochemistry of the rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49(1): 33–40. 1994.
41. Bonda D. J., Lee H.G., Blair J.A., Zhu X., Perry G., Smith M.A. Role of metal dyshomeostasis in Alzheimer's disease. *Metallomics*. 3: 267–270. 2011.
42. Jellinger K.A. The relevance of metals in the pathophysiology of neurodegeneration, pathological considerations. *Int. Rev. Neurobiol.* 110: 1–47. 2013.
43. Oshima E., Ishihara T., Yokota O., Nakashima-Yasuda H., Nagao S., Ikeda S., Naohara J., Terada S., Uchitomi Y. Accelerated tau aggregation, apoptosis and neurological dysfunction caused by chronic oral administration of aluminum in a mouse model of tauopathies. *Brain Pathol.* 23: 633–644. 2013.
44. Bhattacharjee S., Zhao Y., Hill J. M., Culicchia F., Kruck T.P., Percy M.E., Pogue A.I., Walton J.R., Lukiw W.J. Selective accumulation of aluminum in cerebral arteries in Alzheimer's disease (AD). *J. Inorg. Biochem.* 126: 35–37. 2013.
45. Luques L., Shoham S., Weinstock M. Chronic brain cytochrome oxidase inhibition selectively alters hippocampal cholinergic innervation and impairs memory: prevention by ladostigil. *Exp. Neurol.* 206: 209–219. 2007.
46. Szabados T., Dul C., Majtenyi K., Hargitai J., Péntzes Z., Urbanics R. A chronic Alzheimer's model evoked by mitochondrial poison sodium azide for pharmacological investigations. *Behav. Brain. Res.* 154: 31–40. 2004.
47. Zhang L., Zhang R. Y., Li Y.L., Zhang L., Ye C.F., Li L. Effects of Shenwu capsule on learning-memory ability and cholinergic function of brain in AD-like rat model induced by chronic infusion of sodium azide by minipump. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 38:1300–1305. 2013.
48. Sharma V.K. Experimental models for Alzheimer's disease. *Mech. View*. 1: 13–22. 2010.

49. Yamada K., Noda Y., Nakayama S., Komori Y., Sugihara H., Hasegawa T., Nabeshima T. Role of nitric oxide in learning and memory and in monoamine metabolism in the rat brain. *Br. J. Pharmacol.* 115: 852–858. 1995.
50. Balducci C., Forloni G. APP transgenic mice. Their use and limitations. *Neuromol. Med.* 13: 117–137. 2010.
51. Umeda T., Maekawa S., Kimura T., Takashima A., Tomiyama T., Mori H. Neurofibrillary tangle formation by introducing wild-type human tau into APP transgenic mice. *Acta Neuropathol.* 127(5): 685–698. 2014.
52. Games D., Adams D., Alessandrini R., Barbour R., Berthelette P., Blackwell C., Carr T., Clemes J., Donaldson T., Gillespie F., Guido T., Hagopian S., Johnson-Wood K., Khan K., Lee M., Leibowitz P., Lieberburg I., Little S., Masliah E., McConlogue L., Montoya-Zavala M., Mucke L., Paganini L., Penniman E., Power M., Schenk D., Seubert P., Snyder B., Soriano F., Tan H., Vitale J., Wadsworth S., Wolozin B., Zhao J. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F b-amyloid precursor protein. *Nature.* 373: 523–527. 1995.
53. Puzzo D., Gulisano W., Palmeri A., Arancio O. Rodent models for Alzheimer's disease drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 10(7): 703–711. 2015.
54. Elder G.A., Gama Sosa M.A., Gasperi R.D. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Mt. Sinai. J. Med.* 77: 69–81. 2010.
55. Sturchler-Pierrat C., Staufenbiel M. Pathogenic mechanisms of Alzheimer's disease analyzed in the APP23 transgenic mouse model. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 920: 134–139. 2000.
56. Calhoun M.E., Wiederhold K.H., Abramowski D. Amyloid plaques and neuron death in APP transgenic mice. *Nature.* 395: 755–756. 1998.
57. Carmo S.D., Cuello A.C. Modeling Alzheimer's disease in transgenic rats. *Mol. Neurodegener.* 8: 1–37. 2013.
58. Talboo J.K., Holtzman D.M. Animal models of Alzheimer's disease. *Encycl. Neurosci.* 415–421. 2009.
59. Nazem A., Sankowski R., Bacher M., Al-Abed Y. Rodent models of neuroinflammation for Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation.* 12: 74. 2015.
60. Wahrle S.E., Jiang H., Parsadanian M., Kim J., Li A., Knoten A., Jain S., Hirsch-Reinshagen V., Wellington C.L., Bales K.R., Paul S.M., Holtzman D.M. Overexpression of ABCA1 reduces amyloid deposition in the PDAPP mouse model of Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* 118: 671–682. 2008.
61. Finch C.E., Shams S. Apolipoprotein E and sex bias in cerebrovascular aging of men and mice. *Trends Neurosci.* 39: 625–637. 2016.
62. Dubal D.B., Broestl L., Worden K. Sex and gonadal hormones in mouse models of Alzheimer's disease: what is relevant to the human condition? *Biol. Sex. Differ.* 3: 24. 2012.
63. Schmitz C., Ruten B.P., Pielen A., Schäfer S., Wirths O., Tremp G., Czech C., Blanchard V., Multhaup G., Rezaie P., Korr H., Steinbusch H.W., Pradier L., Bayer T.A. Hippocampal neuron loss exceeds amyloid plaque load in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 164: 1495–1502. 2004.
64. Ertekin-Taner N. Genetics of Alzheimer's disease: a centennial review. *Neurol. Clin* 25: 611–667. 2007.
65. Parent A.T., Thinakaran G. Modeling presenilin-dependent familial Alzheimer's disease: emphasis on presenilin substrate-mediated signaling and synaptic function. *Int. J. Alzheimers. Dis.* 2010: 1–11. 2010.
66. Stokin G.B., Lillo C., Falzone T.L., Brusch R.G., Rockenstein E., Mount S.L., Raman R., Davies P., Masliah E., Williams D.S., Goldstein L.S. Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science.* 307: 1282–1288. 2005.
67. Polydoro M., Acker C.M., Duff K., Castillo P.E., Davies P. Age-dependent impairment of cognitive and synaptic function in the htau mouse model of tau pathology. *J. Neurosci.* 29: 10741–10749. 2009.
68. Grimm M.O.W., Mett J., Stahlmann C.P., Hauptenthal V.J., Zimmer V.C., Hartmann T. Nephrylysin and A $\beta$  clearance: impact of the APP intracellular domain in NEP regulation and implications in Alzheimer's. *Front. Aging. Neurosci.* 5: 1–27. 2013.
69. Farris W., Mansourian S., Chang Y., Lindsley L., Eckman E.A., Frosch M.P., Eckman C.B., Tanzi R.E., Selkoe D.J., Guenette S. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid  $\beta$ -protein, and the  $\beta$ -amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:4162–4167. 2003.
70. Van der Putten H., Wiederhold K.H., Probst A., Barbieri S., Mistl C., Danner S., Kauffmann S., Hofele K., Spooren W.P., Ruegg M.A., Lin S., Caroni P., Sommer B., Tolnay M., Bilbe G. Neuropathology in mice expressing human alpha-synuclein. *J. Neurosci.* 20: 6021–6029. 2000.
71. Andreasson K.I., Savonenko A., Vidensky S., Goellner J.J., Zhang Y., Shaffer A., Kaufmann W.E., Worley P.F., Isakson P., Markowska A.L. Age-dependent cognitive deficits and neuronal apoptosis in cyclooxygenase-2 transgenic mice. *J. Neurosci.* 21: 8198–209. 2001.
72. Capsoni S., Ugolini G., Comparini A. Alzheimer-like neurodegeneration in aged antinerve growth factor transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 6826–6831. 2000.

73. *Pesavento E., Capsoni S., Domenici L., Cattaneo A.* Acute cholinergic rescue of synaptic plasticity in the neurodegenerating cortex of antinerve-growth-factor mice. *Eur. J. Neurosci.* 15: 1030–1036. 2002.
74. *Krstic D., Madhusudan A., Doehner J., Vogel P., Notter T., Imhof C.* Systemic immune challenges trigger and drive Alzheimer-like neuropathology in mice. *J. Neuroinflammation.* 9: 151. 2012.
75. *Wood W.G., Li L., Muller W.E., Eckert G.P.* Cholesterol as a causative factor in Alzheimer's disease: a debatable hypothesis. *J. Neurochem.* 129(4): 559–572. 2013.
76. *Herculano B., Tamura M., Ohba A., Shimatani M., Kutsuna N., Hisatsune T.*  $\beta$ -Alanyl-L-histidine rescues cognitive deficits caused by feeding a high fat diet in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 33: 983–997. 2013.
77. *Sodhi R.K., Singh N.* Defensive effect of lansoprazole in dementia of AD type in mice exposed to streptozotocin and cholesterol enriched diet. *PLoS One.* 31: e70487. 2013.
78. *Reed B., Villeneuve S., Mack W., DeCarli C., Chui H. C., Jagust W.* Associations between serum cholesterol levels and cerebral amyloidosis. *JAMA Neurol.* 71: 195–200. 2014.
79. *Snyder H.M., Corriveau R.A., Craft S., Faber J.E., Greenberg S.M., Knopman D., Lamb B.T., Montine T.J., Nedergaard M., Schaffer C.B., Schneider J.A., Wellington C., Wilcock D.M., Zippel G.J., Zlokovic B., Bain L.J., Bosetti F., Galis Z.S., Korshetz W., Carrillo M.C.* Vascular contributions to cognitive impairment and dementia including Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 11(6): 710–717. 2015.
80. *Arvanitakis Z., Leurgans S.E., Barnes L.L., Bennett D.A., Schneider J.A.* Microinfarct pathology, dementia, and cognitive systems. *Stroke.* 42(3): 722–727. 2011.
81. *Sudduth T.L., Powell D.K., Smith C.D., Greenstein A., Wilcock D.M.* Induction of hyperhomocysteinemia models vascular dementia by induction of cerebral microhemorrhages and neuroinflammation. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 33(5): 708–715. 2013.
82. *Gooch J., Wilcock D.M.* Animal Models of Vascular Cognitive Impairment and Dementia (VCID). *Cell Mol. Neurobiol.* 36(2): 233–239. 2016.
83. *Sudduth T.L., Weekman E.M., Brothers H.M., Braun K., Wilcock D.M.* Beta-amyloid deposition is shifted to the vasculature and memory impairment is exacerbated when hyperhomocysteinemia is induced in APP/PS1 transgenic mice. *Alzheimer's Res. Therapy.* 6(3): 32. 2014.
84. *Li J.G., Pratico D.* High levels of homocysteine results in cerebral amyloid angiopathy in mice. *J. Alzheimers Dis.* 43(1): 29–35. 2015.
85. *Toyama K., Koibuchi N., Uekawa K., Hasegawa Y., Kataoka K., Katayama T., Sueta D., Ma M.J., Nakagawa T., Yasuda O., Tomimoto H., Ichijo H., Ogawa H., Kim-Mitsuyama S.* Apoptosis signal-regulating kinase 1 is a novel target molecule for cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 368: 1326–1334. 2013.
86. *Hattori Y., Enmi J., Kitamura A., Yamamoto Y., Saito S., Takahashi Y.* A novel mouse model of subcortical infarcts with dementia. *J. Neurosci.* 35(9): 3915–3928. 2015.
87. *Neto C.J.B.F., Paganelli R.A., Benetoli A., Lima K.C.M., Milani H.* Permanent, 3-stage, 4-vessel occlusion as a model of chronic and progressive brain hypoperfusion in rats: a neurohistological and behavioral analysis. *Behav. Brain. Res.* 160(2): 312–322. 2005.
88. *Щербак Н.С., Галагудза М.М.* Экспериментальные модели ишемического инсульта. *Бюл. ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова.* 3:3 9–47. 2011. [*Scherbak N.S., Galagudza M.M.* Experimental models of ischemic stroke. *Byul FTSKSE them. Im A. Almazova.* 3: 39–47. 2011. (In Russ)].
89. *Шмонин А.А., Мальцева М.Н., Мельникова Е.В.* Доклинические исследования лекарственных средств на биологических моделях инсульта. *Журн. неврол. психиатр.* 12(2): 45–52. 2017. [*Shmonin A.A., Maltseva M.N., Melnikova E.V.* Preclinical studies of drugs on biological models of stroke. *Zhurn. Nevrol. Psichiatrist.* 12(2): 45–52. 2017. (In Russ)].
90. *Jiwa N.S., Garrard P., Hainsworth A.H.* Experimental models of vascular dementia and vascular cognitive impairment: a systematic review. *J. Neurochem.* 115(4): 814–828. 2010.
91. *Niedowicz D.M., Reeves V.L., Platt T.L., Kohler K., Beckett T.L., Powell D.K., Lee T.L., Sexton T.R., Song E.S., Brewer L.D., Latimer C.S., Kraner S.D., Larson K.L., Ozcan S., Norris C.M., Hersh L.B., Porter N.M., Wilcock D.M., Murphy M.P.* Obesity and diabetes cause cognitive dysfunction in the absence of accelerated  $\beta$ -amyloid deposition in a novel murine model of mixed or vascular dementia. *ACTA Neuropathol. Commun.* 2: 64. 2014.
92. *Cognat E., Cleophax S., Domenga-Denier V., Joutel A.* Early white matter changes in CADASIL: evidence of segmental intramyelinic oedema in a pre-clinical mouse model. *Acta. Neuropathol. Commun.* 2: 49. 2014.
93. *Zhang X., Le W.* Pathological role of hypoxia in Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* 223: 299–303. 2010.
94. *Сысоев Ю.И., Оковитый С.В.* Моделирование черепно-мозговых травм у лабораторных животных в нейрофармакологии. *Вестник образования и развития науки. Рос. акад. естествен. наук.* 22(3): 66–73. 2018. [*Sysoev Yu.I., Okovity S.V.* Modeling of head injuries in laboratory animals in neuropharmacology. *Bulletin of education and development of science Ros. Acad. Natural. Sciences.* 22(3): 66–73. 2018. (In Russ)].
95. *McNamara R.K., Skeleton R.W.* Assessment of a cholinergic contribution to chlorodiazepoxide induced deficits of place learning in the Morris water maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 41: 529–538. 1992.

96. Nader K., Wang S.H. Fading in. *Learn. Mem.* 13: 530–535. 2006.
97. White A.M., Matthews D.B., Best P. J. Ethanol, memory, and hippocampal function: a review of recent findings. *Hippocampus.* 10: 88–93. 2000.
98. Mailliard W.S., Diamond I. Recent advances in the neurobiology of alcoholism: the role of adenosine. *Pharmacol. Ther.* 101: 39–46. 2004.
99. Westergren S., Rydenhag B., Bassen M., Archer T., Conradi N.G. Effects of prenatal alcohol exposure on activity and learning in Sprague Dawley rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 55: 515–520. 1996.
100. Hashemi Nosrat Abadi T., Vaghef L., Babri S., Mahmood-Alilo M., Beirami M. Effects of different exercise protocols on ethanol-induced spatial memory impairment in adult male rats. *Alcohol.* 47: 1058. 309–316. 2013.
101. Savage L.M., Hall J.M., Resende L.S. Translational rodent models of Korsakoff syndrome reveal the critical neuroanatomical substrates of memory dysfunction and recovery. *Neuropsychol. Rev.* 22: 195–209. 2012.
102. Karuppagounder S.S., Xu H., Shi Q., Chen L.H., Pedrini S., Pechman D., Baker H., Beal M.F., Gandy S.E., Gibson G.E. Thiamine deficiency induces oxidative stress and exacerbates the plaque pathology in Alzheimer's mouse model. *Neurobiol. Aging.* 30: 15. 2009.

### Animal Models of Cognitive Impairment in Neurodegenerative and Organic Disorders

M. V. Dorofeykova<sup>a, \*</sup>, N. N. Petrova<sup>b</sup>, and A. Yu. Egorov<sup>a, b, c</sup>

<sup>a</sup>*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, St. Petersburg, Russia*

<sup>b</sup>*Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia*

<sup>c</sup>*Mechnikov Northwestern State Medical University, Saint Petersburg, Russia*

\*e-mail: mvdorofeykova@mail.ru

Animal models of mental disorders play an important role in the study of pathophysiological mechanisms of behavior and translation of these data for the identification of causes, biomarkers and potential treatments of mental disorders in humans. This article presents a review of literature on animal models of Alzheimer's disease, cognitive impairment in vascular dementia and organic brain disease. Pharmacological, genetic models, their mechanisms and typical manifestations are covered. While pharmacological models have been widely used in studies of pathogenesis and treatment of cognitive impairment for many years, more modern transgenic models with their advantages are becoming increasingly popular in recent years. Currently there is no model that would combine all the cognitive, behavioral, biochemical and histological characteristics of a particular type of dementia, but a variety of animal models gives a lot of opportunities for preclinical research.

**Keywords:** preclinical research, animal model, Alzheimer's disease, cognitive functioning, cognitive impairment

#### ЦИТИРОВАТЬ:

Дорофейкова М.В., Петрова Н.Н., Егоров А.Ю. Экспериментальные модели когнитивных нарушений при нейродегенеративных и органических расстройствах. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 106(2): 157–175.

DOI: 10.31857/S086981392002003X

#### TO CITE THIS ARTICLE:

Dorofeykova M.V., Petrova N.N., Egorov A.Yu. Animal models of cognitive impairment in neurodegenerative and organic disorders. *Russian Journal of Physiology.* 106(2): 157–175.

DOI: 10.31857/S086981392002003X

---

---

ОБЗОРНЫЕ  
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

---

---

**ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА  
К УЛЬЦЕРОГЕННЫМ ФАКТОРАМ И АКТИВНОСТЬ  
ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНО-АДРЕНКОРТИКАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ  
ПРИ РАЗВИТИИ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРОВАННОГО ДИАБЕТА**

© 2020 г. Т. Т. Подвигина<sup>1</sup>, \*, Л. П. Филаретова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия*

*\*E-mail: tpodvigina@yandex.ru*

Поступила в редакцию 15.11.2019 г.

После доработки 26.11.2019 г.

Принята к публикации 26.11.2019 г.

В настоящем обзоре проведен анализ данных литературы и полученных нами экспериментальных результатов о чувствительности слизистой оболочки желудка к ulcerогенным факторам и активности гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы (ГГКС) при развитии стрептозотоцин-индуцированного диабета у крыс. Проведенный анализ позволил заключить: а) уже в ранние сроки развития диабета (через 3 суток после введения стрептозотоцина) у крыс наблюдается увеличение чувствительности желудка к ulcerогенному стимулу и повышение уровня кортикостерона в крови, сопровождающееся катаболическим эффектом, наблюдаемые изменения усугубляются при дальнейшем развитии патологического процесса; б) развитие диабета приводит к хронической активации ГГКС, о чем свидетельствует повышение базального и стрессорного уровня кортикостерона, наряду с гипертрофией надпочечников, в разные сроки после введения стрептозотоцина; в) повышенный уровень кортикостерона в крови крыс с диабетом ответственен за катаболический эффект и, частично, за повышенный уровень глюкозы в крови; г) кортикотропин-рилизинг фактор (КРФ), как экзогенный, так и эндогенный, способен оказывать гастропротективное влияние не только у контрольных животных, но и у крыс с со стрептозотоцин-индуцированным диабетом; КРФ-рецепторы 1 и 2 типа участвуют в опосредовании этого эффекта.

*Ключевые слова:* диабет, стрептозотоцин, эрозии желудка, кортикостерон, кортикотропин-рилизинг фактор

**DOI:** 10.31857/S0869813920020090

Диабет занимает третье место среди причин смерти после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний [1]. Высокая смертность при диабете связана с тяжелыми нарушениями в различных органах, основными причинами которых являются ангиопатия и нейропатия [2, 3]. При изучении влияния диабета на желудочно-кишечный тракт выявлено, что диабет может приводить к ингибированию как “агрессивных” [4], так и защитных факторов слизистой оболочки желудка [5, 6]. Имеются единичные данные о снижении чувствительности слизистой оболочки желудка к ulcerогенным воздействиям при диабете [7], что может быть связано с уменьшением объема желудочной секреции и торможением моторики желудка [4]. Тем не менее, в большинстве работ обнаружено повышение чувствительности желудка к повреждающим агентам при длительно протекающем диабете. При стрептозотоцин-индуцированном диабете длительностью 3–9 недель у экспериментальных животных показано повышение чувствительности слизистой оболочки желудка к различным ulcerогенным факторам: голоданию [5, 8], голоданию с охлаждени-

ем [6], иммобилизации с охлаждением [9], ишемии–реперфузии желудка [10], этанолу [9]. Кроме того, у животных с диабетом обнаружено замедление процессов заживления поврежденной слизистой оболочки желудка [6, 11, 12]. Представленные данные свидетельствуют о большей значимости угнетающего эффекта диабета на защитные факторы слизистой оболочки желудка, чем на агрессивные факторы.

Нестероидные противовоспалительные препараты (НСПВП), в силу их побочного повреждающего действия на слизистую оболочку желудка, являются широко распространенными ulcerогенными факторами, однако работы о влиянии диабета на чувствительность желудка к ulcerогенному действию этих препаратов единичны [13, 14]. При этом исследования проводились, как и в большинстве других работ по диабету, после продолжительного протекания заболевания. Одной из задач наших исследований, результаты которых будут представлены в обзоре, явилось изучение влияния диабета на чувствительность слизистой оболочки желудка к ulcerогенному действию индометацина в разные сроки развития диабета: от 3 до 30 дней.

Характерным признаком диабета является повышение активности гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы (ГГАКС), проявляющееся в увеличении базального и стрессорного уровня кортикостерона в крови крыс [15–18]. Показано также увеличение стрессорного уровня АКТГ в крови и уровня проопиомеланокортина в гипофизе диабетических крыс [16, 17]. Вопрос об изменении продукции кортикотропин-рилизинг фактора (КРФ) при диабете остается не ясным, имеющиеся данные противоречивы [17, 19, 20]. Недостаточно исследовано изменение активности ГГАКС при развитии диабета во времени, мало изучен вопрос о роли гормонов ГГАКС в проявлении признаков диабета и сопутствующих патологических изменениях в организме животного. В своих исследованиях, в поиске ответа на некоторые из этих вопросов, мы изучили влияние диабета в разные сроки его развития на базальный и стрессорный уровень кортикостерона в крови крыс, с одной стороны, и вклад повышенного уровня кортикостерона в крови на проявление признаков диабета, с другой стороны [18, 21]. Нам не удалось найти данных литературы о влиянии КРФ, экзогенного или эндогенного, на какие-либо показатели функционирования организма при диабете. Поскольку ранее в нашей лаборатории в условиях “индометациновой” ulcerогенной модели на нормальных крысах было выявлено гастропротективное действие КРФ [22], мы выясняли, проявляется ли это защитное действие КРФ на желудок у крыс с диабетом. Важной особенностью наших исследований является комплексное изучение на одних и тех же животных и признаков развития диабета во времени, и чувствительности желудка к ulcerогенным воздействиям, и активности ГГАКС.

Таким образом, целью настоящего обзора является анализ данных литературы и полученных нами экспериментальных результатов о чувствительности слизистой оболочки желудка к ulcerогенным стимулам и активности ГГАКС при развитии стрептозотоцин-индуцированного диабета.

## ПРИЗНАКИ РАЗВИТИЯ ДИАБЕТА

Диабет – эндокринное заболевание, причиной которого является абсолютный или относительный недостаток гормона инсулина, в результате чего развивается стойкое увеличение содержания глюкозы в крови (гипергликемия). Заболевание характеризуется хроническим течением и приводит к нарушению в организме всех видов обмена: углеводного, жирового, белкового, минерального и водно-солевого. Диабет классифицируют как диабет 1 и 2 типа. Диабет 1 типа связан с абсолютным дефицитом инсулина, который возникает из-за гибели бета-клеток поджелудочной железы, продуцирующих инсулин. Дефицит инсулина приводит к повышению уровня глюкозы в организме. Заболевание, как правило, начинается в детском и юношеском возрасте и часто связано с наследственными факторами. Диабет 2 типа в начале развития не связан с инсулиновой недостаточностью. Причиной диабета

2 типа является снижение чувствительности клеток организма (главным образом, мышечной и жировой ткани) к инсулину – инсулинорезистентность. Клетки не воспринимают инсулин, главным образом, из-за того, что гормон не связывается со своими рецепторами в достаточном количестве. Диабет 2 типа развивается в результате нарушений обмена веществ, например, при ожирении [23].

Несмотря на разную этиологию диабета 1 и 2 типа общим их признаком является гипергликемия, которая приводит к многочисленным осложнениям. Самые серьезные из них – нейропатия, ретинопатия, нефропатия, ангиопатия (поражения крупных и мелких сосудов), что приводит к сердечно-сосудистым заболеваниям, потере зрения, синдрому диабетической стопы. Следует заметить, что в большей степени повреждаются клетки тех тканей, которые не используют инсулин для транспортировки глюкозы, прежде всего это клетки сетчатки, почек, нервной системы, стенок кровеносных сосудов. Транспорт глюкозы в эти клетки осуществляют специальными транспортерами (GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT5) независимыми от инсулина. При повышенном уровне глюкозы крови они подвергаются воздействию высокой концентрации глюкозы и могут страдать от глюкозотоксичности [24]. Инсулин-независимым транспортером является GLUT4, который осуществляет транспорт глюкозы, главным образом, в клетки мышечной и жировой ткани [25].

Большое значение для исследования патологии гормональной функции поджелудочной железы имеют экспериментальные модели диабета. В настоящее время широкое распространение получили химические модели диабета. Этому способствовали сравнительная простота индуцирования диабета, высокая избирательность действия на островковый аппарат при сохранении нормальной экскреторной функции поджелудочной железы, возможность получения заболевания различной тяжести. Для моделирования диабета 1 типа у крыс чаще всего используют стрептозотозин, который избирательно поражает бета-клетки поджелудочной железы у крыс. Как и многие другие исследователи, именно эту модель мы использовали в своих экспериментальных исследованиях.

Увеличение уровня глюкозы в крови (до 25–35 ммоль/л), уменьшение массы тела, повышение потребления воды после введения стрептозотоцина показано во всех работах при моделировании стрептозотоцин-индуцированного диабета у крыс [6, 8, 15, 20]. Нами была изучена динамика проявления этих признаков диабета через 3, 7, 14 и 30 дней после введения стрептозотоцина [18]. Через 3 дня после введения стрептозотоцина у крыс уже проявились явные признаки диабета: гипергликемия, увеличение потребления воды, снижение массы тела по сравнению с контрольной группой животных, которым вводили растворитель стрептозотоцина. Уровень глюкозы в крови через 3 дня после введения стрептозотоцина уже достигал максимального значения и достоверно не отличался от тех высоких уровней глюкозы, которые наблюдались через 7, 14 и 30 дней развития диабета. Через 3 дня после введения стрептозотоцина наблюдалось достоверное увеличение потребления воды по сравнению с контрольной группой животных, которое со временем усугублялось, достигая максимальных значений к 14 дню. Хотя исходные величины масс тела контрольных и диабетических крыс не отличались, однако во все исследованные сроки после введения стрептозотоцина (3, 7, 14, 21 и 30 дней) масса тела крыс с диабетом была достоверно меньше по сравнению с таковой контрольных животных. С увеличением срока развития диабета это различие становилось более выраженным.

После голодания крыс в течение 24 ч наблюдалось резкое снижение уровня глюкозы в крови крыс с диабетом, причем степень снижения зависела от срока развития диабета. Если через 3 дня после введения стрептозотоцина уровень глюкозы в крови после голода снижался приблизительно в 2 раза, то через 7, 14 и 30 дней он был снижен приблизительно в 5 раз, в результате уровень глюкозы в крови у “диабетических” крыс в последних трех временных точках достигал уровня контрольных животных.

У крыс с диабетом наблюдалось снижение абсолютной и относительной массы тимуса по сравнению с таковой контрольной группы во все исследованные сроки

развития диабета [18]. Абсолютная масса селезенки была снижена через 7, 14 и 30 дней после введения стрептозотоцина, относительная масса достоверно снижалась только после 7 и 14 дней, что можно объяснить существенным замедлением прироста массы тела к 30-му дню развития диабета по сравнению с 7-м и 14-м днем. Снижение массы тимуса и селезенки, наряду со сниженной массой тела у крыс с диабетом по сравнению с контролем, свидетельствует об усилении катаболических процессов при диабете, вызванном введением стрептозотоцина.

### ВЛИЯНИЕ ДИАБЕТА НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА К УЛЬЦЕРОГЕННЫМ ФАКТОРАМ

Сам по себе диабет, вызванный введением стрептозотоцина, не приводил к развитию изъязвлений в слизистой оболочке желудка, однако влиял на чувствительность слизистой оболочки желудка к ulcerогенным воздействиям [6, 9, 13, 18]. По нашим данным, начиная с 3-го дня после введения стрептозотоцина, наблюдалось усугубление эрозивных повреждений желудка, вызванных введением индометацина. При этом степень повреждений зависела от сроков развития диабета. Так, через 7 и 14 дней после введения стрептозотоцина площадь эрозий, вызванная введением индометацина, была достоверно выше таковой, наблюдаемой через 3 дня, к 30-му дню развития диабета наблюдалось дальнейшее увеличение площади эрозий [18]. В исследовании других авторов [13] также наблюдали повышение чувствительности слизистой оболочки желудка крыс с диабетом к ulcerогенному действию индометацина через 3 недели после введения стрептозотоцина, более короткие сроки не исследовались.

Об увеличении чувствительности желудка к повреждению свидетельствует и тот факт, что неulcerогенные в норме стимулы становятся ulcerогенными у “диабетических” крыс. Так, если у контрольных животных кратковременный стресс (15 мин иммобилизации при 10°C) практически не вызывал образование эрозий в желудке, то у крыс с 2-недельным диабетом он приводил к появлению заметных эрозий, площадь которых составляла около 2.5 мм<sup>2</sup>.

Следует обратить внимание на то, что эрозии в желудке образовывались после 24-часового голодания животных на фоне резкого снижения уровня глюкозы в крови крыс с диабетом. Вопрос о том, не является ли резкое падение уровня глюкозы в крови после голодания крыс с диабетом причиной увеличения повреждаемости слизистой оболочки желудка к ulcerогенным факторам, поднимался в работах некоторых авторов, которые исследовали длительно протекающий диабет [8, 9, 26]. Полученные ими данные скорее подтверждают это предположение. Повышение чувствительности желудка диабетических крыс к голоданию может быть связано с усилением моторики желудка [7], вызванным резким падением уровня глюкозы. Мы провели собственные исследования, в которых изучали раздельное влияние индометацина и 24-часового голодания на слизистую оболочку желудка. Было показано, что у крыс с длительно протекающим диабетом (30 дней) голодание без введения индометацина, вызывающее резкое снижение уровня глюкозы в крови, привело к заметному повреждению желудка [18]. Кроме того, по нашим данным, степень падения уровня глюкозы в крови после голодания может влиять на степень повреждения слизистой оболочки желудка. Так, через 3 дня после введения стрептозотоцина менее резкое падение уровня глюкозы в крови после голода сопровождалось и меньшим повышением чувствительности желудка к индометацину по сравнению с подобными изменениями в более поздние сроки развития диабета [18]. Таким образом, предположение о том, что возможной причиной повышения чувствительности слизистой оболочки желудка у крыс с диабетом к повреждающему действию индометацина может быть резкое падение уровня глюкозы в крови после голода, подтверждают в какой-то степени и результаты нашей работы. Однако некоторые факты, полученные в наших исследованиях, не согласуются с этим предположением. Сравнение результатов, полу-

ченных через 7 и 30 дней после введения стрептозотоцина, показало, что при одинаковой степени падения уровня глюкозы в крови после голодания у крыс с 7-дневным сроком развития диабета повреждаемость желудка в ответ на голод практически отсутствует, кроме того, у этих крыс площадь эрозий, вызванных совместным действием индометацина и голодания, значимо меньше, чем у крыс с 30-дневным сроком развития диабета [18]. Вероятно, резкое падение уровня глюкозы в крови после голодания вносит свой вклад в увеличение чувствительности желудка к ulcerогенным воздействиям у диабетических крыс, но не является основной причиной этого увеличения.

При рассмотрении вопроса о возможных причинах повышения чувствительности слизистой оболочки желудка к повреждающим факторам при диабете следует обсудить влияние самой гипергликемии. Полученные нами ранее результаты, связанные с продолжительным действием глюкокортикоидных гормонов на слизистую оболочку желудка, свидетельствуют о том, что продолжительная гипергликемия способствует увеличению чувствительности слизистой оболочки желудка к ulcerогенным воздействиям [27]. Увеличение повреждаемости желудка при гипергликемии может быть связано с появлением ряда осложнений, причем эти осложнения могут проявляться как на уровне целого организма (например, нарушения в сердечно-сосудистой системе), так и локально в желудке. В литературе имеются данные о некоторых локальных изменениях в желудке при диабете. Так, выявлено, что при диабете происходит ингибирование защитных реакций слизистой оболочки желудка: снижение скорости кровотока в желудке [6, 8], уменьшение синтеза гликопротеинов и активности антиоксидантной системы [5, 13], торможение ангиогенеза [6].

#### АКТИВНОСТЬ ГГКС И ЕЕ РЕГУЛЯЦИЯ В УСЛОВИЯХ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРОВАННОГО ДИАБЕТА

Увеличение базальной секреции кортикостерона при стрептозотоцин-индуцированном диабете показано у крыс и других грызунов в работах всех авторов, которые изучали этот вопрос [11, 16, 19, 28, 29]. На фоне постоянной базальной гиперсекреции кортикостерона “диабетические” крысы могут демонстрировать более выраженный ответ на острый стресс по уровню кортикостерона в крови по сравнению с контрольными животными [15, 30]. Полученные нами данные свидетельствуют о повышении базального уровня кортикостерона в крови уже через 3 дня после введения стрептозотоцина, повышенный уровень кортикостерона сохранялся и в другие исследованные сроки развития диабета. Кроме того, через 7, 14 и 30 дней после введения стрептозотоцина наблюдалось увеличение стрессорного уровня кортикостерона в крови у крыс по сравнению с уровнем гормона у контрольных животных. В эти же сроки у крыс с диабетом было обнаружено увеличение массы надпочечников по сравнению с таковой у контрольных крыс [18].

В отношении активации других звеньев ГГКС при диабете имеющиеся данные не так однозначны, как в отношении кортикостерона. В некоторых работах наблюдали увеличение базального уровня АКТГ в крови при диабете, вызванном введением стрептозотоцина [29, 31, 32]. В работе других авторов увеличение базального уровня АКТГ не обнаружено, но показан более высокий стрессорный уровень АКТГ у крыс с диабетом по сравнению с контролем [33]. Кроме того, в гипофизе диабетических крыс показана повышенная экспрессия мРНК проопиомеланокортина, предшественника АКТГ и эндорфинов [16, 17].

Еще более противоречивы данные литературы в отношении изменения экспрессии КРФ в паравентрикулярном ядре (ПВЯ) гипоталамуса крыс при диабете. Одни авторы смогли обнаружить увеличение экспрессии КРФ у диабетических крыс [19]. По данным других исследователей [20], уровень КРФ и его синтез в ПВЯ, о котором судили по уровню мРНК, не изменялся у крыс с диабетом по сравнению с контро-

лем. Наконец, в работах группы авторов обнаружено снижение экспрессии КРФ в ПВЯ при диабете [16, 17].

Раздельное исследование экспрессии КРФ и его рецепторов в мелкоклеточной и крупноклеточной части ПВЯ у крыс после введения стрептозотоцина показало, что диабет приводит к снижению индукции КРФ и КРФ-рецепторов 1 типа (КРФ1-рецепторов) в мелкоклеточной части ПВЯ, которая в обычных условиях является основным местом образования КРФ [20]. В то же время обнаружено увеличение этих параметров в крупноклеточной части ПВЯ, в которой в норме образуется вазопрессин и окситоцин. Авторы этой работы предположили, что у крыс с диабетом ингибирование продукции КРФ в мелкоклеточной части ПВЯ по механизму обратной связи при высоком уровне кортикостерона способствует усилению его образования в других отделах гипоталамуса. Кроме того, было предположено, что механизм активации образования КРФ в крупноклеточной части ПВЯ может быть связан с гипергликемией, которая вызывает гиперосмотические изменения крови. По мнению авторов статьи, КРФ, образующийся в крупноклеточной части ПВЯ, может действовать прямо на аденогипофиз путем локальной секреции из крупноклеточных нейронов через срединное возвышение.

В любом случае, наблюдаемое увеличение базального и стрессорного уровня АКТГ у животных со стрептозотоцин-индуцированным диабетом [19, 15], повышение уровня проопиомеланокортина в гипофизе [17], увеличение базального и стрессорного уровня кортикостерона наряду с гипертрофией надпочечников и инволюцией тимуса у крыс с диабетом [18] указывают на повышенную активность гипофизарного и надпочечникового звеньев ГГАС при этом патологическом состоянии.

В нормальных условиях гипогликемия вызывает активацию ГГАС, которая в конечном итоге приводит к повышению уровня глюкокортикоидных гормонов в крови и нормализации содержания глюкозы. На основании наших прежних данных был сделан вывод о том, что поддерживающее влияние глюкокортикоидных гормонов на уровень глюкозы в крови является одним из механизмов их гастропротективного действия [34, 35], которое было выявлено при стрессе [36, 34] и при действии НСПВП [37]. Повышение уровня глюкокортикоидных гормонов в крови при диабете в условиях гипергликемии вызвано, вероятно, нарушением регуляции активности ГГАС. Если в норме активирующим фактором для ГГАС является гипогликемия, то при диабете, вызванном стрептозотоцином, такими факторами становятся, возможно, гипергликемия или вызванные ею патологические изменения. В одной из работ [31] было показано, что введение инсулина крысам со стрептозотоцин-индуцированным диабетом, приводящее к нормализации уровня глюкозы, нормализовало и уровни кортикостерона и АКТГ в крови. Кроме того, введение инсулина увеличивало экспрессию глюкокортикоидных рецепторов в гипоталамусе и гипофизе, что, по мнению авторов, восстанавливало отрицательную обратную связь по уровню кортикостерона [31]. На основании этих данных можно предположить, что гипoinsулинемия и, как следствие, гипергликемия при диабете становятся для ГГАС активирующими факторами. Однако в более поздней работе авторов показано, что нормализация уровня глюкозы в крови без восстановления уровня инсулина недостаточна для нормализации уровней кортикостерона и АКТГ в крови [32]. Показана важность поддержания нормального уровня инсулина не только в крови, но и в структурах мозга для коррекции патологических изменений при диабете [38, 39]. Увеличение содержания инсулина и С-пептида проинсулина путем интраназального введения рассматривается как один из способов активации инсулин-зависимой сигнальной системы мозга, которая может влиять и на периферический метаболизм, в том числе улучшать утилизацию глюкозы при обеих формах диабета [39, 40].

Вопрос о механизме, благодаря которому поддерживается высокий уровень глюкокортикоидных гормонов при диабете, пока остается без четкого ответа. Можно предположить несколько возможностей: 1) увеличение чувствительности гипофиза и надпочечников к стимулирующим сигналам; 2) устойчивость некоторых компо-

нентов системы к сигналу отрицательной обратной связи; 3) существование других механизмов, которые могут “удерживать” повышенную активность надпочечников.

В свете данных, приведенных ранее, о том, что повышенный ответ наблюдается только на уровне гипофиза и надпочечников, без изменения или даже снижения экспрессии КРФ в ПВЯ, логично предположить увеличение чувствительности гипофиза и надпочечников к стимулирующим сигналам. Однако через 5 дней после введения стрептозотоцина не обнаружено изменений чувствительности надпочечников крыс к АКТГ как в опытах *in vivo*, так и в опытах *in vitro* [30]. В наших опытах *in vitro* после 7 дней развития диабета также не обнаружено изменение чувствительности надпочечников к АКТГ [41]. В более поздние сроки после введения стрептозотоцина (через 11 дней) наблюдали усиление синтеза кортикостерона при добавке АКТГ к культуре ткани надпочечников крыс [42]. По мнению авторов, именно повышенная чувствительность коры надпочечников к АКТГ является первой причиной гиперкортицизма у диабетических крыс. Других подтверждений подобного эффекта диабета на чувствительность надпочечников к АКТГ нами в литературе не обнаружено. В опытах *in vivo* [30] отсутствовали изменения чувствительности гипофиза (по количеству выделяемого АКТГ) к КРФ и вазопрессину у крыс с диабетом. Однако в работе японских авторов [43] показано изменение чувствительности культуры клеток гипофиза к добавленному в среду КРФ у крыс с диабетом. При этом направленность изменений зависела от срока диабета: через неделю наблюдалось увеличение синтеза АКТГ в ответ на добавку КРФ, при длительном диабете (8 нед.) – снижение освобождения АКТГ, связанное, по мнению авторов, с изменением КРФ-рецепторов в гипофизе. На основании имеющихся данных вряд ли можно заключить, что гиперкортицизм при диабете в значительной степени связан с повышением чувствительности надпочечников или гипофиза к своим активирующим факторам, т.к. повышенная активация этих структур по сравнению с контролем показана только в опытах *in vitro*.

Для выяснения вопроса, как работает механизм отрицательной обратной связи по отношению к эндогенному кортикостерону при диабете, крыс исследовали после адrenaлэктомии или ложной операции, у которых изучали секрецию АКТГ и экспрессию КРФ- и КРФ1-рецепторов в ПВЯ гипоталамуса. Адrenaлэктомия, устраняя влияние кортикостерона, приводила к повышению базальной секреции АКТГ как у контрольных, так и у крыс с диабетом [15]. Заместительная терапия кортикостероном приблизительно одинаково снижала базальную секрецию АКТГ как у адrenaлэктомизированных крыс без диабета, так и с диабетом. Что касается данных об изменении экспрессии КРФ [16], то, как и следовало ожидать, адrenaлэктомия увеличила экспрессию КРФ у контрольных крыс, но особенно сильно это увеличение (по отношению к исходному уровню) проявилось у крыс с диабетом, у которых, по данным авторов, исходный уровень экспрессии КРФ был снижен по сравнению с таковым у контрольных животных. Заместительное введение кортикостерона снижало уровень КРФ мРНК у обеих групп крыс до исходного уровня. В работе с отдельным определением КРФ в мелкоклеточном и крупноклеточном отделе ПВЯ [20] показано, что адrenaлэктомия у крыс с диабетом приводила к значительному увеличению экспрессии КРФ- и КРФ1-рецепторов в мелкоклеточной части и частично затормаживала эту экспрессию в крупноклеточной части ПВЯ. Представленные данные, полученные на адrenaлэктомизированных животных, свидетельствуют о том, что при диабете все же сохраняется отрицательная обратная связь по уровню эндогенного кортикостерона у крыс как в отношении базального образования АКТГ в гипофизе, так и экспрессии КРФ в ПВЯ гипоталамуса. Однако имеются и противоположные данные о том, что уровень КРФ в ПВЯ у крыс с диабетом повышен, а механизм обратной связи ослаблен [19, 31], что, по мнению авторов, может быть одним из механизмов поддержания повышенного уровня глюкокортикоидных гормонов в крови при диабете. Других работ, подтверждающих подобную точку зрения, нами не обнаружено.

Таким образом, чувствительность надпочечников к АКТГ и гипофиза к КРФ и вазопрессину у крыс с диабетом мало изменена, отрицательная обратная связь в какой-то степени сохраняется. Остается предположить существование при диабете других механизмов, которые могут “удерживать” повышенный ответ надпочечников. Теоретическая возможность стимулирующего влияния вазопрессина отвергается работой группы венгерских и российских авторов. При исследовании Брэтлборо крыс с врожденным отсутствием вазопрессина показано, что повышенный уровень кортикостерона при диабете у этих крыс сохраняется [17]. Сохраняется повышенный уровень гормона, по данным этих же авторов, и при перерезке ПВЯ. Остается предполагать какие-то изменения в других структурах гипоталамуса, а может быть и в других отделах мозга. Это предположение не беспочвенно, поскольку есть данные об увеличении экспрессии КРФ- и КРФ1-рецепторов в супраоптическом ядре гипоталамуса при диабете, вызванном стрептозотоцином [20]. Другой группой авторов обнаружено существенное повышение минералокортикоидных рецепторов в гиппокампе, которое, по их мнению, может иметь отношение к нарушенной регуляции уровня глюкокортикоидных гормонов при диабете [19]. Вопрос о том, на каком уровне происходит сбой регуляции ГГКС при диабете важен, т.к. может помочь в поисках причин возникновения этой патологии и способов лечения.

Возможность влияния повышенного базального уровня кортикостерона на развитие диабета и вызванных им осложнений изучена в очень малой степени. При проведении опытов с адреналэктомией было отмечено снижение уровня глюкозы в крови крыс с диабетом [44]. Нами было исследовано влияние адреналэктомии на уровень глюкозы в крови, на катаболический эффект, который наблюдается при диабете, и на чувствительность слизистой оболочки желудка к ulcerогенным факторам у диабетических крыс. Адреналэктомию проводили непосредственно перед введением стрептозотоцина или его растворителя за 2 недели до применения ulcerогенного фактора. Контролем служили ложноперирированные животные с диабетом и без диабета. У ложноперирированных крыс введение стрептозотоцина приводило к таким же изменениям, которые были выявлены у контрольных крыс: к повышению уровня глюкозы в крови, снижению массы тимуса и селезенки, усугублению образования эрозий. Адреналэктомия сама по себе усугубляла образование эрозий по сравнению с таковым у ложноперирированных крыс без введения стрептозотоцина.

Хотя стрептозототин и адреналэктомия сами по себе вызывали усугубление формирования эрозий в желудке, однако их совместное действие не приводило к дальнейшему потенцированию этого усугубления. Значительное отличие между адреналэктомиированными и ложноперирированными крысами с диабетом наблюдалось по уровню глюкозы, который был снижен у крыс с адреналэктомией. С изменением уровня глюкозы, возможно, связано и второе отличие: у крыс с адреналэктомией не выявлялось снижение массы тимуса и селезенки [21]. Тот факт, что кортикостерон способствовал повышению уровня глюкозы в крови диабетических крыс, возможно, связан с активацией глюконеогенеза, которая может сопровождаться катаболическим эффектом. Таким образом, избыток кортикостерона при диабете вносит существенный вклад в повышение уровня глюкозы в крови и в проявление катаболического эффекта, что может усиливать повреждающее действие диабета, в том числе, и на желудок. Предположение о том, что глюкокортикоиды могут усиливать патологические последствия диабета, поддерживают данные о повышении резистентности к инсулину тканей организма под влиянием избытка глюкокортикоидных гормонов [44, 45]. Хроническое увеличение базального и стрессорного уровня глюкокортикоидов в крови при стрептозототин-индуцированным диабетом может способствовать снижению чувствительности к инсулину различных тканей, добавляя к диабету 1 типа признаки диабета 2 типа, и таким образом, усугубляя проulcerогенное влияние диабета на желудок. Это подтверждают и наши данные, которые показали снижение чувствительности к инсулину у крыс

через 24 ч после введения глюкокортикоидного гормона дексаметазона, приводящее к увеличению площади эрозий желудка, вызванных индометацином [46]. Тот факт, что в нашей работе введение стрептозотоцина адrenaлэктомированным крысам не повлияло на массу тимуса и селезенки, но повысило уровень глюкозы по сравнению с адrenaлэктомированными крысами без стрептозотоцина, позволяет сделать вывод о том, что избыточный кортикостерон при диабете ответственен за кatabолический эффект, и лишь частично – за повышенный уровень глюкозы в крови.

### ВЛИЯНИЕ КРФ НА СЛИЗИСТУЮ ОБОЛОЧКУ ЖЕЛУДКА У КРЫС СО СТРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРОВАННОМ ДИАБЕТОМ

Поскольку ранее в нашей лаборатории в условиях индометациновой ulцерогенной модели на нормальных крысах было выявлено гастропротективное действие КРФ [47], мы выясняли вопрос о том, проявляется ли подобное действие КРФ у крыс с диабетом. Роль экзогенного и эндогенного КРФ в гастропротекции у крыс с диабетом изучали через две недели после введения стрептозотоцина [21]. Было подтверждено, что в условиях диабета усугубляется ulцерогенное действие индометацина. Введение КРФ оказало значимый гастропротективный эффект как у контрольных крыс, так и у крыс с диабетом. При этом следует отметить, что у диабетических крыс средняя площадь эрозий снижалась с очень высоких значений до уровня, достоверно не отличающегося от такового контрольных крыс без введения КРФ. Введение КРФ вызывало увеличение уровня кортикостерона в крови контрольных крыс. У крыс с диабетом, уже имеющих повышенный уровень кортикостерона в крови, не наблюдалось дальнейшего повышения уровня кортикостерона под влиянием КРФ, по крайней мере, во временной точке через 4 ч после введения индометацина.

Для выяснения роли эндогенного КРФ использовали неселективный антагонист КРФ рецепторов астрессин, введение которого приводило к увеличению средней площади эрозий, вызванных индометацином, как у контрольных, так и у диабетических крыс по сравнению с таковой у крыс без введения астрессина. После введения астрессина уровень кортикостерона у контрольных крыс, как и следовало ожидать, снижался, однако не изменялся у диабетических крыс. Введение селективного антагониста КРФ1-рецепторов, NBI 27914, или селективного антагониста КРФ-рецепторов 2 типа (КРФ2-рецепторов) астрессина2-Б, также приводило к достоверному увеличению средней площади эрозий как у контрольных, так и у диабетических крыс по сравнению с таковой у крыс с введением растворителей антагонистов. Повышенный уровень кортикостерона у крыс с диабетом оказался очень устойчивым к действию астрессина и специфического антагониста КРФ1-рецепторов NBI 27914. Возможно, повышение уровня кортикостерона при диабете не связано с влиянием КРФ и его рецепторов. Это предположение подтверждают некоторые данные литературы [16, 17]. Но, кроме того, важно принимать во внимание и то обстоятельство, что “диабетическим” крысам селективный и неселективный антагонисты вводили уже на фоне высокого уровня кортикостерона. В то же время контрольным крысам антагонисты вводили еще на фоне базального уровня кортикостерона и в этом случае это приводило к предотвращению высокого уровня кортикостерона в ответ на ulцерогенный стимул.

Результаты работы подтвердили ранее полученные данные о гастропротективном эффекте КРФ у нормальных крыс и о возможной роли повышенного уровня кортикостерона в проявлении этого эффекта [22, 47]. Обнаружено, что у крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом сохраняется гастропротективное действие КРФ с вовлечением КРФ1- и КРФ2-рецепторов в его реализацию, однако в этом случае участие кортикостерона в действии КРФ не выявлено. Поскольку КРФ и антагонисты КРФ-рецепторов вводились крысам с диабетом системно (в/б), можно полагать, что наблюдаемые эффекты этих препаратов на слизистую оболочку желудка связаны с их периферическим действием. О возможности периферического влияния КРФ свиде-

тельствует широкое распространение КРФ-рецепторов в различных органах и тканях человека и животных. Однако при системном введении КРФ нельзя исключить его действие через гипофиз. Наблюдаемое нами повышение уровня кортикостерона в крови контрольных крыс после системного введения КРФ может быть связано со стимуляцией КРФ1-рецепторов в гипофизе, введение астрессина или специфического антагониста КРФ1-рецепторов (NBI), может тормозить эту стимуляцию. В то же время показана возможность прямого действия КРФ на надпочечники [28, 48].

Можно указать на некоторые предполагаемые механизмы периферического эффекта КРФ при диабете на организм, в том числе и на желудок. Так, например, показано, что КРФ при периферическом действии через КРФ2-рецепторы замедляет эвакуацию пищи из желудка за счет снижения его моторной активности [49]. Усиленная моторика желудка является проульцерогенным фактором. С другой стороны, КРФ может оказывать поддерживающий эффект на поджелудочную железу через КРФ1-рецепторы [50, 51]. Было показано, что активация КРФ1-рецепторов увеличивает пролиферацию клеток поджелудочной железы и секрецию инсулина при повышенном уровне глюкозы [50], а также снижает апоптоз клеток поджелудочной железы [52]. Возможно, введение КРФ активировало КРФ1-рецепторы в поджелудочной железе, оказывая благоприятный эффект на синтез инсулина, а блокада КРФ1-рецепторов усиливала патологические последствия диабета, в том числе и проульцерогенный эффект диабета на желудок.

Значительные изменения средней площади эрозий, вызванных индометацином, под влиянием КРФ и антагонистов КРФ-рецепторов указывают на важную роль КРФ в гастропротекции у крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом. Полученные результаты о гастропротективном влиянии экзогенного и эндогенного КРФ в используемой модели диабета сравнить с данными литературы не представляется возможным, поскольку мы таких данных не обнаружили.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, представленные собственные экспериментальные результаты и данные литературы показали, что увеличение уровня кортикостерона в крови, усиление катаболического эффекта и чувствительности слизистой оболочки желудка к ульцерогенному действию индометацина у крыс проявляется в ранние сроки развития диабета и усугубляется при дальнейшем развитии патологического состояния.

Повышение базального и стрессорного уровня кортикостерона в крови в разные сроки развития диабета, наряду с увеличением массы надпочечников и снижением массы тимуса свидетельствуют о хронической активации ГТАКС, что указывает на состояние хронического стресса при этой патологии.

Как экзогенный, так и эндогенный КРФ оказывает гастропротективный эффект у крыс с диабетом, индуцированным введением стрептозотоцина, КРФ1- и КРФ2-рецепторы участвуют в опосредовании этого эффекта.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-15-00430

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Андреева И.Л., Назаров Л.Н.* Горький сахар диабета. Вестник Рос. акад наук. 84(2): 170–175. 2014. [Andreeva I.L., Nazarov L.N. Bitter sugar diabetes. Vest. Russ. Acad. Nauk. 84(2): 170–175. 2014. (In Russ)].
2. *Варданян Г.С., Алавердян А.Р.* Протеинкиназа С: от особенностей молекулярной структуры до возможной роли при развитии диабетической нейропатии. Нейрохимия. 26(1): 19–28. 2009. [Vardanian G.S., Alaverdian A.R. Protein kinase C: From molecular structure to a possible role in the development of diabetic neuropathy. Neurochem. 26(1): 19–28. 2009. (In Russ)].
3. *Sibal L., Agarwal S.C., Home Ph.D.* Carotid intima-media thickness as a surrogate marker of cardiovascular diseases in diabetes. Diabetes Metab. Synd. Obes. 4: 23–34. 2011.

4. Ciobanu L., Dumitrascu D. L. Gastrointestinal motility disorders in endocrine diseases. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 121(4): 129–136. 2011.
5. Takeuchi K., Ueshima K., Ohuchi T., Okabe S. Induction of gastric lesions and hypoglycemic response by food deprivation in streptozotocin-diabetic rats. *Dig. Dis. Sci.* 39(3): 626–634. 1994.
6. Korolkiewicz R.P., Tashima K., Kubomi M., Kato S., Takeuchi K. Increased susceptibility of diabetic rat gastric mucosa to food deprivation during cold stress. *Digestion.* 60(6): 528–537. 1999.
7. Hung C.R. Low susceptibility of stress ulcer in diabetic rats: Role of cholinergic gastric motility. *Chin. J. Physiol.* 41(3): 151–159. 1998.
8. Takeuchi K., Hatazawa R., Korolkiewicz R., Tashima K. Alterations in gastric mucosal homeostasis under diabetic conditions. Chapter in book: “Pathophysiological and biochemical analysis of life-style related or intractable diseases – Target validation for drug therapy”. Nishino T., Takeuchi K. (Eds). *Res Signpost. Kerala:* 49–77. 2006.
9. Mohan Kumar M., Joshi M.C., Prabha T., Dorababu M., Goel R.K. Effect of plantain banana on gastric ulceration in NIDDM rats: Role of gastric mucosal glycoproteins, cell proliferation, antioxidants and free radicals. *Indian. J. Exp. Biol.* 44(4): 292–299. 2006.
10. Tashima K., Fujita A., Takeuchi K. Aggravation of ischemia/reperfusion-induced lesions in streptozotocin-diabetic rats. *Life Sci.* 67(13): 1639–1652. 2000.
11. Bitar M.S. Glucocorticoid dynamics and impaired wound healing in diabetes mellitus. *Am. J. Pathol.* 152(2): 547–554. 1998.
12. Konturek P.C., Brzozowski T., Burnat G., Szlachcic A., Koziel J., Kwiecien S., Konturek S.J., Harsch I.A. Gastric ulcer healing and stress-lesion preventive properties of pioglitazone are attenuated in diabetic rats. *J. Physiol. Pharmacol.* 61(4): 429–436. 2010.
13. Morsy M.A., Ashour O.M., Fouad A.A., Abdel-Gaber S.A. Gastroprotective effects of the insulin sensitizers rosiglitazone and metformin against indomethacin-induced gastric ulcers in Type 2 diabetic rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 37(2): 173–177. 2010.
14. Tashima K., Fujita A., Umeda M., Takeuchi K. Lack of gastric toxicity of nitric oxide-releasing aspirin, NCX-4016, in the stomach of diabetic rats. *Life Sci.* 67(14): 1707–1718. 2000.
15. Dallman M.F., Akana S.F., Bradbury M.J., Strack A.M., Hanson E.S., Scribner K.A. Regulation of the hypothalamo–pituitary–adrenal axis during stress: feedback, facilitation and feeding. *Seminars Neurosci.* 6: 205–213. 1994.
16. Schwartz M.W., Strack A.M., Dallman M.F. Evidence that elevated plasma corticosterone levels are the cause of reduced hypothalamic corticotrophin-releasing hormone gene expression in diabetes. *Regulat. Peptides.* 72(2–3): 105–112. 1997.
17. Zelena D., Filaretova L., Mergl Z., Barna I., Toth Z., Makara G. Hypothalamic paraventricular nucleus, but not vasopressin, participates in chronic hyperactivity of the HPA axis in diabetic rats. *Am. J. Physiol.* 290(2): E243–E250. 2006.
18. Подвигина Т.Т., Багаева Т.Р., Морозова О.Ю., Филаретова Л.П. Чувствительность слизистой оболочки желудка к ulcerогенному действию индометацина в разные сроки развития стрептозотокцин-индуцируемого диабета у крыс. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 97(9): 957–967. 2011. [Podvigina T.T., Bagaeva T.R., Morozova O.Yu., Filaretova L.P. Gastric mucosal susceptibility for ulcerogenic effect of indomethacin at different time points of streptozotocin-induced diabetes development. *Russ J. Physiol.* 97(9): 957–967. 2011. (In Russ)].
19. Chan O., Inouye K., Riddell M.C., Vranic M., Matthews S.G. Diabetes and the hypothalamo–pituitary–adrenal (HPA) axis. *Minerva Endocrinol.* 28(2): 87–102. 2003.
20. Huang Q., Timofeeva E.J., Richard D. Corticotropin-releasing factor and its receptors in the brain of rats with insulin and corticosterone deficits. *Mol. Endocrinol.* 37(2): 213–226. 2006.
21. Подвигина Т.Т., Багаева Т.Р., Филаретова Л.П. Гастропротективный эффект кортикотропин-релизинг фактора в модели стрептозотокцин-индуцированного диабета у крыс. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 102(11): 1352–1362. 2016. [Podvigina T.T., Bagaeva T.R., Filaretova L.P. Gastroprotective effect of corticotropin releasing factor in rat streptozotocin-induced diabetes model. *Russ. J. Physiol.* 102(11): 1352–1362. 2016. (In Russ)].
22. Filaretova L., Bagaeva T., Morozova O. Stress and the stomach: corticotropin-releasing factor may protect the gastric mucosa in stress through involvement of glucocorticoids. *Cell. Mol. Neurobiol.* 32(5): 829–836. 2012.
23. Saini V. Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *World J. Diabetes.* 1(3): 68–75. 2010.
24. Kim J.K., Zisman A., Fillmore J.J., Peroni O.D., Kotani K., Perret P., Zong H., Dong J., Kahn C.R., Kahn B.B., Shulman G.I. Glucose toxicity and the development of diabetes in mice with muscle-specific inactivation of GLUT4. *J. Clin. Invest.* 108(1): 153–160. 2001.
25. Klip A., McGraw T.E., James D.E. Thirty sweet years of GLUT4. *J. Biol. Chem.* 294(30): 11369–11381. 2019.
26. Suzuki H., Shimosegawa T., Ohara S., Toyota T. Epalrestat prevents the decrease in gastric mucosal blood flow and protects the gastric mucosa in streptozotocin diabetic rats. *J. Gastroenterol.* 34(2): 172–177. 1999.
27. Filaretova L., Bagaeva T., Morozova O., Podvigina T. From gastroprotective to proulcerogenic action of glucocorticoid on the gastric mucosa. *J. Physiol. Pharmacol.* 60 (Suppl. 7): 79–86. 2009.

28. *Gonzales-Heydrich J., Steingard R.J., Putnam F.W., De Bellis M.D., Beardslee W., Kohane I.S.* Corticotropin-releasing hormone increases apparent potency of adrenocorticotrophic hormone stimulation of cortisol secretion. *Med. Hypotheses*. 57(5): 544–548. 2001.
29. *Hammadi S., Chan O., Abdellali M., Medjerab M., Agoun H., Bellahreche Z., Khalkhal A., Dahmani Y.* Hyperactivation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in streptozotocin-diabetic herbals (*Gerbillusgerbillus*). *Int. J. Exp. Pathol.* 99(4): 172–179. 2018.
30. *Scribner K.A., Walker C.D., Cascio C.S., Dallman M.F.* Chronic streptozotocin diabetes in rats facilitates the acute stress response without altering pituitary or adrenal responsiveness to secretagogues. *Endocrinology*. 129(1): 99–108. 1991.
31. *Chan O., Chan S., Inouye K., Vranic M., Matthews S.G.* Molecular regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in streptozotocin-induced diabetes: effects of insulin treatment. *Endocrinology*. 142(11): 4872–4879. 2001.
32. *Chan O., Inouye K., Akirav E.M., Park E., Riddell M.C., Matthews S.G., Vranic M.* Hyperglycemia does not increase basal hypothalamo-pituitary-adrenal activity in diabetes but it does impair the HPA response to insulin-induced hypoglycemia. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289(1): R235–R246. 2005.
33. *Scribner K.A., Akana S.F., Walker C.D., Dallman M.F.* Streptozotocin-diabetic rats exhibit facilitated adrenocorticotropin responses to acute stress, but normal sensitivity to feedback by corticosteroids. *Endocrinology*. 133(6): 2667–2674. 1993.
34. *Филаретова Л.П.* Вклад глюкокортикоидных гормонов в гастропротекцию. *Усп. физиол. наук*. 45(1): 44–56. 2014. [*Filaretova L.P.* Contribution of glucocorticoid hormones to gastroprotection. *Usp. Fiziol. Nauk*. 45(1): 44–56. 2014. (In Russ)].
35. *Filaretova L., Tanaka A., Miyazawa T., Kato S., Takeuchi K.* Mechanisms by which endogenous glucocorticoids protects against indomethacin-induced gastric injury in rats. *Am. J. Physiol.* 83(5): G1082–G1089. 2002.
36. *Филаретова Л.П.* Стресс в физиологических исследованиях. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 96(9): 924–935. 2010. [*Filaretova L.P.* Stress in physiological studies. *Russ. J. Physiol.* 96(9): 924–935. 2010. (In Russ)].
37. *Filaretova L.* Gastroprotective role of glucocorticoids during NSAID-induced gastropathy. *Cur. Pharm. Des.* 19(1): 29–33. 2013.
38. *Шпаков А.О., Деркач К.В.* Гормональные системы мозга и сахарный диабет 2 типа. СПб. Изд-во Политехн. Университета. 2015. [*Shpakov A.O., Derkach K.V.* Gormonalnyye sistemy mozga i sakharnyy diabet 2 tipa. [Brain Hormonal systems and type 2 diabetes.] St. Petersburg. Polytech. University. 2015.
39. *Shpakov A.O., Derkach R.V., Berstein L.M.* Brain signaling systems in the Type 2 diabetes and metabolic syndrome: promising target to treat and prevent these diseases. *Future Sci. OA*. 1(3): FSO25. Published online. 2015. doi: . 2015 <https://doi.org/10.4155/fso.15.23>
40. *Деркач К.В., Бондарева И.М., Шпаков А.О.* Совместное интраназальное введение инсулина и проинсулин С-пептида крысам с диабетом 1 и 2 типа восстанавливает их метаболические параметры. *Успехи геронтологии*. 30(6): 851–858. 2017. [*Derkach K.V., Bondareva I.M., Shpakov A.O.* Co-administration of intranasally delivered insulin and proinsulin C-peptide to rats with the types 1 and 2 diabetes mellitus restores their metabolic parameters. *Adv. Gerontol.* 30(6): 851–858. 2017. (In Russ)].
41. *Podvigina T.T., Bagaeva T.R., Bobryshev P.Y., Filaretova L.P.* High sensitivity of gastric mucosa to ulcerogenic effect of indomethacin in rats with diabetes. *Bull. Exp. Biol. Med.* 152(1): 43–46. 2011.
42. *Revsin Y., van Wijk D., Saravia F.E., Oitzl M.S., De Nicola A.F., de Kloet E.R.* Adrenal hypersensitivity precedes chronic hypercorticism in streptozotocin-induced diabetes mice. *Endocrinology*. 149(7): 3531–3539. 2008.
43. *Gohshi A., Honda K., Tominaga K., Takano Y., Motoya T., Yamada K., Kamiya H.* Changes in adrenocorticotrophic hormone (ACTH) release from the cultured anterior pituitary cells of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol. Pharm. Bull.* 21(8): 795–799. 1998.
44. *Yi S.S., Hwang I.K., Shin J.H., Choic J.H., Leec C.H., Kim I.Y., Kim Y.N., Wonc M.H., Parke I.S., Seonga J.K., Yoon Y.S.* Regulatory mechanism of hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis and neuronal changes after adrenalectomy in type 2 diabetes. *J. Chem. Neuroanatomy*. 40(2): 130–139. 2010.
45. *Di Dalmazi G., Pagotto U., Pasquali R., Vicennati V.* Glucocorticoids and type 2 diabetes: from physiology to pathology. *J. Nutr. Metab.* Published online. 2012. doi: 2012 <https://doi.org/10.1155/2012/525093>
46. *Подвигина Т.Т., Багаева Т.Р., Морозова О.Ю., Филаретова Л.П.* Развитие резистентности к инсулину после продолжительного действия глюкокортикоидных гормонов как один из механизмов трансформации их гастропротективного эффекта в проульцерогенный. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 104(4): 493–505. 2018. [*Podvigina T.T., Morozova O.Yu., Bagaeva T.R., Filaretova L.P.* Sensitivity of the gastric mucosa to ulcerogenic factors and activity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system in development of streptozotocin-induced diabetes. *Russ. J. Physiol.* 104(4): 493–505. 2018. (In Russ)].
47. *Филаретова Л.П., Багаева Т.Р., Морозова О.Ю.* Гастропротективное действие кортикотропин-релизинг фактора (КРФ): вовлечение глюкокортикоидных гормонов и КРФ рецепторов 2-го типа. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 98(12): 1555–1566. 2012.

- [Filaretova L.P., Bagaeva T.R., Morozova O.Yu. Gastroprotective effect of corticotropin releasing factor (CRF): the involvement of glucocorticoid hormones and CRF receptors of type 2. *Russ. J. Physiol.* 98(12): 1555–1566. 2012. (In Russ)].
48. Fehm H.L., Holl R., Spath-Schwalbe E., Born J., Voigt K.H. Ability of corticotrophin-releasing hormone to stimulate cortisol secretion independent from pituitary adrenocorticotropin. *Life Sci.* 42(6): 679–686. 1998.
  49. Martinez V., Wang L., Rivier J.E., Vale W., Taché Y. Differential actions of peripheral corticotropin-releasing factor (CRF), urocortin II, and urocortin III on gastric emptying and colonic transit in mice: role of CRF receptor subtypes 1 and 2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301(2): 611–617. 2002.
  50. Huising M.O., van der Meulen T., Vaughan J.M., Matsumoto M., Donaldson C.J., Park H., Billestrup N., Vale W.W. CRFR1 is expressed on pancreatic beta cells, promotes beta cell proliferation, and potentiates insulin secretion in a glucose-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107(2): 912–917. 2010.
  51. Sakamoto R., Matsubara E., Nomura M., Wang L., Kawahara Y., Yanase T., Nawata H., Takayanagi R. Roles for corticotropin-releasing factor receptor type 1 in energy homeostasis in mice. *Metabolism.* 62(12): 1739–1748. 2013.
  52. Schmidt J., Ludwig B., Schally A.V., Steffen A., Ziegler C., Block N., Koutmani Y., Brendel M.D., Karalis K.P., Simeonovic C.J., Licinio J., Ehrhart-Bornstein M., Bornstein S.R. Modulation of pancreatic islets-stress axis by hypothalamic releasing hormones and 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108(33): 13722–13727. 2011.

### Sensitivity of the Gastric Mucosa to Ulcerogenic Factors and Activity of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical System in Development of Streptozotocin-Induced Diabetes

T. T. Podvigina<sup>a</sup>, \* and L. P. Filaretova<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Pavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg, Russia*

\**e-mail: tpodvigina@yandex.ru*

In this review we analyze the literature and our experimental data on the sensitivity of the gastric mucosa to ulcerogenic factors and the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system (HPA axis) in the development of streptozotocin-induced diabetes in rats. We conclude that: a) in the early stages of diabetes (3 days after the administration of streptozotocin) there is an increase in the sensitivity of the stomach to the ulcerogenic stimuli and an increase in the blood level of corticosterone, accompanied by a catabolic effect, the changes observed are aggravated with the further development of the pathological process; b) the development of diabetes leads to chronic activation of the HPA axis, as evidenced by an increase in basal and stress corticosterone levels, along with adrenal hypertrophy, at different time points after the administration of streptozotocin; c) the increased blood corticosterone level in rats with diabetes is responsible for the catabolic effect and, in part, for the increased blood glucose level; d) corticotropin-releasing factor (CRF), both exogenous and endogenous, is capable of exerting a gastroprotective effect not only in control animals, but also in rats with streptozotocin-induced diabetes; CRF receptors of type 1 and 2 are involved in mediating this effect.

**Keywords:** diabetes, streptozotocin, gastric erosion, corticosterone, corticotropin releasing factor

#### ЦИТИРОВАТЬ:

Подвигина Т.Т., Филаретова Л.П. Чувствительность слизистой оболочки желудка к ulcerогенным факторам и активность гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы при развитии стрептозототин-индуцированного диабета. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 106(2): 176–188.

DOI: 10.31857/S0869813920020090

#### TO CITE THIS ARTICLE:

Podvigina T.T., Filaretova L.P. Sensitivity of the Gastric Mucosa to Ulcerogenic Factors and Activity of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical System in Development of Streptozotocin-Induced Diabetes. *Russian Journal of Physiology.* 106(2): 176–188.

DOI: 10.31857/S0869813920020090

---

---

ОБЗОРНЫЕ  
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

---

---

МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ  
И ДЫХАТЕЛЬНОЙ СИСТЕМ

© 2020 г. В. И. Евлахов<sup>1, 2, \*</sup>, И. З. Поясов<sup>1, 3</sup>, В. И. Овсянников<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>1-й Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет  
им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский Государственный университет аэрокосмического приборостроения,  
Санкт-Петербург, Россия

\*E-mail: viespbu@mail.ru

Поступила в редакцию 31.10.2019 г.

После доработки 28.11.2019 г.

Принята к публикации 28.11.2019 г.

В обзоре рассмотрены механизмы взаимодействия сердечно-сосудистой и дыхательной систем при естественном дыхании и искусственной вентиляции легких. Отмечены взаимосвязи между сдвигами внутригрудного давления, венозного возврата крови к сердцу и сердечного выброса; изменениями внутригрудного давления и легочной гемодинамики; величиной внутригрудного давления и сократимостью правого и левого желудочков сердца; сменой фаз дыхания и сдвигами частоты сердечных сокращений; изменениями деятельности дыхательной мускулатуры и системы кровообращения. Фазные колебания венозного кровотока (увеличение на вдохе и снижение на выдохе) проявляются в результате сдвигов как внутригрудного, так и трансдиафрагмального давления. Однако присасывающее действие грудной клетки на среднюю величину венозного притока практически отсутствует. При смене фаз дыхания изменения венозного возврата и легочного кровотока противоположны сдвигам сердечного выброса и артериального давления, что обусловлено изменениями емкости и сопротивления сосудов легких. В условиях искусственной вентиляции легких с положительным давлением в конце выдоха сдвиги сердечного выброса зависят от соотношений величин венозного возврата крови к сердцу, сократимости миокарда правого желудочка, оттока крови по легочным венам и сократимости миокарда левого желудочка. При взаимодействии систем дыхания и кровообращения важное значение имеют рефлекторные нейрогенные влияния на сердце и сосуды с рецепторов легких и дыхательных мышц.

*Ключевые слова:* отрицательное внутригрудное давление, венозный возврат, сердечный выброс, давление и кровоток в легочной артерии, легочное сосудистое сопротивление, дыхание с положительным давлением в конце выдоха

DOI: 10.31857/S0869813920020041

Деятельность систем кровообращения и дыхания, обеспечивающих доставку кислорода к органам и тканям организма, находится в тесной взаимосвязи [1–6]. Поэтому сдвиги функционального состояния одной из этих систем, как правило, сопровождаются их изменениями в другой. Так, еще в 1733 г. английский священник С. Хейлс при измерении у лошади прямым методом артериального давления обратил внимание на его колебания, обусловленные сменой фаз дыхания [3]. В за-

рубежной физиологической литературе для обозначения взаимосвязи сердечно-сосудистой и дыхательной систем используется термины “cardiopulmonary interaction”, “heart-lung interaction” [1–3, 5–10]. В работе [3] подчеркивается, что “взаимодействие систем кровообращения и дыхания — один из базисных ритмов жизни, который изменяется с частотой сердечных сокращений и частотой дыхания”. По данным литературы [4, 7–10] характер легочной вентиляции оказывает существенное влияние на сердечно-сосудистую систему посредством сложных соотношений между “отрицательным” давлением в грудной клетке и объемом воздуха в легких, влияющим на степень их растяжения с одной стороны, венозным возвратом, центральным резервом крови и показателями гемодинамики малого круга кровообращения с другой стороны, и сократимостью миокарда правого и левого желудочков сердца — с третьей. Понимание механизмов этого взаимодействия имеет не только фундаментальное научное, но и прикладное значение в практической медицине: при выполнении лечебной дыхательной гимнастики, использовании различных режимов искусственной вентиляции легких, проведении инфузионной терапии, разработке и применении нового поколения аппаратуры искусственного кровообращения и дыхания.

При рассмотрении взаимодействия сердечно-сосудистой и дыхательной систем можно отметить взаимосвязи между: 1) сдвигами внутригрудного давления и венозного возврата крови к сердцу, а также сердечного выброса, 2) изменениями внутригрудного давления и легочной гемодинамики, 3) величиной внутригрудного давления и сократимостью правого и левого желудочков сердца, 4) сменой фаз дыхания и сдвигами частоты сердечных сокращений, 5) изменениями деятельности дыхательной мускулатуры и системы кровообращения.

Первый подробный анализ влияния изменения отрицательного внутригрудного давления, обусловленного сменой фаз дыхания, на кровоток в верхней и нижней полых венах, а также в легочной артерии, был произведен Г. Бречером в хронических экспериментах на собаках в 1956 г. (цит. по [11]). В исследованиях этого автора было отмечено увеличение кровотока по верхней и нижней полым венам во время вдоха и снижение его во время выдоха, т.е. фазные колебания венозного кровотока при нормальном дыхании животных. Во время вдоха, когда отрицательное внутригрудное давление возрастало, имело место и увеличение кровотока в легочной артерии. Фазные изменения венозного кровотока, обусловленные дыхательным циклом, отмечены также у человека при его измерении методом доплеровской эхокардиографии [12].

Данные литературы свидетельствуют и о том, что во время вдоха, т.е. при увеличении отрицательного внутригрудного давления, ударный объем левого желудочка, сердечный выброс и артериальное давление уменьшаются. Во время выдоха, когда отрицательное внутригрудное давление и венозный возврат крови к правому сердцу снижаются, минутный объем левого сердца и артериальное давление, напротив, возрастают [2, 4, 10, 13, 14].

Сдвиги венозного возврата и сердечного выброса при смене фаз дыхания (и соответствующим им циклическим колебаниям величины отрицательного внутригрудного давления) могут быть обусловлены различными соотношениями величин емкости и сопротивления сосудов легких. По данным литературы [1, 11–13] во время вдоха на фоне увеличения дыхательного объема легких возрастает емкость легочных сосудов. В результате, даже несмотря на повышение кровотока в легочной артерии, кровь депонируется в сосудах легких, и поэтому приток крови к левому сердцу уменьшается. Во время выдоха, при снижении отрицательного внутригрудного давления, несмотря на уменьшение венозного притока крови к сердцу, объем легких уменьшается, и кровь “выжимается” из легочных сосудов. В результате

приток крови к левому сердцу возрастает, что сопровождается и увеличением сердечного выброса [1, 11–13].

В клинической практике для уточнения размеров сердца используется проба Мюллера, заключающаяся в попытке после глубокого выдоха произвести вдох с закрытой голосовой щелью. Это приводит к снижению внутригрудного давления и увеличению венозного притока. В результате сила сокращений правого предсердия и правого желудочка возрастает, что сопровождается выраженной пульсацией верхней полой вены. При этом сила сокращений левого желудочка и амплитуда пульсаций аорты уменьшаются по сравнению с исходными величинами. Особенно отчетливое различие формы и размеров сердца определяется у больных сердечной недостаточностью с миогенной дилатацией левого желудочка [15].

Таким образом, данные литературы свидетельствуют о том, что при смене фаз дыхания направленность сдвигов венозного возврата крови к сердцу и кровотока в легочной артерии с одной стороны, и сердечного выброса и артериального давления с другой – противоположна. Однако в зарубежной литературе практически не представлены данные о величине и характере сдвигов венозного возврата и сердечного выброса при изменении глубины дыхания в более длительном временном интервале, что, естественно, не позволяет ответить на вопрос о степени зависимости венозного возврата от отрицательного внутригрудного давления.

В проведенных нами экспериментах [16–18] показано, что при глубоком естественном дыхании у кошек, которое вызывалось путем создания дополнительного сопротивления вдоху, на фоне увеличения отрицательного внутригрудного давления средняя величина кровотока в брюшном отделе каудальной полой вены у животных практически не изменялась по сравнению с исходной. В указанных условиях венозный кровоток на вдохе возрастал в большей степени, чем при обычном дыхании, тогда как во время выдоха – снижался более выраженно. Следовательно, при глубоком дыхании только амплитуда колебаний (вдох/выдох) мгновенного кровотока по задней полой вене значительно возрастала, что, однако, практически не влияло на величину среднего кровотока по задней полой вене. Таким образом, если во время вдоха в какой-то мере и проявляется “присасывающее” действие отрицательного внутригрудного давления, приводящее к возрастанию мгновенных значений кровотока в брюшном отделе каудальной полой вены, то на выдохе это влияние нивелируется соответствующим или даже большим снижением кровотока в той же вене. Фазные колебания венозного кровотока, обусловленные дыхательным циклом, проявлялись в результате сдвигов как внутригрудного, так и трансдиафрагмального давления [16, 17].

Аналогичная закономерность выявлена также и при глубоком естественном незатрудненном дыхании у человека, находящегося в вертикальном положении при измерении кровотока в левой бедренной вене с помощью линейного датчика ультразвукового эхокардиографа. На фоне глубокого дыхания отмечено достоверное увеличение лишь амплитуды колебаний (вдох/выдох) объемной скорости венозного кровотока, однако его средняя величина достоверно не изменяется. Более того, уже после 4-х глубоких вдохов и продолжении гипервентиляции легких даже эта возросшая амплитуда колебаний венозного кровотока у человека возвращалась к исходным величинам (при обычном дыхании), чего не было отмечено в опытах на животных [18]. В работе [19] показано, что повышение отрицательного внутригрудного давления при глубоком дыхании у животных на фоне ортостатического или антиортостатического воздействий практически не оказывало влияния на среднюю величину кровотока в каудальной полой вене.

Таким образом, результаты наблюдений, проведенных на человеке, и опытов на животных позволяют заключить, что присасывающее действие грудной клетки на среднюю величину венозного притока крови к сердцу как у человека, так и у жи-

вотных, практически отсутствует. Это, по-видимому, препятствует возможности переполнения легких кровью, что особенно опасно при патологии дыхательной системы.

При рассмотрении механизмов влияния отрицательного внутригрудного давления на величину венозного притока, естественно, возникает вопрос взаимосвязи между венозным возвратом и величиной давления в правом предсердии. В случае увеличения отрицательного внутригрудного давления во время вдоха давление в правом предсердии уменьшается, что способствует повышению венозного притока [13, 14].

В соответствии с классической концепцией А. Гайтона, широко распространенной в зарубежной физиологической литературе [2, 20–25], величина давления в правом предсердии непосредственно влияет на венозный возврат, движущей силой которого является градиент давлений между средним давлением наполнения в сосудистой системе и давлением в правом предсердии. Следовательно, величина венозного возврата крови к сердцу пропорциональна градиенту между средним давлением наполнения сосудистой системы (гидростатическое давление в большом круге кровообращения) и давлением в правом предсердии, но обратно пропорциональна сопротивлению венозного оттока [20, 22].

Однако эта точка зрения является весьма упрощенной и не отражает реальной картины сложных соотношений показателей системной и кардиогемодинамики. В модели А. Гайтона кровь из правого предсердия через спадающуюся тонкостенную трубку и насос поступала непосредственно в легочную артерию, т.е. создавался коллатеральный путь оттока крови из правого предсердия, минуя правый желудочек. Изменяя производительность насоса, можно было влиять на отток крови из правого предсердия, а, поднимая или опуская тонкостенную трубку относительно уровня предсердия, — регулировать уровень давления в последнем. Однако очевидно, что в этом случае был нарушен нормальный физиологический механизм поступления крови из правого предсердия в желудочек, и таким образом, моделировалась, по-существу, недостаточность сократительной функции правого сердца. Поэтому на этой модели А. Гайтоном была получена практически линейная отрицательная зависимость венозного возврата крови к сердцу от давления в правом предсердии, т.е. по мере увеличения давления в правом предсердии венозный возврат крови к сердцу уменьшался, а при снижении правопредсердного давления венозный возврат, напротив, возрастал. Следует также подчеркнуть, что исследования Гайтона, выполненные на животных при выключенных у них рефлекторных влияниях на сердечно-сосудистую систему, не позволяют ответить на вопрос о причинно-следственных соотношениях венозного возврата и давления в правом предсердии в интактной сердечно-сосудистой системе.

Вместе с тем, из литературы известно [5, 9, 21], что деятельность предсердий включает в себя резервуарную функцию (в течение систолы желудочков), проводящую (пассивное проведение крови во время расслабления желудочков и диастазиса) и сократительную функцию, которая обеспечивает фазу наполнения желудочков, обусловленную систолой предсердий, а также более быстрое закрытие атриовентрикулярных клапанов вследствие вихревых потоков крови из предсердий в желудочки. По данным литературы [21, 26] величина давления в правом предсердии зависит как от величины венозного притока, так и от насосной функции правого сердца. Кроме того, на давление в правом предсердии влияют многие факторы: объем циркулирующей крови, сократительная функция сердца, общее периферическое сопротивление сосудов и легочное сосудистое сопротивление, а также внутригрудное давление [25, 27–29]. По мнению К. Bendjelit [28] “безусловно, что давление в правом предсердии и венозный возврат крови к сердцу являются взаимозависимыми переменными, однако причинно-следственные соотношения между ними определить очень сложно, особенно в интактной системе кровообращения”.

Следует также подчеркнуть, что среднее давление наполнения сосудистой системы, которое в какой-то мере отражает соотношение между емкостью и сопротивлением сосудистого русла и объемом циркулирующей крови, определяется по величине давления крови в сосудах, установившегося после остановки сердца. Поэтому среднее давление наполнения сосудистой системы приложимо в равной степени ко всем сосудам при остановленном кровообращении, тогда как градиент давлений для венозного кровотока формируется между давлением крови в периферических и центральных венах в условиях работающего сердца [25, 27, 28, 30].

В 1979 г. М.Н. Леви, проведя теоретический анализ исследований А. Гайтона, пришел к противоположному заключению о причинно-следственных связях между давлением в правом предсердии и венозным возвратом. По мнению М.Н. Леви, давление в правом предсердии уменьшается в результате увеличения сердечного выброса, который обеспечивает “откачку” крови из венозного резервуара. Поэтому увеличение венозного притока происходит не в результате снижения давления в правом предсердии, а вследствие возрастания сердечного выброса и оттока крови из периферических и центральных вен, приводящего к снижению давления в правом предсердии (цит. по [27]). В теоретической модели J.V. Tyberg [29] также подтверждена точка зрения М.Н. Леви о том, что давление в правом предсердии уменьшается, поскольку кровь из венозного резервуара “откачивается” в результате увеличения сердечного выброса.

Вместе с тем, в указанных теоретических моделях авторами искусственно был создан гемодинамический разрыв между оттоком крови из периферических вен и ее последующим притоком в венозный резервуар. Действительно, если бы объем циркулирующей крови в венозной системе был постоянным, то можно было бы полагать, что увеличение оттока крови из нее при увеличении сердечного выброса будет приводить к снижению давления в периферических и центральных венах. Однако в условиях замкнутой системы кровообращения, вследствие изменения тонуса вены, может иметь место “мобилизация” в сосудистую систему дополнительного количества крови. Так, в ответ на активацию симпатической нервной системы отмечена веноконстрикция, и в результате “резервный объем крови” становится гемодинамически активным, а венозный возврат крови к сердцу возрастает [25]. Кроме того, сдвиги фильтрационно-реабсорбционного равновесия в микроциркуляторном русле также приводят к изменениям объема циркулирующей крови. Следует также отметить, что для венозных сосудов характерна релаксация напряжения — способность к поддержанию низкого давления при увеличении объема крови в венах. Обратная релаксация напряжения обеспечивает постоянство давления в венах при уменьшении объема крови [25]. В результате вены могут депонировать и мобилизовать значительный объем крови без длительных изменений внутрисосудистого давления. Способность венозных сосудов к прямой и обратной релаксации напряжения, вероятно, поддерживает нормальную величину среднего давления наполнения сосудистой системы и, таким образом, обеспечивает постоянный градиент давлений для венозного притока в условиях постоянства давления в правом предсердии. Поэтому в интактной сердечно-сосудистой системе, особенно при переходных процессах, вызванных сдвигами артериального давления или объема циркулирующей крови, даже в условиях возрастания величины сердечного выброса давление в правом предсердии может не изменяться или возрастать [22, 28], а не уменьшаться, как следует из моделей, предложенных М.Н. Леви и Дж. Тайбергом.

Критический анализ модели А. Гайтона был проведен и G.L. Brengelmann в 2003 г. [30]. По мнению этого автора, кроме принципиально неверного положения А. Гайтона о том, что движущей силой венозного возврата является градиент давления между средним давлением наполнения сосудистой системы и давлением в правом предсердии, ошибочной является сама концепция правопредсердного дав-

ления как “независимой переменной”, которая контролирует венозный возврат. По мнению G.L. Brengelmann, именно насосная функция сердца, обеспечивающая нормальную величину сердечного выброса, определяет низкую величину давления в правом предсердии. Он также подчеркнул, что А. Гайтон рассматривал взаимосвязи венозного возврата и давления в правом предсердии в статических условиях, а не при переходных процессах в системе кровообращения, вызывающих сдвиги емкости венозного русла. В последнем же случае ответ на вопрос о том, будет ли возрастать венозный возврат при снижении давления в правом предсердии, может быть не однозначным [30]. Более того, в завершении обзорной работы [27] авторы заключают, что “поскольку кривые венозного возврата Гайтона произвели много путаницы и мало ясности, необходимо убрать эту концепцию из образовательных программ”.

В проведенных нами исследованиях [31–33] показано, что в условиях прессорных сдвигов артериального давления в ответ на применение вазоактивных веществ присасывающая функция правого предсердия не является значимой для изменений кровотоков по полым венам и формирования суммарного венозного притока. В этих условиях имеет место более быстрое восстановление давления в правом предсердии к исходному значению по сравнению с временной динамикой изменений кровотоков по полым венам и суммарного венозного притока. На фоне сдвигов венозного возврата величина давления в правом предсердии зависит от соотношения величин изменений венозного притока и сократимости миокарда правого желудочка. В случае большего увеличения венозного возврата и сократимости миокарда давление в правом предсердии снижается, а при меньших величинах прироста венозного притока и сократимости миокарда правого желудочка — оно возрастает. При этом величина и направленность изменений правопредсердного давления взаимосвязана также и со сдвигами давления в легочной артерии. В случае менее выраженного прироста последнего на фоне возрастания сократимости миокарда правопредсердное давление снижается, тогда как при большем возрастании давления в легочной артерии давление в правом предсердии повышается.

Результаты проведенных нами наблюдений на человеке и экспериментов на животных свидетельствуют также о влиянии параметров режима дыхания (амплитуды дыхательного цикла при глубоком дыхании) как на частоту сердечных сокращений, так и на мгновенные значения периферического артериального и венозного кровотока, т.е. на его амплитудно-частотные характеристики [34]. Средние значения кровотоков в указанных сосудах при этом не изменяются или изменяются незначительно. Диапазон изменений указанных параметров дыхания позволяет сделать вывод о возможности направленно воздействовать и на сопряженные функции органных сосудов. Таким образом, изменение волновых характеристик дыхания оказывает модулирующее действие на амплитудно-частотные характеристики артериального и венозного кровотока, влияющие на резистивную, емкостную и обменную функции органных сосудов [35].

В работе [34] исследовали влияние изменений параметров искусственной вентиляции легких на величину венозного притока крови к сердцу у животных со вскрытой грудной клеткой. Увеличение легочной вентиляции (за счет возрастания дыхательного объема при неизменной частоте дыхания или увеличение последней при постоянном дыхательном объеме) приводило к снижению венозного возврата преимущественно за счет снижения кровотока по каудальной полой вене. При этом отмечено также уменьшение артериального давления, сердечного выброса и общего периферического сопротивления сосудов. Уменьшение легочной вентиляции, напротив, сопровождалось увеличением венозного возврата и сердечного выброса на фоне прессорных сдвигов артериального давления. Можно полагать, что выявленные в указанной работе изменения параметров системной гемодинамики в ответ

на сдвиги легочной вентиляции могли быть обусловлены изменениями газового состава крови (развитие гипоксии или гипоксии), емкостной и резистивной функций сосудов малого круга кровообращения.

Особо следует отметить выраженное влияние на систему кровообращения режима искусственной вентиляции легких с положительным давлением в конце выдоха. В англоязычной литературе используется термин “positive end-expiratory pressure” [36–39]. Этот режим дыхания характеризуется поддержанием небольшого (5–15 см водн. ст.) положительного давления в дыхательных путях и альвеолах. Таким образом, во время выдоха предотвращается коллапс мелких дыхательных путей и альвеол, который имеет место при обычном способе искусственной вентиляции легких. Последнее поэтому часто сопровождается развитием повреждения легочной ткани. Следовательно, режим дыхания с положительным давлением в конце выдоха, препятствуя коллапсу мелких дыхательных путей и альвеол, способствует увеличению функциональной остаточной емкости, снижению внутрилегочного шунтирования крови, повышению комплаенса (растяжимости) легких и улучшению оксигенации крови. Поэтому указанный режим искусственной вентиляции легких применяется у больных с отеком легких, пневмониями, синдромом дыхательных расстройств и др. [36–43].

Со времен классических работ А. Курнана (цит. по [3, 37]) известно, что режим искусственной вентиляции легких с положительным давлением в конце выдоха уменьшает величину сердечного выброса, за исключением больных с недостаточностью левого желудочка. Из литературы известно [37, 42], что сердечный выброс в указанных условиях может возрастать даже у больных с тяжелой сердечной патологией, например, после хирургической коррекции тетрады Фалло, хотя повышение давления в конце выдоха до 12 см водн. ст. значительно увеличивает нагрузку на правый желудочек. Механизмы увеличения сердечного выброса в указанных условиях обусловлены возрастанием величины внутригрудного давления и уменьшением трансмурального давления изгнания левого желудочка. В результате снижается его постнагрузка и возрастает сократимость. Вместе с тем, при искусственной вентиляции легких с положительным давлением в конце выдоха уменьшается венозный возврат крови к сердцу, что способствует снижению сердечного выброса [40, 43]. Можно поэтому полагать, что конечный эффект (повышение или снижение сердечного выброса) будет зависеть от соотношения величин нескольких гемодинамических показателей: венозного возврата крови к сердцу, сократимости миокарда правого желудочка, оттока крови по легочным венам и сократимости миокарда левого желудочка.

Данные литературы свидетельствуют также о том, что в условиях искусственной вентиляции легких с положительным давлением выдоха на фоне возрастания давления в правом предсердии увеличивается также и среднее давление наполнения сосудистой системы, т.е. градиент для венозного возврата остается постоянным [37, 43]. Увеличение среднего давления наполнения может быть обусловлено возрастанием “мобилизуемого” объема в результате активации симпатoadреналовой системы и констрикции венозных сосудов [37]. Снижение же венозного возврата в указанных условиях является результатом увеличения сопротивления вен как в результате непосредственного возрастания внутригрудного и трансдиафрагмального давления (феномен “водопада”), так и активации рефлекторных нейрогенных механизмов [37]. Следовательно, увеличение внутригрудного давления может вызывать активные реакции венозных сосудов, приводящие к сдвигам их резистивной и емкостной функций, что сопровождается уменьшением венозного притока крови к сердцу.

Вторым важным фактором взаимодействия систем кровообращения и дыхания является взаимосвязь между изменениями внутригрудного давления и легочной гемодинамики. Малый круг кровообращения представляет собой “контур” боль-

шого объема с низким сопротивлением. Относительно низкое сосудистое сопротивление сосудов легких ( $60\text{--}120 \text{ дин} \times \text{с} \times \text{см}^{-5}$ ) по сравнению с общим периферическим сопротивлением сосудов большого круга кровообращения и высокая растяжимость легочных сосудов обуславливают малую (14–18 мм рт. ст. в покое) величину среднего давления крови в легочной артерии у человека, поэтому для легочного кровотока градиент давления между легочной артерией и левым предсердием составляет всего 5–10 мм рт. ст. [44].

Следовательно, благодаря низкому сосудистому сопротивлению малого круга кровообращения и значительному резерву вазодилатации, легочный кровоток в различных условиях может обеспечиваться за счет сравнительно малой работы правого желудочка без большого расхода его энергии. Важно также подчеркнуть, что поскольку легочное сосудистое сопротивление существенно меньше, чем общее периферическое сопротивление сосудов большого круга кровообращения, то кинетическая энергия систолического объема правого желудочка в меньшей мере, чем левого в большом круге, трансформируется в потенциальную энергию растяжения сосудов. Поэтому во время систолы правого желудочка большая часть его ударного объема переходит из легочной артерии в легочные вены. В период диастолы желудочков давление в легочной артерии снижается, что сопровождается уменьшением легочного кровотока. Повышение же давления в левом предсердии при его сокращении создает настолько выраженное противодействие оттоку крови из легочных вен, что скорость легочного кровотока в период левопредсердной систолы уменьшается практически до нуля. Следовательно, величина легочного кровотока в большой степени зависит от давления в левом предсердии и имеет ярко выраженный пульсирующий характер даже в капиллярах [44–47].

Данные литературы [44] свидетельствуют о том, что даже в норме может иметь место незначительный (1–2%) дисбаланс величин кровотока в легочной артерии и аорте, который обусловлен поступлением крови из коронарных вен в правый желудочек, а также через шунтирующие сосуды из артерий и капилляров бронхов – в легочные вены. Таким образом, величина притока крови к левому желудочку и сердечный выброс зависят от сдвигов емкостной и резистивной функций сосудов малого круга кровообращения. Из литературы также известно [44], что изменения емкости легочных сосудов могут приводить к депонированию или мобилизации дополнительного объема крови, который у человека может составлять до 400 мл. Кроме того, на приток крови к левому сердцу при постоянных величинах венозного возврата и кровотока в легочной артерии могут существенно влиять и фильтрационно-реабсорбционные процессы в капиллярах легких [46, 47]. Таким образом, активные реакции легочных сосудов в норме или при патологии кровообращения могут приводить к сдвигам оттока крови из легких и, следовательно, величин сердечного выброса и артериального давления.

По данным литературы [48] в малом круге кровообращения на долю артериальных легочных сосудов приходится не более 50% величины легочного сосудистого сопротивления, а почти 30% его составляет сопротивление венозных сосудов легких. При морфометрическом измерении длины и диаметра сосудов легких кошки и расчете на основании этих данных сопротивления легочных венозных сосудов оно может достигать до 49% величины суммарного легочного сосудистого сопротивления [48]. Следовательно, по данным литературы, в малом круге кровообращения сопротивление вен вносит больший вклад в величину легочного сосудистого сопротивления по сравнению с вкладом венозных сосудов в сосудистое сопротивление большого круга кровообращения. Это может быть обусловлено более выраженными, чем в большом круге, разветвлениями легочных венозных сосудов, а также большей зависимостью сопротивления венозных сосудов легких от трансмурального давления [48]. Так, во время глубокого вдоха давление воздуха в альвео-

лах возрастает, и сопротивление потоку крови через альвеолярные легочные капилляры также увеличивается. В то же время, при увеличении отрицательного внутригрудного давления сопротивление венозных сосудов уменьшается, эти сосуды расширяются, и объем крови в них увеличивается. Во время фазы выдоха характер сдвигов сопротивления легочных капилляров и вен изменяется на противоположный, т.е. сопротивление легочных капилляров уменьшается, а легочных вен, напротив, возрастает. Поскольку сопротивления этих легочных сосудов изменяются противофазно при смене вдоха и выдоха, то минимальная величина легочного сосудистого сопротивления отмечена при объеме воздуха в легких, соответствующем их функциональной остаточной емкости [1, 2, 48].

По данным литературы [37] в условиях искусственной вентиляции легких с положительным давлением в конце выдоха величина сопротивления легочных сосудов будет определяться взаимодействием нескольких факторов. Во-первых, на фоне повышенного давления в альвеолах улучшается диффузионная способность легких для кислорода, что уменьшает проявления гипоксической легочной вазоконстрикции и способствует снижению легочного сосудистого сопротивления. Во-вторых, при увеличении объема легких от функциональной остаточной емкости до общей емкости легких легочное сосудистое сопротивление возрастает, тогда как емкость легочных сосудов уменьшается. Этот двойственный эффект может быть объяснен наличием двух типов интрапаренхимальных легочных сосудов: альвеолярных и экстраальвеолярных. По мере увеличения объема легких альвеолярные сосуды легких сжимаются, тогда как экстраальвеолярные сосуды, напротив, расширяются в ответ на увеличение объема легких. Если величина последнего меньше функциональной остаточной емкости, то преобладают эффекты на экстраальвеолярные сосуды, и легочное сосудистое сопротивление снижается. Если же объем легких возрастает больше функциональной остаточной емкости, то преобладают эффекты на альвеолярные сосуды, и легочное сосудистое сопротивление возрастает. В результате изменения объема легких сдвиги легочного сосудистого сопротивления характеризуются U-образной формой. Важно поэтому подчеркнуть, что при высоких величинах положительного давления в конце выдоха (свыше 30 см водн. столба) альвеолярное давление уже сопоставимо или даже больше величины давления в легочной артерии (12–16 мм рт. ст.), что может приводить к снижению сократимости правого желудочка. В условиях же увеличения сопротивления сосудов малого круга кровообращения и в результате перегрузки правого желудочка, может развиваться недостаточность его сократительной функции (“легочное сердце”). При этом повышается давление в правом предсердии и уменьшается венозный возврат, что сопровождается развитием периферических отеков. Следовательно, в условиях легочной гипертензии сдвиги резистивной функции легочных сосудов могут посредством изменения деятельности правого сердца оказывать влияние на величину венозного возврата крови к сердцу [1, 3, 36, 37, 40, 42].

Таким образом, сдвиги внутригрудного давления и сопутствующие им изменения объема легких сопровождаются изменениями сопротивления и емкости легочных сосудов. Особенно выраженные их сдвиги проявляются в условиях искусственной вентиляции легких с положительным давлением в конце выдоха. Эти изменения могут посредством изменения деятельности правого сердца оказывать влияние на величину венозного возврата.

Изменения внутригрудного давления при дыхании сопровождаются также сдвигами работы правого и левого желудочков сердца [1, 2]. Как отмечено выше, во время вдоха уменьшение внутригрудного давления приводит к возрастанию венозного возврата и наполнению правого желудочка, т.е. его конечно-диастолического объема. Однако, поскольку стенки правого желудочка тонкие, а сердце находится в малорастяжимой перикардиальной сумке, при этом межжелудочковая перегородка

смещается в полость левого желудочка, что приводит к уменьшению его объема и наполнения. Этот феномен в литературе получил название “диастолическая желудочковая взаимозависимость” [1, 4, 9, 40]. Он может также являться одной из причин уменьшения ударного объема левого желудочка во время вдоха.

В литературе представлены сведения [1, 4, 9, 40], согласно которым, по мере увеличения во время вдоха “отрицательного” внутригрудного давления, возрастает постнагрузка левого желудочка. Это обусловлено тем, что во время вдоха левый желудочек, работая против величины артериального давления, оказывается в условиях повышенного “внешнего”, отрицательного внутригрудного давления. Иными словами, возрастает трансмуральное давление изгнания левого желудочка, т.е. его постнагрузка. В результате может снижаться сократимость миокарда левого желудочка, что приводит к увеличению его остаточного объема и уменьшению ударного объема и сердечного выброса. Во время же выдоха постнагрузка левого сердца снижается, поскольку “внешнее” отрицательное давление уменьшается. В результате сократимость миокарда левого желудочка возрастает, что приводит к возрастанию ударного объема и сердечного выброса, тогда как остаточный объем левого желудочка, напротив, снижается. Вместе с тем, у здорового человека колебания трансмурального давления изгнания левого желудочка, обусловленные дыханием, практически не оказывают выраженного влияния на его кардиогемодинамику, поскольку в норме сократимость миокарда возрастает в соответствии с увеличением постнагрузки [3]. Однако при выраженном увеличении отрицательного внутригрудного давления в условиях патологии, например, при обструкции верхних дыхательных путей, отеке гортани, обструктивном апноэ во время сна, отмечено значительное увеличение постнагрузки левого желудочка. Это может приводить к снижению его сократимости, а на фоне увеличения венозного притока, обусловленного повышением отрицательного внутригрудного давления, явиться причиной развития отека легких [1, 4, 9, 40].

В условиях искусственной вентиляции легких с положительным давлением в конце выдоха, величина внутригрудного давления возрастает, что приводит к уменьшению трансмурального давления изгнания левого желудочка. В результате уменьшается его постнагрузка и возрастает сократимость, что отмечено у больных застойной сердечной недостаточностью [3, 37, 40, 42]. Вместе с тем, в указанных условиях уменьшается венозный возврат, а на фоне увеличения дыхательного объема возрастает легочное сосудистое сопротивление, т.е. постнагрузка правого желудочка. В результате, сердечный выброс может значительно уменьшиться. Следовательно, позитивный эффект искусственной вентиляции легких с положительным давлением в конце выдоха на сократимость миокарда левого желудочка у больных с левожелудочковой недостаточностью может проявляться при незначительном возрастании дыхательного объема легких [3]. Важно подчеркнуть, что изменения величины внутригрудного давления как при естественном дыхании, так и искусственной вентиляции легких оказывают маловыраженные влияния на работу правого желудочка, т.е. его постнагрузку. Это обусловлено тем, что легкие находятся в герметично замкнутой грудной полости и сдвиги внутригрудного давления действуют на сосуды легких в равной степени [3]. Таким образом, при разработке нового поколения аппаратов искусственной вентиляции легких, по-видимому, необходимо создавать систему управления, анализирующую не только сдвиги газового состава крови, но и изменения кардиогемодинамики левого и правого желудочков сердца.

Рассмотренные выше механизмы взаимодействия систем кровообращения и дыхания были обусловлены, в основном, физическими факторами, в частности, изменениями величины внутригрудного давления. Вместе с тем, эти системы находятся под влиянием нейрогенных и гуморальных механизмов. Наиболее характер-

ными являются, например, сдвиги частоты сердечных сокращений при смене фаз дыхания, что обозначается в литературе термином “дыхательная аритмия” [49–51]. Во время вдоха частота сердечных сокращений увеличивается, тогда как во время выдоха, напротив, уменьшается. Дыхательная синусовая аритмия проявляется у здоровых людей всех возрастов, но наиболее выражена у астеничных подростков в пубертатном периоде [49]. В указанной работе авторы также выявили взаимосвязь между степенью выраженности дыхательной аритмии, ее прекращением и агрессивным поведением подростков.

Ускорение и замедление сердечного ритма обусловлено рефлекторными изменениями тонуса блуждающих и симпатических нервов во время фазы вдоха и выдоха. В литературе отмечены три рефлекса, влияющие на сдвиги частоты сердечных сокращений при смене фаз дыхания: 1) рефлекс Геринга–Брейера, 2) рефлекс Бейнбриджа, 3) барорефлекс [50, 51].

Рефлекс Геринга–Брейера обусловлен растяжением легких. Во время вдоха активируются механорецепторы легочных альвеол и соответствующие им афферентные окончания блуждающих нервов. Это, с одной стороны, способствует торможению вдоха и его смене на выдох, но, с другой стороны, – тормозит кардиоингибирующий центр в продолговатом мозге. В результате тонические влияния блуждающих нервов на сердце уменьшаются, и частота сердечных сокращений возрастает. Во время выдоха импульсация от механорецепторов легких снижается и кардиоингибирующий центр тормозится в меньшей степени, поэтому ритм сердца замедляется.

Рефлекс Бейнбриджа проявляется в том, что во время вдоха, на фоне увеличения отрицательного внутриплеврального давления, возрастает венозный приток крови к сердцу, что сопровождается повышением давления в правом предсердии. В результате увеличивается тонус симпатических нервов и реципрокно уменьшается тонус блуждающих нервов, что способствует увеличению частоты сердечных сокращений. Во время выдоха, на фоне снижения венозного возврата, давление в правом предсердии уменьшается, что сопровождается уменьшением тонуса симпатических нервов, возрастанием тонуса блуждающих нервов и снижением частоты сердечных сокращений.

Изменения тонической импульсации барорецепторов дуги аорты и каротидного синуса во время смены фаз дыхания обусловлены колебаниями величин ударного объема сердца, сердечного выброса и артериального давления. Во время вдоха, как отмечено выше, венозный приток к сердцу возрастает. Однако в результате растяжения легких увеличивается емкость легочных сосудов, что приводит к депонированию крови в сосудах малого круга. Поэтому во время вдоха отток крови из легочных вен к левому предсердию уменьшается, ударный объем, сердечный выброс левого желудочка, и, следовательно, артериальное давление также снижаются. В результате импульсация от барорецепторов уменьшается, что способствует повышению тонуса симпатических нервов сердца и увеличению частоты сердечных сокращений. Во время выдоха, несмотря на уменьшение венозного притока, отток крови из легких к левому сердцу возрастает, и поэтому величины ударного объема, сердечного выброса и артериальное давление увеличиваются. Это приводит к увеличению импульсации от барорецепторов, повышению тонуса блуждающих нервов и снижению частоты сердечных сокращений. Таким образом, дыхательная синусовая аритмия, обусловленная рефлекторными изменениями тонических влияний симпатических и парасимпатических нервов сердца, является примером нормальных колебательных процессов в результате взаимодействия систем дыхания и кровообращения.

Вторым примером участия рефлекторных механизмов в изменениях функции кровообращения при изменении функции дыхания является проба Вальсальвы – форсированный выдох при закрытом носе и рте [14, 15]. Следует подчеркнуть, что

этот механизм проявляется также при кашлевом рефлексе и натуживании во время акта дефекации. В результате повышения внутригрудного давления, его величина добавляется к давлению в аорте, и поэтому артериальное давление вначале возрастает. Однако последнее затем снижается, поскольку повышенное внутригрудное давление способствует уменьшению венозного возврата и сердечного выброса. Уменьшение артериального давления приводит к возбуждению барорецепторов, активации симпатических нервов и повышению частоты сердечных сокращений, а также общего периферического сопротивления сосудов. Когда внутригрудное давление возвращается к нормальной величине, сердечный выброс начинает увеличиваться, что на фоне повышенного общего периферического сопротивления способствует возрастанию артериального давления. В результате стимуляции барорецепторов активируются депрессорные механизмы и поэтому частота сердечных сокращений, а также артериальное давление снижаются.

Третьим примером участия рефлекторных механизмов в изменениях функции кровообращения при изменении функции дыхания является метаборефлекс с хеморецепторов дыхательных мышц [52–54]. При усиленной работе дыхательных мышц в них накапливаются метаболиты (лактат, пируват), что сопровождается активацией хеморецепторов и соответствующих им афферентных окончаний диафрагмальных нервов. В результате, через интегративные связи нейронов ретикулярной формации, активируется симпатическая нервная система [54]. В литературе представлены сведения о том, что даже у здоровых добровольцев при развитии утомления дыхательных мышц в ответ на пробу с дыханием с увеличенным сопротивлением вдоха и выдоха отмечено рефлекторное увеличение частоты сердечных сокращений и артериального давления [54]. Особенно выражен этот феномен у больных застойной сердечной недостаточностью. Поэтому в современной физиологической и клинической литературе широко обсуждается метод тренировки дыхательных мышц, посредством дыхания через специальный прибор с увеличением сопротивления вдоха и выдоха, чтобы минимизировать проявление метаборефлекса как у здорового человека, так и больных застойной сердечной недостаточностью и бронхиальной астмой [53, 54]. Так, в экспериментальной работе [52] на модели инфаркта миокарда у крыс показано, что тренировка дыхательных мышц способствует снижению симпатической активности и частоты сердечных сокращений, конечно-диастолического давления в левом желудочке, т.е. увеличению сократимости миокарда. Более того, даже у больных с унивентрикулярным кровообращением (операция Фонтен) метод тренировки дыхательных мышц способствовал возрастанию величины сердечного выброса в покое и фракции выброса левого желудочка [53].

Таким образом, рефлекторные нейрогенные влияния на сердце и сосуды как с рецепторов легких, так и дыхательных мышц, являются существенными в механизмах взаимодействия дыхательной и сердечно-сосудистой систем. Дыхательная синусовая аритмия, обусловленная рефлекторными изменениями тонических влияний симпатических и парасимпатических нервов на сердце, является примером нормальных колебательных процессов, в результате взаимодействия систем дыхания и кровообращения. Метод тренировки дыхательных мышц способствует возрастанию величины сердечного выброса в покое и фракции выброса левого желудочка у больных застойной сердечной недостаточностью.

Итак, представленные в обзоре данные литературы и проведенных нами экспериментов позволяют заключить, что механизмы взаимодействия систем кровообращения и дыхания характеризуются взаимосвязями между сдвигами внутригрудного давления и венозного возврата крови к сердцу, а также сердечного выброса; изменениями внутригрудного давления и легочной гемодинамики; величиной внутригрудного давления и сократимостью правого и левого желудочков сердца;

сменной фаз дыхания и сдвигами частоты сердечных сокращений; изменениями деятельности дыхательной мускулатуры и системы кровообращения. Фазные колебания венозного кровотока (увеличение на вдохе и снижение на выдохе) проявляются в результате сдвигов как внутригрудного, так и трансдиафрагмального давления. Однако присасывающее действие грудной клетки на среднюю величину венозного притока практически отсутствует. При смене фаз дыхания направленность сдвигов венозного возврата крови к сердцу и кровотока в легочной артерии с одной стороны, и сердечного выброса и артериального давления с другой — противоположна, что обусловлено различными соотношениями величин емкости и сопротивления сосудов легких. В условиях искусственной вентиляции легких с положительным давлением в конце выдоха изменения сердечного выброса зависят от соотношений величин венозного возврата крови к сердцу, сократимости миокарда правого желудочка, оттока крови по легочным венам и сократимости миокарда левого желудочка. Увеличение внутригрудного давления может вызывать активные реакции венозных сосудов, приводящие к сдвигам их резистивной и емкостной функций, что сопровождается снижением венозного притока крови к сердцу. В регуляции взаимодействия систем дыхания и кровообращения важное значение имеют рефлекторные нейрогенные влияния на сердце и сосуды с рецепторов легких и дыхательных мышц. При разработке нового поколения аппаратов искусственной вентиляции легких необходимо создавать систему управления их работой, учитывающую не только изменения показателей газового состава крови, но и механизмы взаимодействия систем дыхания и кровообращения.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена по теме 0557-2019-00012 гос. задания Минобрнауки Российской Федерации.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bronicki R.A., Anas N.G.* Cardiopulmonary interaction. *Pediatr. Crit. Care. Med.* 10(3): 313–322. 2009.
2. *Magder S.* Heart-Lung interaction in spontaneous breathing subjects: the basics. *Ann. Transl. Med.* 6(18): 348. 2018.
3. *Mahmood S.S., Pinsky M.R.* Heart-lung interactions during mechanical ventilation: the basics. *Ann. Transl. Med.* 6(18): 349. 2018.
4. *Pinsky M.R.* Heart–lung interactions. *Curr. Opin. Crit. Care* 13: 528–531. 2007.
5. *Rigby M.L., Rosenthal M.* Cardiorespiratory Interactions in Paediatrics: 'It's (almost always) the circulation stupid!'. *Paediatr. Respir. Rev.* 22: 60–65. 2017.
6. *Verhoeff K., Mitchell J.R.* Cardiopulmonary physiology: why the heart and lungs are inextricably linked. *Adv. Physiol. Educ.* 41(3): 348–353. 2017.
7. *Pinsky M.R.* Cardiovascular issues in respiratory care. *Chest.* 128(1): 592S–597S. 2005.
8. *Pinsky M.R.* Functional Hemodynamic Monitoring. *Crit. Care. Clin.* 31(1): 89–111. 2015.
9. *Pinsky M.R.* The right ventricle: interaction with the pulmonary circulation. *Crit. Care* 20: 266–275. 2016.
10. *Pinsky M.R.* Cardiopulmonary Interactions: Physiologic Basis and Clinical Applications. *Ann. Am. Thorac. Soc. (Suppl.1).* 15(2): S45–S48. 2018.
11. *Ткаченко Б.И., Евлахов В.И., Поясов И.З.* Механизмы формирования венозного возврата крови к сердцу. *Мед. академ. журн.* 2(1): 3–18. 2002. [*Tkachenko B.I., Evlakhov V.I., Poyassov I.Z.* The mechanisms of the venous return formation. *Med. Acad. J.* 2 (1): 3–18. 2002. (In Russ)].
12. *Ayabakan C., Ozkutlu S.* Normal patterns of flow in the superior caval, hepatic and pulmonary veins as measured using Doppler echocardiography during childhood. *Cardiol. Young.* 13(2): 143–151. 2003.
13. *Claessen G., Claus P., Delcroix M., Bogaert J., La Gerche A., Heidebuchel H.* Interaction between respiration and right versus left ventricular volumes at rest and during exercise: a real-time cardiac magnetic resonance study. *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.)* 306(6): H816–H824. 2014.
14. *Goldstein D.S., Cheshire W.P.* Beat-to-beat blood pressure and heart rate responses to the Valsalva maneuver. *Clin. Auton. Res.* 27(6): 361–367. 2017.

15. *Gorgulu S., Eksik A., Ere B.M., Celik S., Uslu N., Yildirim A., Dagdevi en B., Tezel T.* Assessment of the effects of various maneuvers on both atrial pressure changes. *Int. J. Cardiol.* 92(2): 241–245. 2003.
16. *Ткаченко Б.И., Евлахов В.И., Поясов И.З.* Характер изменения кровотока в сосудах бассейна нижней полой вены при увеличении отрицательного внутригрудного давления. Бюлл. Экспер. биол. мед. 129(3): 248–251. 2000. [*Tkachenko B.I., Evlakhov V.I., Poyassov I.Z.* Changes in blood flow in vessels of the inferior vena cava region under negative intrathoracic pressure. *Biull. Eksp. Biol. Med.* 129(3): 248–251. 2000. (In Russ)].
17. *Ткаченко Б.И., Евлахов В.И., Поясов И.З.* О роли отрицательного внутригрудного давления в изменении венозного возврата крови к сердцу. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 87(1): 14–22. 2001. [*Tkachenko B.I., Evlakhov V.I., Poyassov I.Z.* Effect of negative intrathoracic pressure on venous return. *Russ. J. Physiol.* 87(1): 14–22. 2001. (In Russ)].
18. *Ткаченко Б.И., Евлахов В.И., Поясов И.З.* О роли сил “vis a fronte” в формировании венозного возврата крови к сердцу. Вестник РАМН. 12: 3–9. 2002. [*Tkachenko B.I., Evlakhov V.I., Poyassov I.Z.* The role of forces “vis a fronte” in the formation of venous return of blood to the heart. *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk.* 12: 3–9. 2002. (In Russ)].
19. *Евлахов В.И., Поясов И.З.* Артериальный и венозный кровоток при глубоком дыхании в условиях орто- и антиортостатического воздействий. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 87(1): 37–42. 2001. [*Evlakhov V.I., Poyassov I.Z.* Arterial and venous blood flows in cats in deep respiration following orthostatic and antiorthostatic tilts. *Russ. J. Physiol.* 87(1): 37–42. 2001. (In Russ.)].
20. *Brengelmann G.L.* Venous return and the physical connection between distribution of segmental pressures and volumes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 317(5): H939–H953. 2019.
21. *Chemla D., Berthelot E., Assayag P., Attal P., Hervé P.* Physiopathologie hémodynamique du ventricule droit. *Rev. Mal. Respir.* 35(10): 1050–1062. 2018.
22. *Gelman S.* Venous function and central venous pressure: a physiologic story. *Anesthesiology.* 108(4): 735–748. 2008.
23. *Magder S.* The classical Guyton view that mean systemic pressure, right atrial pressure, and venous resistance govern venous return is/is not correct. *J. Appl. Physiol.* 101(5): 1533–1536. 2006.
24. *Mukkamala R., Cohen R.J., Mark R.G.* A computational model-based validation of Guyton’s analysis of cardiac output and venous return curves. *Comput. Cardiol.* 29(5): 561–564. 2002.
25. *Pang C.C.* Measurement of body venous tone. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 44(2): 341–360. 2000.
26. *Moller P.W., Winkler B., Hurni S., Heinisch P.P., Bloch A., Sondergaard S., Jakob S.M., Takala J., Berger D.* Right atrial pressure and venous return during cardiopulmonary bypass. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 313(2): H408–H420. 2017.
27. *Beard D.A., Feigl E.O.* Understanding Guyton’s venous return curves. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 301: H629–H633. 2011.
28. *Bendjelit K.* Right atrial pressure: Determinant or result of change in venous return? *Chest.* 128(5): 3639–3640. 2005.
29. *Tyberg J.V.* How changes in venous capacitance modulate cardiac output. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 445(1): 10–17. 2002.
30. *Brengelmann G.L.* A critical analysis of the view that right atrial pressure determines venous return. *J. Appl. Physiol.* 94(3): 849–859. 2003.
31. *Ткаченко Б.И., Евлахов В.И., Поясов И.З.* О роли постоянства давления в правом предсердии в формировании величины венозного возврата крови к сердцу. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 87(5): 670–678. 2001. [*Tkachenko B.I., Evlakhov V.I., Poyassov I.Z.* The constant level of the right atrial pressure and its role in the venous return characteristics. *Russ. J. Physiol.* 87(5): 670–678. 2001. (In Russ)].
32. *Tkachenko B.I., Evlakhov V.I., Poyassov I.Z.* Relationship between venous return and right-atrial pressure. *Bull. Exp. Biol. Med.* 131(5): 421–423. 2001.
33. *Tkachenko B.I., Evlakhov V.I., Poyassov I.Z.* Relationships between venous return and blood pressure in caval veins and right atrium during pressor stimulation. *Bull. Exp. Biol. Med.* 132(4): 926–928. 2001.
34. *Самойленко А.В., Юров А.Ю., Евлахов В.И., Поясов И.З.* Актуальные вопросы регуляции венозного возврата. Мед. акад. журн. 10(4): 7–20. 2010. [*Samoilenko A.V., Yurov A. Yu., Evlakhov V.I., Poyassov I.Z.* The actual questions of the venous return regulation. *Med. Acad. J.* 10(4): 7–20. 2010. (In Russ)].
35. *Поясов И.З.* Функции органных сосудов при пульсирующем кровотоке. Рос физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 97(1): 35–46. 2011. [*Poyassov I.Z.* The functions of the organ vessels during pulsatile flow. *Russ. J. Physiol.* 97(1): 35–36. 2011. (In Russ)].
36. *Grübler M.R., Wigger O., Berger D., Blöchliger S.* Basic concepts of heart-lung interactions during mechanical ventilation. *Swiss. Med. Wkly.* 147: w14491. 2017.
37. *Luecke T., Pelosi P.* Clinical review: Positive end-expiratory pressure and cardiac output. *Critical Care.* 9: 607–621. 2005.

38. Rouby J.J., Lu Q., Goldstein I. Selecting the right level of positive end-expiratory pressure in patients with acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 165(3): 1182–1186. 2002.
39. Schmitt J.M., Vieillard-Baron A., Augarde R., Prin S., Page B., Jardin F. Positive end-expiratory pressure titration in acute respiratory distress syndrome patients: impact on right ventricular outflow impedance evaluated by pulmonary artery Doppler flow velocity measurements. *Crit. Care. Med.* 29(3): 1154–1158. 2001.
40. Bendjelid K., Romand J.-A. Interdépendance cœur–poumons chez le patient ventilé par pression positive. *Ann. Franç. d'Anesthésie et de Réanimation.* 26: 211–217. 2007.
41. Berger D., Takala J. Determinants of systemic venous return and the impact of positive pressure ventilation. *Ann. Transl. Med.* 6(18): 350. 2018.
42. Marini M., Caretta G., Vagnarelli F., Lucà F., Biscottini E., Lavorgna A., Procaccini V., Riva L., Vianello G., Aspromonte N., Mortara A., De Maria R., Capasso P., Valente S., Gulizia M.M. Hemodynamic effects of positive end-expiratory pressure. *G. Ital. Cardiol (Rome).* 18(6): 505–512. 2017.
43. Jellinek H., Krenn H., Oczenski W., Veit F., Schwartz S., Fitzgerald R.D. Influence of positive airway pressure on the pressure gradient for venous return in humans. *J. Appl. Physiol.* 88(3): 926–932. 2000.
44. Евлахов В.И., Овсянников В.И., Поясов И.З., Шайдаков Е.В. Современные аспекты регуляции легочного кровообращения в норме и при экспериментальной патологии. *Мед. академ. журн.* 13(4): 54–65. 2013. [Evlakhov V.I., Ovsyannikov V.I., Poyassov I.Z., Shaidakov E.V. Modern aspects of the pulmonary hemodynamics regulation in normal conditions and experimental pathology. *Med. Acad. J.* 13(4): 54–65. 2013 (In Russ)].
45. Hedentiera G. Pulmonary perfusion during anesthesia and mechanical ventilation. *Minerva Anesthesiol.* 71(4): 319–324. 2005.
46. Hollander E.H., Dobson G.M., Wang J.J., Parker K.H., Tyberg J.V. Direct and series transmission of left atrial pressure perturbations to the pulmonary artery: a study using wave-intensity analysis. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 286(2): H267–H275. 2004.
47. Presson R.G.Jr., Baumgartner W.A.Jr., Peterson A.J., Glenny R.W., Wagner W.W. Jr. Pulmonary capillaries are recruited during pulsatile flow. *J. Appl. Physiol.* 92 (3): 1183–1190. 2002.
48. Gao Y., Raj J.U. Role of veins in regulation of pulmonary circulation. *Am. J. Physiol Lung. Cell Mol. Physiol.* 288(2): L213–L226. 2005.
49. Sanders W., Parent J., Abaied J.L., Forehand R., Coyne S., Dyer W.J. The Longitudinal Impact of Screen Time on Adolescent Development: Moderation by Respiratory Sinus Arrhythmia. *J. Adolesc. Health.* 63(4): 459–465. 2018.
50. Mestanik M., Mestanikova A., Langer P., Grendar M., Jurko A., Sekaninova N., Visnovcova N., Tonhajzerova I. Respiratory sinus arrhythmia – testing the method of choice for evaluation of cardiovagal regulation. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 259(1): 86–92. 2019.
51. Grossman P., Taylor E.W. Toward understanding respiratory sinus arrhythmia: relations to cardiac vagal tone, evolution and biobehavioral functions. *Biol. Psychol.* 74(3): 263–285. 2007.
52. Jaenisch R.B., Quagliotto E., Chechi C., Calegari L., Dos Santos F., Borghi-Silva A., Dal Lago P. Respiratory Muscle Training Improves Chemoreflex Response, Heart Rate Variability, and Respiratory Mechanics in Rats With Heart Failure. *Can. J. Cardiol.* 33(4): 508–514. 2017.
53. Laohachai K., Winlaw D., Selvadurai H., Gnanappa G.K., d'Udekem Y., Celermajer D., Ayer J. Inspiratory Muscle Training Is Associated With Improved Inspiratory Muscle Strength, Resting Cardiac Output, and the Ventilatory Efficiency of Exercise in Patients With a Fontan Circulation. *J. Am. Heart. Assoc.* 6(8): e005750. 1–11. 2017.
54. Moreno A.M., Toledo-Arruda A.C., Lima J.S., Duarte C.S., Villacorta H., Nóbrega A.C. Inspiratory Muscle Training Improves Intercostal and Forearm Muscle Oxygenation in Patients With Chronic Heart Failure: Evidence of the Origin of the Respiratory Metaboreflex. *J. Card. Fail.* 23(9): 672–679. 2017.

### The Mechanisms of Cardiopulmonary Interaction

V. I. Evlakhov<sup>a, b, \*</sup>, I. Z. Poyassov<sup>a, c</sup>, and V. I. Ovsyannikov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia

<sup>b</sup>Pavlov 1-st St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia

<sup>c</sup>St. Petersburg State University of Aerospace Instrumentation, St. Petersburg, Russia

\*e-mail: viespbbru@mail.ru

In this review we discuss the mechanisms of cardio-pulmonary interaction during spontaneous respiration and mechanical lung ventilation. We noted the interrelations between the changes of the intrathoracic pressure, venous return and cardiac output; the

changes of the intrathoracic pressure and pulmonary hemodynamics; the values of the intrathoracic pressure and right and left ventricular myocardial contractility; the changing of respiratory phases and heart rate; the changes of respiratory muscles contraction and circulatory system. The phasic changes of the venous flow (it increases during respiration and decreases during expiration) are caused by the changes of both the intrathoracic and transdiaphragmatic pressures. However, the sucking thoracic effect is practically absent to the mean values of the venous return. During phasic respiratory changes the shifts of the venous return and pulmonary artery flow are opposite to the changes of the cardiac output and arterial pressure as a result of the changes of capacitance and resistance of the pulmonary vessels. In case of positive end expiratory pressure ventilation the changes of the cardiac output are dependent from the interrelations of the venous return, right ventricular myocardial contractility, pulmonary veins outflow and left ventricular myocardial contractility. The reflectory neurogenic influences on the heart and vessels from the pulmonary and respiratory muscles receptors are important during the cardio-pulmonary interaction.

*Keywords:* negative intrathoracic pressure, venous return, cardiac output, pulmonary artery

#### ЦИТИРОВАТЬ:

Евлахов В.И., Поясов И.З., Овсянников В.И. Механизмы взаимодействия сердечно-сосудистой и дыхательной систем. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(2): 189–204.  
DOI: 10.31857/S0869813920020041

#### TO CITE THIS ARTICLE:

Evlakhov V.I., Poyassov I.Z., Ovsyannikov V.I. The mechanisms of cardiopulmonary interaction. Russian Journal of Physiology. 106(2): 189–204.  
DOI: 10.31857/S0869813920020041

## СВЯЗЬ ПЕРИОДИЧЕСКИХ МОДУЛЯЦИЙ СЕРДЕЧНОГО РИТМА С УРОВНЕМ АКТИВНОСТИ СЕНСОМОТОРНОЙ КОРЫ

© 2020 г. К. И. Павлов<sup>1, \*</sup>, В. Н. Мухин<sup>2</sup>, А. В. Сырцев<sup>1</sup>, А. Н. Архимук<sup>1</sup>,  
Н. М. Андиева<sup>1</sup>, М. И. Петренко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Военный учебно-научный центр Военно-морского флота “Военно-морская академия”,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия  
\*e-mail: youngexp@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.09.2019 г.

После доработки 19.11.2019 г.

Принята к публикации 19.11.2019 г.

Актуальность исследования обусловлена недостатком работ, дающих физиологическое обоснование параметров variability сердечного ритма и ее связи с биоэлектрической активностью сенсомоторной коры головного мозга в процессе когнитивной деятельности. Цель исследования: определить связи периодических модуляций сердечного ритма с уровнем активности сенсомоторной коры в процессе когнитивной деятельности. Объем выборки составил 42 курсанта первого курса Военного института (военно-морского) Военного учебно-научного центра Военно-морского флота “Военно-морская академия”. Средний возраст обследуемых —  $18 \pm 0.7$  лет. Использовались методы электроэнцефалографии и электрокардиографии. Взаимосвязь variability сердечного ритма с уровнем активности сенсомоторной коры головного мозга оценивалась одновременно с предъявлением психофизиологических методик — “Красно-черные таблицы Шульте–Платонова”, “Часы с поворотом”, “Реакция на движущийся объект” (РДО), “Устный счет” при закрытых глазах. Эти методики были направлены на оценку восприятия, селективного внимания, рабочей памяти, пространственной ориентации и мышления. Установлено, что при решении задач на восприятие изменений пространственно-временных событий (РДО) обнаруживаются отрицательные корреляции между активностью сенсомоторной коры левого полушария и значениями амплитуд модуляций сердечного ритма в частотной зоне около 0.05 (0.043–0.056) колебаний на кардиоинтервал (кол/ки). При выполнении арифметических задач (Устный счет при закрытых глазах) такие корреляции обнаружены на частотах около 0.13 кол/ки (0.126–0.136 кол/ки), а в ходе выполнения задач на пространственную ориентацию (Часы с поворотом) — на частотах около 0.44 кол/ки (0.430–0.446 кол/ки). Связь амплитуды модуляций на частотах 0.3–0.45 кол/ки с уровнями активности сенсомоторной коры стабильно отмечается во всех функциональных пробах. Процессы активации сенсомоторной коры, вызванные когнитивной нагрузкой, сопровождаются уменьшением амплитуды периодических колебаний сердечного ритма на частотах от 0.05 до 0.13 кол/ки.

**Ключевые слова:** variability сердечного ритма, структура периодических модуляций сердечного ритма, электроэнцефалография, активация сенсомоторной коры, десинхронизация ЭЭГ, частотный и спектральный анализ

DOI: 10.31857/S0869813920020089

Изучение роли сердечно-сосудистой системы, во многом определяющей успешность физиологической адаптации организма к экстремальным условиям среды (в

том числе, к условиям военной службы), в модуляции когнитивных функций является одной из важнейших практических задач военной психофизиологии. В наших предыдущих работах было показано, что вариабельность сердечного ритма (BCP), а именно, амплитуда периодических колебаний сердечного ритма связана с электрофизиологическими проявлениями психической работоспособности – уровнем десинхронизации ЭЭГ в левом лобном отведении [1, 2]. В предыдущих наших работах было установлено, что курсанты с высоким уровнем развития внимания и мышления, характеризовались выраженным уровнем десинхронизации ЭЭГ в правом центральном отведении, свидетельствующего об активации сенсомоторной коры правого полушария, а также высокими значениями общей спектральной мощности модулирующей сердечного ритма и относительной мощности в диапазоне высоких частот (HF). У этих же курсантов были обнаружены самые многочисленны корреляционные связи между активностью сенсомоторной коры и BCP [3].

Наличие связей между когнитивными функциями и BCP отмечается и в ряде работ других авторов. Так, сниженные значения BCP (SDNN и pNN 50%) связываются с уменьшением эффективности процессов рабочей памяти и внимания, а также с замедлением времени реакции в психомоторных тестах и снижением эффективности их выполнения [4–6]. Напротив, увеличение значений временных характеристик BCP – SDNN и RMSSD с одновременным уменьшением QTVI (QT – variability index) коррелировало с результативностью выполнения психофизиологических проб (теппинг-теста, и др.) и сокращением времени психомоторных реакций [7].

Связь спектральных параметров BCP с механизмами долговременной памяти показана в рамках сомнологических исследований. Увеличение индекса HF в течение сна, по мнению авторов, отражает работу механизмов консолидации следов памяти и активацию ассоциативных процессов в мозге [8].

Изучение физиологических механизмов процессов восприятия, рабочей памяти, внимания, принятия решения, распознавания значимых и незначимых сигналов при решении сенсомоторных задач с помощью метода когнитивных вызванных потенциалов позволило установить множественные связи между индексами BCP (rMSSD, pNN 50%, HF), временными и амплитудными характеристиками волны P300. Авторы делают вывод о высокой чувствительности метода анализа BCP в оценке когнитивных функций и функционального состояния [9].

Обнаружено влияние психоэмоционального состояния на когнитивные функции, активность коры и BCP. Так, у военнослужащих при моделировании боевых действий наблюдаются существенные изменения показателей внимания, памяти, принятия решений, тревожности, биохимических показателей крови (глюкозы) и уровня ее оксигенации, температуры тела, активации коры, происходящие вместе с возрастанием относительной мощности низкочастотных колебаний (LF) и снижением относительной мощности в диапазоне высоких частот (HF). Исследователи утверждают, что психоэмоциональное напряжение в условиях моделирования боевых действий вызывает выраженный психофизиологический ответ организма на стресс, обуславливающий селективные нарушения памяти, характер которых зависит от силы и интенсивности витальной угрозы [10].

Отметим, что оценка эффективности когнитивных функций в большинстве имеющихся в литературе работ, происходит с помощью психомоторных тестов и психофизиологических проб, в основе которых лежит анализ времени реакций на стимулы разной модальности. Возможно, именно поэтому в наших исследованиях наиболее выраженные взаимосвязи отмечаются между BCP и биоэлектрической активностью сенсомоторной и лобной коры, ответственных за обеспечение сенсомоторной интеграции, принятие решений и высшие интегративные функции мозга.

Несмотря на имеющиеся в литературе сведения, касающиеся изучения взаимосвязей между электрофизиологическими проявлениями когнитивных функций и

ВСП, данные, полученные разными авторами, нередко трудно сопоставимы между собой. С одной стороны, это происходит из-за того, что авторы в своих исследованиях по-разному определяют частотные диапазоны периодических модуляций сердечного ритма [11–15]. С другой стороны, большая часть работ выполнена авторами с опорой на традиционно выделяемые частотные диапазоны модуляций сердечного ритма (VLF 0.0033–0.04 Гц; LF 0.04–0.15 Гц; HF 0.15–0.40 Гц), что затрудняет определение более узкого частотного диапазона, непосредственно связанного с когнитивной деятельностью. Некоторые авторы подчеркивают наличие малого числа исследований, посвященных поиску точных физиологических доказательств существования неперекрывающихся частотных зон колебаний сердечного ритма и четких границ между ними [16].

С учетом всего вышеизложенного мы вправе предположить, что периодические модуляции сердечного ритма на более коротких отрезках спектрального диапазона могут быть связаны с активностью сенсомоторной коры при когнитивной нагрузке.

Цель исследования: определить связи периодических модуляций сердечного ритма с уровнем активности сенсомоторной коры в процессе когнитивной деятельности.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объем выборки составил 42 курсанта первого курса Военного института (военно-морского) Военного учебно-научного центра Военно-морского флота “Военно-морская академия”. Средний возраст обследуемых –  $18.0 \pm 0.7$  лет. Все испытуемые были праворукими.

Регистрация электроэнцефалографических и электрокардиографических параметров происходила одновременно с предъявлением тестовых задач, требующих для их решения задействование когнитивных функций восприятия, селективного внимания, рабочей памяти, пространственной ориентации, принятия решения и мышления.

Критериями включения в выборку психофизиологического обследования являлись: добровольное согласие на проведение исследования, положительная субъективная оценка самочувствия и качества сна, отсутствие противопоказаний к прохождению обследования по причине заболеваний, объективная положительная оценка текущего нервно-психического состояния, полученная с помощью Теста цветовых выборов Люшера по показателям вегетативного коэффициента и суммарного отклонения от аутогенной нормы.

Для проведения психофизиологического исследования использовался аппаратный комплекс объективного психологического анализа и тестирования “Реакор” с частотой дискретизации – 250 Гц (производитель Медиком МТД, г. Таганрог). Регистрация электроэнцефалографических и электрокардиографических показателей с одновременным предъявлением психофизиологических тестов производилась с каждым испытуемым индивидуально в течение 40–45 мин.

Каждому обследуемому предъявлялось восемь серий функциональных проб (ФП) в следующей последовательности:

1. в состоянии покоя с закрытыми глазами (фон);
2. в состоянии покоя с открытыми глазами;
3. в период выполнения теста “Красно-черные таблицы Шульце–Платонова” ( $7 \times 7$  ячеек);
4. во время выполнения теста “Часы с поворотом”;
5. в момент выполнения теста “Реакция на движущийся объект” (РДО);
6. при предъявлении задачи “Устный счет” при закрытых глазах;
7. в состоянии покоя с открытыми глазами после когнитивных функциональных проб (КФП);
8. в состоянии покоя с закрытыми глазами после КФП.

Время регистрации электрофизиологических параметров в каждой серии – 5 мин.

Методика “Красно-черные таблицы Шульте–Платонова” использовалась в качестве когнитивной нагрузки, требующей задействования свойств переключения и распределения внимания; методика “Часы с поворотом” служила для активации функции восприятия пространственных признаков и пространственной ориентации; методика РДО использовалась для изучения восприятия изменений пространственно-временных событий; методика “Устный счет” при закрытых глазах предназначалась для оценки быстроты мыслительных процессов при выполнении простых арифметических действий. Для решения данной задачи задействовались вербально-логическое мышление, оперативная память, внимание, проявлялись способности к выполнению числовых операций и счетные навыки. Выполнение устного счета при закрытых глазах предполагает значительную когнитивную нагрузку и при этом максимально минимизирует влияние электроокулографических артефактов при одновременной регистрации электроэнцефалографических параметров.

Биоэлектрическая активность головного мозга регистрировалась в левом и правом центральных отведениях (С3 и С4), расположенных по стандартной системе 10–20 в симметричных точках правого и левого полушария. Выбор таких отведений обусловлен спецификой функций сенсомоторной коры мозга, где происходят процессы сенсомоторной интеграции, а также регистрируются электрические потенциалы с минимальным количеством артефактов, возникающих в ходе выполнения КФП [17].

Референтные электроды (А1, А2) располагались в области сосцевидных отростков. Величина импеданса не превышала 10 кОм. Полученные записи были обработаны полосовым фильтром 0.5–35.0 Гц. Оценка уровня биоэлектрической активности сенсомоторной коры головного мозга проводилась по уровню десинхронизации ЭЭГ по каждому отведению, которая заключается в увеличении частоты и уменьшении амплитуды основных ритмов и свидетельствует о возрастании функциональной активности коры и подкорковых образований головного мозга.

Вначале определялись абсолютные значения мощностей (АЗМ) по основным зонам спектра ЭЭГ в каждом из отведений ( $\text{мкВ}^2$ ). Для этого каждый пятиминутный участок электроэнцефалограммы был разделен на сегменты длительностью в одну секунду, что позволило проанализировать около 300 эпох и провести спектральный анализ ЭЭГ на основе преобразования Фурье. Далее выполнялась z-стандартизация показателей АЗМ, полученных данных по формуле:  $z = x - x_c / \sigma$ , где  $z$  – стандартизованное значение АЗМ;  $x$  – значение АЗМ;  $x_c$  – среднее арифметическое АЗМ по всей выборке испытуемых;  $\sigma$  – стандартное отклонение по всей выборке испытуемых. Способ оценки уровня десинхронизации ЭЭГ состоял в том, что для каждого отведения определяли диапазон, в котором стандартизованное значение АЗМ максимально. В соответствии со шкалой от 1 до 6 баллов определялся уровень десинхронизации ЭЭГ в каждом из отведений. Уровень десинхронизации в 1 балл соответствовал преобладанию стандартизованного значения мощности ЭЭГ в дельта-1-диапазоне (0.50–2.0 Гц), 2 балла соответствовали дельта-2-диапазону (2.0–4.0 Гц), 3 балла – тета-диапазону (4.0–8.0 Гц), 4 балла – альфа-диапазону (8.0–13.0 Гц), 5 баллов – бета-1-диапазону (13.0–24.0 Гц), 6 баллов соответствовали частотной полосе бета-2 (24.0–35.0 Гц). Таким образом, был применен интегральный подход к оценке суммарного уровня биоэлектрической активности мозга, основанный на определении уровня десинхронизации ЭЭГ, который успешно использовался нами и в предыдущих исследованиях [1–3, 18, 19].

Сердечный ритм регистрировался электрокардиографически. Электроды для записи электрокардиограммы (ЭКГ) располагались на запястье левой руки и нижней трети шеи слева и впереди от грудино-ключично-сосцевидной мышцы.

С помощью программного обеспечения аппаратного комплекса “Реакор” на ЭЭГ были выявлены и вручную удалены выраженные глазодвигательные и мышечные ар-

тефакты. Для подавления оставшихся электрокардиографических, миографических и окулографических артефактов при выполнении когнитивных задач использовались такие функции программного обеспечения как сглаживание и интерполяция выбросов и ошибочных данных. Участки записи ЭКГ, на которых выявлены нарушения ритма и проводимости были исключены из анализа. Из оставшихся участков для каждого испытуемого выделен непрерывный ряд, состоящий из 300 RR-интервалов. Анализ ВСП заключался в частотном анализе этих рядов. С помощью численного преобразования Фурье получена периодограмма сердечного ритма. Определены 150 ( $N/2 = 300/2 = 150$ ) гармоник колебаний RR-интервалов в диапазоне частот от 0 до 0.5 колебаний на кардиоинтервал (кол/ки) и с шагом в  $1/300$  кол/ки. Таким образом, были получены амплитуды периодических модуляций сердечного ритма на определенных частотах, показывающие насколько секунд замедлялся или, наоборот, ускорялся сердечный ритм за соответствующий период.

Для установления взаимосвязей между параметрами ВСП и уровнями десинхронизации ЭЭГ для каждой серии ФП проводился корреляционный анализ Спирмена. Оценка положительных и отрицательных корреляций между показателями ВСП и ЭЭГ позволила определить прямые и обратные функциональные связи между сенсомоторной корой, отвечающей за осуществление сенсомоторной интеграции стимулов при решении когнитивных задач и деятельностью сердечно-сосудистой системы, непосредственно реализующей адаптационные реакции организма. Критериями статистической значимости результатов были: коэффициент корреляции  $r_s$  с соответствующим значением уровня достоверности ( $p \leq 0.05$ ;  $p \leq 0.01$ ;  $p \leq 0.001$ ), построение скаттерограмм для визуального анализа репрезентативности корреляционных связей.

Далее параметры ЭЭГ и ВСП, продемонстрировавшие тесные корреляционные связи на уровне значимости  $p \leq 0.01$  и  $p \leq 0.001$ , после предварительной z-стандартизации, включались в факторный анализ. Для обоснования методологического приема оценки адекватности примененного нами анализа ряда последовательных значений коэффициентов корреляции и выявления наиболее значимых связей проводился эксплораторный факторный анализ методом главных компонент.

С целью уточнения результатов корреляционного анализа и определения параметров ВСП, обнаруживающих наиболее тесную связь с активностью сенсомоторной коры головного мозга в каждой ФП, был использован множественный регрессионный анализ с шаговым отбором наиболее значимых параметров ВСП, включенных в уравнение линейной множественной регрессии. Такие параметры ВСП представляли собой независимые переменные, влияющие на уровень десинхронизации ЭЭГ – зависимую переменную. Критериями включения параметров в уравнение была вероятность  $F \leq 0.05$ , а критерием исключения была вероятность  $F \geq 0.1$ . Рассчитывался коэффициент детерминации  $R^2$  для оценки доли объясненной дисперсии, а также критерий Фишера и уровень статистической значимости для подтверждения адекватности построенной регрессионной модели.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Обнаружены множественные взаимосвязи между амплитудами периодических модуляций сердечного ритма и уровнями десинхронизации ЭЭГ, зависящие от вида когнитивных задач.

Перед детальным рассмотрением обнаруженных связей целесообразно рассмотреть средние значения уровней десинхронизации ЭЭГ в левом и правом центральном отведении, а также величины амплитуд модуляций сердечного ритма во всех сериях исследования (табл. 1).

**Таблица 1.** Значения уровней десинхронизации ЭЭГ в отведениях С3 и С4 и амплитуд модуляций сердечного ритма в восьми сериях  
**Table 1.** The levels of EEG desynchronization in C3 and C4 leads and the amplitudes of modulations of the heart rate in 8<sup>th</sup> series

Серия/индекс Series/index	Длительность RR-интервалов, мс Duration of RR- intervals, ms	C3, $\alpha/\beta$ , у.е. C3, $\alpha/\beta$ , a.u.	C4, $\alpha/\beta$ , у.е. C4, $\alpha/\beta$ , a.u.	C3, баллы C3, points	C4, баллы C4, points	0.023 кол/ки 0.023 oscillation/cardio interval	0.103 кол/ки 0.103 oscillation/cardio interval	0.436 кол/ки 0.436 oscillation/cardio interval	0.053 кол/ки 0.053 oscillation/cardio interval	0.129 кол/ки 0.129 oscillation/cardio interval	0.486 кол/ки 0.486 oscillation/cardio interval
Фон "Глаза закрыты" Functional test with "Closed eyes"	872.40 ± ± 1.35	10.93 ± ± 1.21	9.98 ± ± 1.15	3.71 ± ± 0.26	3.60 ± ± 0.28	2609.19 ± ± 154.67	4557.92 ± ± 539.09	4576.75 ± ± 763.04	2936.38 ± ± 210.14	6075.29 ± ± 1056.64	5266.09 ± ± 735.61
ФП "Глаза открыты до КФП" Functional test with "Opened eyes" before psychophysiological tests	867.30 ± ± 1.31	5.16 ± ± 0.50	5.00 ± ± 0.55	3.60 ± ± 0.27	3.55 ± ± 0.28	2231.63 ± ± 184.55	5429.48 ± ± 699.97	5888.33 ± ± 864.85	3527.06 ± ± 440.35	5105.79 ± ± 529.97	5131.31 ± ± 779.61
КФП "Красно-черные таблицы Шульце-Платонова" Psychophysiological test – "Schulte's test"	821.64 ± ± 1.53	2.66 ± ± 0.11	2.70 ± ± 0.14	3.38 ± ± 0.27	3.76 ± ± 0.25	3609.58 ± ± 347.22	7334.07 ± ± 915.32	10160.25 ± ± 1992.89	4213.67 ± ± 307.29	8727.08 ± ± 1470.80	8560.45 ± ± 1681.87
КФП "Часы с поворотом" Psychophysiological test – "Clock with a turn"	838.79 ± ± 0.77	2.98 ± ± 0.13	2.95 ± ± 0.19	3.67 ± ± 0.26	3.71 ± ± 0.27	2670.97 ± ± 228.43	7140.37 ± ± 939.64	7178.59 ± ± 1374.11	3352.18 ± ± 231.04	8152.14 ± ± 1332.41	7865.22 ± ± 1648.01
КФП "Реакция на движущийся объект" Psychophysiological test – "Reaction to a moving object"	889.31 ± ± 1.31	3.42 ± ± 0.26	3.62 ± ± 0.30	3.69 ± ± 0.28	3.60 ± ± 0.28	2741.52 ± ± 182.35	5705.05 ± ± 786.03	10949.36 ± ± 2470.68	3046.76 ± ± 156.46	6092.11 ± ± 1022.01	8107.28 ± ± 1356.59

Таблица 1. Окончание

Серия/индекс Series/index	Длительность RR-интервалов, мс Duration of RR-intervals, ms	C3, $\alpha/\beta$ , у.е. C3, $\alpha/\beta$ , a.u.	C4, $\alpha/\beta$ , у.е. C4, $\alpha/\beta$ , a.u.	C3, баллы C3, points	C4, баллы C4, points	0.023 кол/ки 0.023 oscillation/cardio interval	0.103 кол/ки 0.103 oscillation/cardio interval	0.436 кол/ки 0.436 oscillation/cardio interval	0.053 кол/ки 0.053 oscillation/cardio interval	0.129 кол/ки 0.129 oscillation/cardio interval	0.486 кол/ки 0.486 oscillation/cardio interval
КФП “Устный счет” Psychophysiological test – “Mental arithmetic” with closed eyes	830.74 ± ± 1.16	8.63 ± ± 0.80	7.94 ± ± 0.82	3.76 ± ± 0.29	3.71 ± ± 0.27	2525.49 ± ± 242.26	7856.42 ± ± 1398.06	6001.66 ± ± 952.55	3035.32 ± ± 185.87	6446.10 ± ± 1087.40	5431.36 ± ± 752.69
ФП “Глаза открыты после КФП” Functional test with “Opened eyes” after psychophysiological tests	890.71 ± ± 1.35	4.98 ± ± 0.48	4.51 ± ± 0.47	3.64 ± ± 0.28	3.62 ± ± 0.26	2465.36 ± ± 214.70	5234.92 ± ± 525.33	6147.66 ± ± 958.29	3514.58 ± ± 309.92	7146.45 ± ± 1159.91	7019.65 ± ± 1171.47
ФП “Глаза закрыты после КФП” Functional test with “Closed eyes” after psychophysiological tests	906.88 ± ± 1.37	10.27 ± ± 1.14	9.65 ± ± 1.09	3.38 ± ± 0.28	3.62 ± ± 0.28	2096.61 ± ± 139.30	5903.67 ± ± 608.93	7124.97 ± ± 1274.80	2908.09 ± ± 212.07	6240.00 ± ± 1059.55	6078.57 ± ± 985.00

В таблице представлены средние значения и стандартные ошибки средних значений изучаемых показателей в 8-ми сериях исследования; цветом в одной строке, парами, выделены показатели, продемонстрировавшие наиболее тесные корреляционные связи.  
In the table are presented the mean values and standard errors of mean values in 8 series of research; the correlations locates in colored steams of cells in one line of the table.

Из табл.1 видно, что самый высокий уровень десинхронизации ЭЭГ отмечался при решении арифметических задач в отведении C3 ( $3.76 \pm 0.29$ ), а также при выполнении теста “Красно-черные таблицы Шульте–Платонова” в отведении C4 ( $3.76 \pm 0.25$ ). Цветом по строкам выделены пары показателей уровня десинхронизации ЭЭГ и амплитуд модуляций сердечного ритма на определенных частотах, продемонстрировавших наиболее тесные связи. Отметим, что при выполнении ФП с закрытыми и открытыми глазами до и после КФП длительность RR-интервалов была больше, чем при решении когнитивных задач. Самые низкие значения длительностей RR-интервалов отмечались в КФП “Красно-черные таблицы Шульте–Платонова” и “Устный счет”, это может являться свидетельством того, что данные тесты являлись для обследуемых наиболее энергозатратными.

Подтверждением этого служит также и то, что при решении арифметических задач у большинства курсантов (26.2%) наблюдался максимальный уровень десинхронизации ЭЭГ в левом центральном отведении (табл. 2). Необходимо отметить, что максимальный уровень десинхронизации ЭЭГ в 6 баллов, в рамках предложенного нами метода, означает то, что бета-2 диапазон несколько более выражен, а более низкочастотные диапазоны ослаблены по сравнению со средним уровнем десинхронизации в этих диапазонах. Таким образом, значения уровней

**Таблица 2.** Количество курсантов (%) с преобладанием того или иного уровня десинхронизации ЭЭГ в отведениях С3 и С4 в восьми сериях**Table 2.** Sampling fraction (%) of cadets with various levels of EEG desynchronization in C3 and C4 leads in 8<sup>th</sup> series

Уровень десинхронизации ЭЭГ, баллы Levels of EEG desynchronization, points	Фон "Глаза закрыты" Functional test with "Closed eyes"		ФП "Глаза открыты до КФП" Functional test with "Opened eyes" before psychophysiological tests		КФП "Красно-черные таблицы Шульце–Платонова" Psychophysiological test – "Schulte's test"		КФП "Часы с поворотом" Psychophysiological test – "Clock with a turn"		КФП "Реакция на движущийся объект" Psychophysiological test – "Reaction to a moving object"		КФП "Устный счет" Psychophysiological test – "Mental arithmetic" with closed eyes		ФП "Глаза открыты после КФП" Functional test with "Opened eyes" after psychophysiological tests		ФП "Глаза закрыты после КФП" Functional test with "Closed eyes" after psychophysiological tests	
	С3	С4	С3	С4	С3	С4	С3	С4	С3	С4	С3	С4	С3	С4	С3	С4
1	9.5	16.7	19.0	19.0	19.0	14.3	9.5	14.3	14.3	16.7	16.7	16.7	19.0	16.7	<b>21.4</b>	19.0
2	21.4	19.0	11.9	14.3	19.0	7.1	19.0	14.3	16.7	16.7	16.7	11.9	14.3	14.3	19.0	14.3
3	16.7	11.9	11.9	11.9	14.3	<b>21.4</b>	19.0	14.3	14.3	14.3	7.1	11.9	9.5	9.5	9.5	9.5
4	16.7	16.7	<b>23.8</b>	<b>21.4</b>	14.3	<b>21.4</b>	<b>23.8</b>	<b>21.4</b>	21.4	16.7	19.0	19.0	19.0	<b>26.2</b>	19.0	<b>21.4</b>
5	11.9	11.9	14.3	14.3	<b>19.0</b>	16.7	4.8	14.3	7.1	14.3	14.3	<b>23.8</b>	16.7	16.7	11.9	14.3
6	<b>23.8</b>	<b>23.8</b>	19.0	19.0	14.3	19.0	<b>23.8</b>	<b>21.4</b>	<b>26.2</b>	<b>21.4</b>	<b>26.2</b>	16.7	<b>21.4</b>	16.7	19.0	<b>21.4</b>

Жирным шрифтом выделены максимальные значения долей курсантов (%) с преобладанием того или иного уровня десинхронизации ЭЭГ.

The maximum sampling fraction (%) of cadets with various levels of EEG desynchronization allocates in cells with extra bold.

десинхронизации ЭЭГ нельзя интерпретировать так же, как и значения спектральной мощности. Это утверждение подтверждается в ходе рассмотрения динамики индексов  $\alpha/\beta$ , рассчитанных по показателям абсолютных спектральных мощностей, в разных сериях исследования. Из табл. 1 видно, что индексы  $\alpha/\beta$  максимальны в сериях до и после КФП при закрытых глазах, что полностью согласуется с известным феноменом усиления альфа-активности при проведении этой ФП. Напротив, при проведении КФП, происходит усиление спектральной мощности в бета-диапазоне.

Далее рассмотрим связи между уровнями десинхронизации ЭЭГ и периодическими модуляциями сердечного ритма на различных частотах подробнее, обратившись к результатам корреляционного анализа.

Так, количество корреляций установленных в условиях разных ФП существенно различается. Самое большое количество корреляционных связей отмечается в серии "Часы с поворотом" (25 шт.) (табл. 3).

Минимальное число связей определено при выполнении КФП "Красно-черные таблицы Шульце–Платонова" (1 шт.), а также в ходе регистрации фоновых показателей до предъявления КФП (3 шт.).

Количество статистически значимых корреляций в функциональных пробах с открытыми (8 шт.) и закрытыми глазами (9 шт.) после КФП меньше, чем в КФП "Часы с поворотом" (25 шт.) и "Устный счет" (13 шт.) (табл. 4).

Можно предположить, что при когнитивной нагрузке в виде необходимости решения пространственных и арифметических задач отношения между показате-

**Таблица 3.** Корреляции между частотой модуляций сердечного ритма (кол/ки) и уровнем десинхронизации ЭЭГ в отведениях С3 или С4 в разных ФП**Table 3.** Correlations between frequencies of the heart rhythm modulations (oscillation/cardio interval) and levels of EEG desynchronization in C3 and C4 leads in various functional tests

Число корреляций Number of correlations	Коррелирующие параметры Correlations	$r_s$	$p$
Фон “Глаза закрыты” Functional test with “Closed eyes”			
1	0.023 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	-0.33	0.03
2	0.026 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	-0.32	0.04
3	0.469 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C4	0.33	0.03
КФП “Красно-черные таблицы Шульте–Платонова” Psychophysiological test – “Schulte’s test”			
1	0.103 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C4	-0.34	0.03
КФП “Часы с поворотом” Psychophysiological test – “Clock with a turn”			
1	0.093 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	-0.34	0.03
2	0.096 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	-0.34	0.03
3	0.123 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	-0.33	0.03
4	0.126 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	-0.32	0.04
5	0.15 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	-0.33	0.03
6	0.23 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	-0.34	0.03
7	0.233 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	-0.33	0.03
8	0.236 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	-0.32	0.04
9	0.266 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	-0.31	0.04
10	0.36 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	-0.32	0.04
11	0.363 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	-0.33	0.03
12	0,383 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	-0.33	0.03
13	0.386 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	-0.32	0.04
14	0.389 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	-0.31	0.04
15	0.426 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	-0.37	0.02
16	<b>0.43 кол/ки (oscillation/cardio interval) &amp; C3</b>	<b>-0.39</b>	<b>0.01</b>
17	<b>0.433 кол/ки (oscillation/cardio interval) &amp; C3</b>	<b>-0.47</b>	<b>0.002</b>
18	<b>0.436 кол/ки (oscillation/cardio interval) &amp; C3</b>	<b>-0.49</b>	<b>0.001</b>
19	<b>0.439 кол/ки (oscillation/cardio interval) &amp; C3</b>	<b>-0.46</b>	<b>0.002</b>
20	<b>0.443 кол/ки (oscillation/cardio interval) &amp; C3</b>	<b>-0.42</b>	<b>0.01</b>
21	<b>0.446 кол/ки (oscillation/cardio interval) &amp; C3</b>	<b>-0.38</b>	<b>0.01</b>
22	0.453 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	-0.31	0.04
23	0.456 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	-0.31	0.04
24	0.463 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	-0.33	0.03
25	0.476 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	-0.31	0.04

Таблица 3. Окончание

Число корреляций Number of correlations	Коррелирующие параметры Correlations	$r_s$	$p$
КФП “Реакция на движущийся объект” Psychophysiological test – “Reaction to a moving object”			
1	<b>0.043 кол/ки (oscillation/cardio interval) &amp; C3</b>	<b>-0.37</b>	<b>0.02</b>
2	<b>0.046 кол/ки (oscillation/cardio interval) &amp; C3</b>	<b>-0.37</b>	<b>0.02</b>
3	<b>0.05 кол/ки (oscillation/cardio interval) &amp; C3</b>	<b>-0.4</b>	<b>0.01</b>
4	<b>0.053 кол/ки (oscillation/cardio interval) &amp; C3</b>	<b>-0.42</b>	<b>0.01</b>
5	<b>0.056 кол/ки (oscillation/cardio interval) &amp; C3</b>	<b>-0.32</b>	<b>0.04</b>
6	0.353 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	-0.31	0.05
7	0.36 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	-0.33	0.03
8	0.4 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	-0.32	0.04

лями ВСП и активностью сенсомоторной коры головного мозга становятся более выраженными в сравнении с этими отношениями в состоянии относительного покоя.

Установлено, что вид когнитивной задачи по-разному влияет на характер корреляционных связей между параметрами ВСП и уровнями десинхронизации ЭЭГ в правом и левом центральных отведениях.

Из табл. 1 и 2 видно, что в КФП “Часы с поворотом” и “РДО” значения амплитуд периодических модуляций сердечного ритма коррелируют с уровнями десинхронизации ЭЭГ, зарегистрированных только в левом центральном отведении. В ходе КФП “Устный счет” при закрытых глазах статистически значимые корреляции отмечаются между амплитудами модуляций ритма сердца и уровнями десинхронизации ЭЭГ в обоих центральных отведениях.

Следовательно, задачи на пространственную ориентацию с необходимостью слежения за изменениями пространственно-временных событий требуют в большей степени активации морфофункциональных связей параметров ВСП с сенсомоторной корой левого полушария. В тоже время решение арифметических задач сопровождается расширением спектра связей, вероятно, отражающих взаимно модулирующее воздействия ритма сердца на активность сенсомоторной коры обоих полушарий. Это подтверждает то, что решение математических задач является более сложной и энергозатратной КФП, требующей использование всех интегративных функции мозга, включая активацию вегетативной нервной системы. Высокая сложность данной КФП подтверждена опросом курсантов после завершения обследования.

Необходимо отметить, что наибольшее число сильных корреляционных связей ( $r_s \leq -0.31$ ) наблюдается между параметрами амплитуд модуляций сердечного ритма и уровнями десинхронизации ЭЭГ в левом центральном отведении.

Так, в серии “Часы с поворотом” наиболее тесная отрицательная связь обнаружена между уровнем десинхронизации ЭЭГ в левом центральном отведении и значениями амплитуд периодических модуляций сердечного ритма на частотах 0.430–0.446 кол/ки (рис. 1).

При выполнении КФП “РДО” наиболее сильные отрицательные корреляции показателей ВСП с уровнем десинхронизации ЭЭГ в том же отведении наблюдаются на частотах близких к 0.05 кол/ки (0.043–0.056 кол/ки) (рис. 2).

**Таблица 4.** Корреляции между частотой модуляций сердечного ритма (кол/ки) и уровнем десинхронизации ЭЭГ в отведениях С3 или С4 в разных ФП (продолжение)**Table 4.** Correlations between frequencies of the heart rhythm modulations (oscillation/cardio interval) and levels of EEG desynchronization in C3 and C4 leads in various functional tests (continuation)

Число корреляций Number of correlations	Коррелирующие параметры Correlations	$r_s$	$p$
<b>КФП “Устный счет”</b> Psychophysiological test – “Mental arithmetic”			
1	0.003 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C4	–0.35	0.02
2	0.006 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C4	–0.34	0.03
3	0.039 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C4	–0.32	0.04
4	0.043 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C4	–0.32	0.04
5	0.05 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C4	–0.32	0.04
6	0.073 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	–0.35	0.02
7	0.076 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	–0.31	0.05
8	0.079 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	–0.31	0.04
9	0.083 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	–0.32	0.04
10	<b>0.126 кол/ки (oscillation/cardio interval) &amp; C3</b>	<b>–0.35</b>	<b>0.02</b>
11	<b>0.129 кол/ки (oscillation/cardio interval) &amp; C3</b>	<b>–0.41</b>	<b>0.01</b>
12	<b>0.133 кол/ки (oscillation/cardio interval) &amp; C3</b>	<b>–0.34</b>	<b>0.03</b>
13	<b>0.136 кол/ки (oscillation/cardio interval) &amp; C3</b>	<b>–0.35</b>	<b>0.02</b>
<b>ФП “Глаза открыты после КФП”</b> Functional test with “Opened eyes” after psychophysiological tests			
1	0.093 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	–0.31	0.04
2	0.096 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	–0.36	0.02
3	0.096 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C4	–0.36	0.02
4	0.1 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	–0.32	0.04
5	0.103 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C4	–0.37	0.02
6	0.176 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	–0.31	0.04
7	0.18 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	–0.33	0.03
8	0.203 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C4	–0.31	0.05
<b>ФП “Глаза закрыты после КФП”</b> Functional test with “Closed eyes” after psychophysiological tests			
1	0.1 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C4	–0.32	0.04
2	0.103 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C4	–0.31	0.05
3	0.37 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	–0.32	0.04
4	0.373 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	–0.34	0.03
5	0.483 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C4	–0.32	0.04
6	0.486 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C3	–0.32	0.04
7	0.486 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C4	–0.36	0.02
8	0.49 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C4	–0.34	0.03
9	0.493 кол/ки (oscillation/cardio interval) & C4	–0.31	0.04



**Рис. 1.** Связь периодограммы сердечного ритма на различных частотах (колебаний на кардиоинтервал) с уровнем десинхронизации ЭЭГ в левом центральном отведении при выполнении КФП “Часы с поворотом”. Штриховая линия – уровень достоверности корреляции больше 95%.

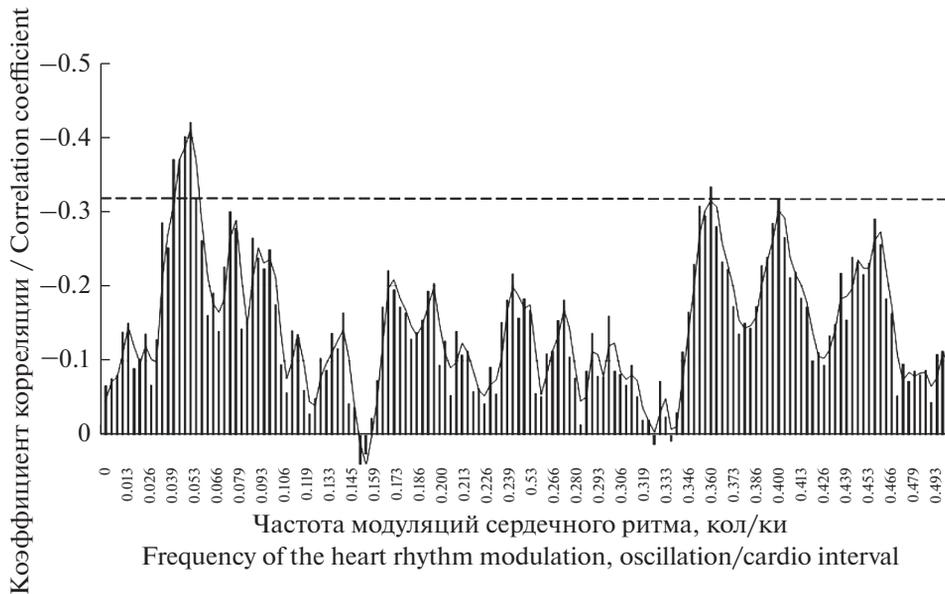
**Fig. 1.** Correlations between periodogram of heart rhythm on various frequencies (oscillation/cardio interval) and levels of EEG desynchronization in the left central lead in the psychophysiological test – “Clock with a turn”. The note: the dashed line - the level of significance of correlation is more than 95%.

В ходе решения арифметических задач были обнаружены наиболее тесные отрицательные корреляционные связи уровня десинхронизации ЭЭГ в левом центральном отведении с периодическими модуляциями ритма сердца с максимум значения коэффициента корреляции на частоте 0.13 кол/ки (0.126–0.136 кол/ки) (рис. 3).

Таким образом, результаты корреляционного анализа демонстрируют то, что характер взаимосвязей показателей ВСП с уровнем десинхронизации ЭЭГ в левом центральном отведении зависит от вида решаемых когнитивных задач. Можно предположить, что чем выше уровень активности сенсомоторной коры левого полушария, тем ниже значения амплитуд модуляций сердечного ритма. Так, при решении сенсомоторных задач РДО максимумы отрицательных значений  $r_s$  отмечаются в частотной зоне около 0.05 кол/ки, при выполнении арифметических задач – на частоте около 0.13 кол/ки, а в ходе выполнения задач на пространственную ориентацию – на частоте около 0.45 кол/ки.

Отметим, что данные значения являются последовательным рядом коэффициентов корреляции  $r_s$ , образующего волну последовательного их увеличения и уменьшения при переходе от частоты к частоте. Анализ амплитуд волны, представляющей собой ряд значений  $r_s$ , в отличие от оценки отдельного коэффициента корреляции является более надежным и наглядно исключает случайные “выскакивающие” значения этого показателя.

Результаты корреляционного анализа подтверждались данными факторного анализа, в который были включены параметры ВСП и ЭЭГ, имеющие наиболее



**Рис. 2.** Связь периодограммы сердечного ритма на различных частотах (колебаний на кардиоинтервал) с уровнем десинхронизации ЭЭГ в левом центральном отведении при выполнении КФП “РДО”. Штриховая линия – уровень достоверности корреляции больше 95%.

**Fig. 2.** Correlations between periodogram of heart rhythm on various frequencies (oscillation/cardio interval) and levels of EEG desynchronization in the left central lead in the psychophysiological test – “Reaction to a moving object”. The note: the dashed line – the level of significance of correlation is more than 95%.

тесные корреляционные связи, а последовательные значения полученных  $r_s$  образуют плавную волну линии тренда на графиках связей периодограммы сердечного ритма на различных частотах с уровнем десинхронизации ЭЭГ в левом центральном отведении в разных КФП.

Показана двухфакторная структура изучаемых параметров (критерий выборочной адекватности Кайзера–Мейера–Олкина равен 0.72, а критерий сферичности Бартлетта меньше 0.0001). Во второй фактор с максимальным весом вошли амплитуда периодических модуляций сердечного ритма на частотах 0.046; 0.05; 0.053 и 0.056 кол/ки, а также уровень десинхронизации ЭЭГ в левом центральном отведении при выполнении серии “РДО” (табл. 5).

Анализ знаков факторных нагрузок позволяет сделать заключение о том, что чем больше уровень активности сенсомоторной коры левого полушария при решении сенсомоторных задач на восприятие изменений пространственно-временных событий, тем меньше амплитуда модуляций сердечного ритма в частотной зоне 0.05 кол/ки.

Результаты факторного анализа наглядно демонстрируют адекватность примененного нами анализа ряда последовательных значений коэффициентов корреляции. Также отметим, что методика РДО основана на расчетах скоростных и временных показателей сенсомоторных реакций и в наибольшей степени соответствует изучению функций сенсомоторной коры. Математическое подтверждение этого соответствия мы также видим при рассмотрении результатов факторного анализа.

Регрессионный анализ в целом подтвердил результаты корреляционного анализа, и позволил выделить наиболее важные показатели ВСР, связанные с уровнями



**Рис. 3.** Связь периодограммы сердечного ритма на различных частотах (колебаний на кардиоинтервал) с уровнем десинхронизации ЭЭГ в левом центральном отведении при выполнении КФП “Устный счет”. Штриховая линия – уровень достоверности корреляции больше 95%.

**Fig. 3.** Correlations between periodogram of heart rhythm on various frequencies (oscillation/cardio interval) and levels of EEG desynchronization in the left central lead in the psychophysiological test – “Mental arithmetic”. The note: the dashed line - the level of significance of correlation is more than 95%.

десинхронизации ЭЭГ. Из табл. 6 видно, что в фоновой серии уровень активности сенсомоторной коры левого полушария связан с показателями амплитуд периодических модуляций сердечного ритма на частотах близких к 0.02 и 0.3 кол/ки, что подтверждается результатами корреляционного анализа.

Отметим, что в серии “Глаза открыты после КФП” значения периодических модуляций сердечного ритма на частотах 0.1 и 0.5 кол/ки связаны с уровнем десинхронизации ЭЭГ в правом центральном отведении, что отражает взаимосвязь активности сенсомоторной коры правого полушария с изучаемыми параметрами ВСР.

Можно предположить, что состояние, предшествующее когнитивной нагрузке отражает мобилизацию ресурсов ЦНС и готовность к выполнению когнитивных задач, и сопровождается интеграцией связей между сенсомоторной корой левого полушария, ВНС, автономными и гуморально-метаболическими механизмами регуляции сердечной деятельности. Напротив, состояние после завершения когнитивной нагрузки характеризовалось усилением связей между деятельностью сердечно-сосудистой системы, проявляющейся в показателях ВСР, и активностью сенсомоторной коры правого полушария. Это согласуется с работами, в которых показано, что при понижении активности коры правого полушария наблюдается снижение активности симпатического отдела вегетативной нервной системы, частоты сердечных сокращений, артериального давления, при этом показатель HF увеличивался. Между тем, при снижении активности левого полушария происходит уменьшение активности парасимпатического отдела вегетативной нервной си-

**Таблица 5.** Факторная структура связей параметров ВСР и уровней десинхронизации ЭЭГ в отведениях С3 и С4**Table 5.** Factor structure of correlations between parameters of heart rate variability and levels of EEG desynchronization in C3 and C4 leads

Показатели Indexes	Фактор Factor	
	1	2
0.133 кол/ки в КФП “Устный счет” 0.133 oscillation/cardio interval in psychophysiological test – “Mental arithmetic”	0.92	0.09
0.129 кол/ки в КФП “Устный счет” 0.129 oscillation/cardio interval in psychophysiological test – “Mental arithmetic”	0.91	0.09
0.136 кол/ки в КФП “Устный счет” 0.136 oscillation / cardio interval in psychophysiological test – “Mental arithmetic”	0.90	0.09
0.126 кол/ки в КФП “Устный счет” 0.126 oscillation / cardio interval in psychophysiological test – “Mental arithmetic”	0.89	0.22
0.436 кол/ки в КФП “Часы с поворотом” 0.436 oscillation/cardio interval in psychophysiological test – “Clock with a turn”	0.74	0.40
0.439 кол/ки в КФП “Часы с поворотом” 0.439 oscillation/cardio interval in psychophysiological test – “Clock with a turn”	0.74	0.39
0.443 кол/ки в КФП “Часы с поворотом” 0.443 oscillation/cardio interval in psychophysiological test – “Clock with a turn”	0.73	0.39
0.433 кол/ки в КФП “Часы с поворотом” 0.433 oscillation/cardio interval in psychophysiological test – “Clock with a turn”	0.59	0.48
С3 в КФП “Устный счет” С3 in psychophysiological test – “Mental arithmetic”	-0.20	0.06
<b>0.05 кол/ки в КФП “РДО”</b> <b>0.05 oscillation/cardio interval in psychophysiological test – “Reaction to a moving object”</b>	<b>0.07</b>	<b>0.93</b>
<b>0.053 кол/ки в КФП “РДО”</b> <b>0.053 oscillation/cardio interval in psychophysiological test – “Reaction to a moving object”</b>	<b>0.12</b>	<b>0.90</b>
<b>0.046 кол/ки в КФП “РДО”</b> <b>0.046 oscillation/cardio interval in psychophysiological test – “Reaction to a moving object”</b>	<b>0.21</b>	<b>0.87</b>
<b>0.056 кол/ки в КФП “РДО”</b> <b>0.056 oscillation/cardio interval in psychophysiological test – “Reaction to a moving object”</b>	<b>0.22</b>	<b>0.82</b>
<b>С3 в КФП “РДО”</b> <b>С3 in psychophysiological test – “Reaction to a moving object”</b>	<b>0.02</b>	<b>-0.51</b>
С3 в КФП “Часы с поворотом” С3 in psychophysiological test – “Clock with a turn”	-0.14	-0.31

**Таблица 6.** Результаты множественного регрессионного анализа  
**Table 6.** Results of the multiple regression analysis

Функциональная проба Functional test	Уравнение линейной множественной регрессии/бета-коэффициенты ( $\beta$ ) Equation of the multiple linear regression/beta coefficients ( $\beta$ )	$R^2$	$F$	$p$
Фон “Глаза закрыты” Functional test with “Closed eyes”	$C3 = 5.844 - 0.001 \times F_{0.023} + 0.000061 \times F_{0.273}$ ; $\beta(F_{0.023}) = -0.61$ ; $\beta(F_{0.273}) = 0.47$	0.25	6.6	0.003
КФП “Красно-черные таблицы Шульте–Платонова” Psychophysiological test – “Schulte’s test”	$C3 = 3.394 + 0.000099 \times F_{0.43} - 0.000136 \times F_{0.113}$ ; $\beta(F_{0.43}) = 0.8$ ; $\beta(F_{0.113}) = -0.55$	0.36	11.1	0.0001
КФП “Часы с поворотом” Psychophysiological test – “Clock with a turn”	$C3 = 4.676 - 0.000132 \times F_{0.093} + 0.000166 \times F_{0.196} - 0.000102 \times F_{0.443} - 0.000091 \times F_{0.239}$ ; $\beta(F_{0.093}) = -0.36$ ; $\beta(F_{0.196}) = 1.59$ ; $\beta(F_{0.443}) = -0.66$ ; $\beta(F_{0.239}) = -0.86$	0.45	7.4	0.0001
КФП “Реакция на движущийся объект” Psychophysiological test – “Reaction to a moving object”	$C3 = 6.356 - 0.002 \times F_{0.053} + 0.000057 \times F_{0.323} + 0.000704 \times F_{0.059} - 0.000051 \times F_{0.3}$ ; $\beta(F_{0.053}) = -0.96$ ; $\beta(F_{0.323}) = 0.48$ ; $\beta(F_{0.059}) = 0.64$ ; $\beta(F_{0.3}) = -0.33$	0.45	7.5	0.0001
КФП “Устный счет” Psychophysiological test – “Mental arithmetic”	$C4 = 5.225 - 0.000505 \times F_{0.039} + 0.000124 \times F_{0.256} - 0.000276 \times F_{0.066}$ ; $\beta(F_{0.039}) = -0.37$ ; $\beta(F_{0.256}) = 0.64$ ; $\beta(F_{0.066}) = -0.47$	0.34	6.6	0.001
ФП “Глаза открыты после КФП” Functional test with “Opened eyes” after psychophysiological tests	$C4 = 4.514 - 0.00031 \times F_{0.103} + 0.000093 \times F_{0.496}$ ; $\beta(F_{0.103}) = -0.62$ ; $\beta(F_{0.496}) = 0.55$	0.31	8.8	0.001

$F$  – обозначение частоты периодических модуляций сердечного ритма.

$F$  – frequencies of periodic modulations of the heart rhythm.

стемы, сочетающегося с увеличением частоты сердечных сокращений, показателей LF и LF/HF [20–23].

Рассмотрим взаимосвязи периодических модуляций сердечного ритма с уровнями активности сенсомоторной коры при решении когнитивных задач более подробно.

В КФП “Красно-черные таблицы Шульте–Платонова” определены взаимосвязи между уровнем десинхронизации ЭЭГ в левом центральном отведении и периодическими модуляциями ритма сердца на частотах 0.1 и 0.4 кол/ки.

При выполнении задачи “Часы с поворотом” на уровень десинхронизации ЭЭГ в левом центральном отведении влияет амплитуда модуляций сердечного ритма на частотах около 0.09, 0.2 и 0.4 кол/ки.

В серии КФП “РДО” отмечены статистически значимые связи между уровнем десинхронизации ЭЭГ в левом центральном отведении и модуляциями сердечного ритма на частотах 0.05 и 0.3 кол/ки. Это частично подтверждается нашими ранними работами [1, 2]

Выполнение арифметических действий в серии “Устный счет” влияет на взаимосвязи между уровнями десинхронизации ЭЭГ в правом центральном отведении и модуляциями сердечного ритма на частотах около 0.05, а также 0.26 кол/ки. Это подтверждает результаты корреляционного анализа, показывающего участие активности сенсомоторной коры обоих полушарий во взаимоотношениях с ВСР.

Из этого следует, что связь амплитуды модуляций на частотах 0.3–0.4 кол/ки с уровнями активности сенсомоторной коры стабильно отмечается во всех функциональных и когнитивных пробах. Это подтверждают и результаты корреляционного анализа данных КФП “Часы с поворотом”, свидетельствующие о наличии связей между уровнями десинхронизации ЭЭГ в отведении С3 и амплитудами модуляций сердечного ритма на частотах около 0.44 кол/ки (0.430–0.446 кол/ки). Таким образом, это дает основание для расширения диапазона частот до 0.3–0.45 кол/ки, обнару-

женных во всех ФП и КФП и, вероятно, несвязанного непосредственно с когнитивной деятельностью.

Напротив, диапазон значений частоты периодических колебаний от 0.05 до 0.13 кол/ки связан с когнитивной деятельностью. Так, в сериях КФП “РДО” и “Устный счет” связь активности сенсомоторной коры наблюдается с показателями модуляции сердечного ритма на частотах около 0.05 кол/ки. При этом в случае КФП “РДО” установлены связи этого показателя ВСР с уровнем десинхронизации ЭЭГ в левом центральном отведении, а в ходе решения арифметических задач отмечались связи этого показателя ВСР с уровнем десинхронизации ЭЭГ в правом центральном отведении.

Связь частоты модуляций сердечного ритма равной 0.1 кол/ки с активностью сенсомоторной коры левого полушария прослеживалось в сериях КФП “Красно-черные таблицы Шульте–Платонова” и “Часы с поворотом”. Наряду с этим связь частоты колебаний сердечного ритма около 0.13 кол/ки с активностью сенсомоторной коры левого полушария отмечалась в серии КФП “Устный счет при закрытых глазах”

Следовательно, лишь малый диапазон от 0.05 до 0.13 кол/ки связан с активностью сенсомоторной коры и процессом мышления.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вид когнитивной задачи определяет наличие отрицательных связей между значениями амплитуд модуляций сердечного ритма на различных частотах и активностью сенсомоторной коры левого полушария. Так, при решении задач на восприятие изменений пространственно-временных событий отмечены отрицательные корреляции между активностью сенсомоторной коры левого полушария и значениями амплитуд модуляций сердечного ритма в частотной зоне около 0.05 кол/ки (0.043–0.056 кол/ки). При выполнении арифметических задач такие корреляции обнаружены на частотах около 0.13 кол/ки (0.126–0.136 кол/ки), а в ходе выполнения задач на пространственную ориентацию – на частотах около 0.44 кол/ки (0.430–0.446 кол/ки).

Связь амплитуды модуляций на частотах 0.3–0.45 кол/ки с уровнями активности сенсомоторной коры стабильно отмечается во всех функциональных и когнитивных пробах. Процессы активации сенсомоторной коры, вызванные когнитивной деятельностью, сопровождаются уменьшением амплитуды периодических колебаний сердечного ритма на частотах от 0.05 до 0.13 кол/ки.

Полученные результаты могут быть использованы для дальнейшего изучения физиологических механизмов когнитивных функций, а также могут послужить основой для определения уровней военно-профессиональной адаптации курсантов и решения задач критериальной валидности психологических и психофизиологических методик, предполагаемых к применению в военном профотборе и, прежде всего, в интересах ВМФ.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мухин В.Н., Яковлев Н.М. Связь вариабельности сердечного ритма с психической работоспособностью. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 97(8): 838–842. 2011. [Mukhin V.N., Yakovlev N.M. Association between level of intelligence and heart rate variability. Russ. J. Physiol. 97(8): 838–842. 2011. (In Russ)].
2. Мухин В.Н., Яковлев Н.М., Клименко В.М. Связь вариабельности сердечного ритма с уровнем активации лобной коры. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 97(11): 1281–1288. 2011. [Mukhin V.N., Yakovlev N.M., Klimenko V.M. Association of heart rate variability and frontal cortex activation. Russ. J. Physiol. 97(11): 1281–1288. 2011. (In Russ)].
3. Павлов К.И., Сырцев А.В., Мухин В.Н., Архимук А.Н., Михеев А.В., Копытова Ю.С., Хамитова Е.А., Сысоев В.Н., Петренко М.И. Определение информативности электрофизиологических показателей для оценки военно-профессиональной адаптации курсантов

- военно-морского института. *Авиакосм. и экологич. медицина*. 53(3): 57–66. 2019. [Pavlov K.I., Syrtsev A.V., Mukhin V.N., Arkhimuk A.N., Mikheev A.V., Kopytova Yu.S., Khamitova E.A., Sysoev V.N., Petrenko M.I. Analysis of informativity of electrophysiological data in context of rating military occupational adaptation of naval school students. *Авиакосм. и Экологич. Meditsina*. 53(3): 57–66. 2019. (In Russ)].
4. Mahinrad S., Jukema J.W., van Heemst D., Macfarlane P.W., Clark E.N., de Craen A.J., Sabayan B. 10-Second heart rate variability and cognitive function in old age. *Neurology*. 86(12): 1120–1127. 2016.
  5. Mahinrad S., Van Heemst D., Macfarlane P.W., Stott D.J., Jukema J.W., De Craen A.J., Sabayan B. Short-term heart rate variability and cognitive function in older subjects at risk of cardiovascular disease. *J. Hypertens.* 33: 33–40. 2015.
  6. Muthukrishnan S.P., Gurja J.P., Sharma R. Does Heart Rate Variability Predict Human Cognitive Performance at Higher Memory Loads? *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 61(1): 14–22. 2017.
  7. Stenfors C.U., Hanson L.M., Theorell T., Osika W.S. Executive Cognitive Functioning and Cardiovascular Autonomic Regulation in a Population-Based Sample of Working Adults. *Front. Psychol.* 7: 1536. 2016.
  8. Whitehurst L.N., Cellini N., McDevitt E.A., Duggan K.A., Mednick S.C. Autonomic activity during sleep predicts memory consolidation in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 113(26): 7272–7277. 2016.
  9. Luque-Casado A., Perales J.C., Cárdenas D., Sanabria D. Heart rate variability and cognitive processing: The autonomic response to task demands. *Biol. Psychol.* 113: 83–90. 2016.
  10. Delgado-Moreno R., Robles-Pérez J.J., Clemente-Suárez V.J. Combat Stress Decreases Memory of Warfighters in Action. *J. Med. Syst.* 41(8): 124. 2017.
  11. Sayers B.M. Analysis of heart rate variability. *Ergonomics*. 16:17–32. 1973.
  12. Taylor J.A., Carr D.L., Myers C.W. Eckberg D.L. Mechanisms underlying verylow frequency RR-interval oscillation in humans. *Circulation*. 98: 547–555. 1998.
  13. Aksyonov V.V. Methodical bases of cybernetic analysis of heart rate. In: Heart rate in sportsmen. Ed. Baevskiy R.M. *Fizkultura i sport*. Moscow. 1986.
  14. Pomeranz B., Macaulay R.J.B., Caudill M.A., Kutz I., Adam D., Gordon D., Kilborn K.M., Barger A.C., Shannon D.C., Cohen R.J., Benson M. Assessment of autonomic function in humans by heart rate spectral analysis. *Am. J. Physiol.* 248: 151–153. 1985.
  15. Akselrod S., Gordon D., Ubel F.A., Shannon D.C., Barger A.C., Cohen R.J. Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat to beat cardiovascular control. *Science*. 213: 220–222. 1981.
  16. Vetter R., Celka P., Vesin J.M., Thonet G., Pruvot E., Fromer M., Scherrer U., Bernardi L. Sub-band modeling of the human cardiovascular system: new insights into cardiovascular regulation. *Ann. Biomed. Eng.* 26(2): 293–307. 1998.
  17. Зенков Л.Р., Ронкин М.А. Функциональная диагностика нервных болезней: руководство для врачей. 5-изд. М. Медпресс-информ. 2013. [Zenkov L.R., Ronkin M.A. *Funktsionalnaya diagnostika nervnykh bolezney: rukovodstvo dlya vrachey*. 5-izd. [Functional diagnosis of nervous diseases: a guide for physicians.] 5th ed. Moscow. Medpress-inform. 2013. (In Russ)].
  18. Pavlov K.I., Syrtsev A.V., Mukhin V.N., Arkhimuk A.N., Mikheeva E.A., Nikolaeva S.V., Andieva N.M., Kamenskaya V.G., Petrenko M.I. The effect of environmental factors on cognitive functions of cadets of military institute. *Izvestiya Atmospheric and Oceanic Physics*. 55(10). 2019.
  19. Павлов К.И., Мухин В.Н., Сырцев А.В., Архимук А.Н., Сысоев В.Н., Петренко М.И. Вариабельность сердечного ритма в изучении когнитивных функций и военно-профессиональной адаптации. *Мед. академ. журн.* 17(4): 7–16. 2017. [Pavlov K.I., Mukhin V.N., Syrtsev A.V., Arkhimuk A.N., Sysoev V.N., Petrenko M.I. Heart rate variability method in the study of cognitive functions and military occupational adaptation (literature review). *Med. Academ. J.* 17(4): 7–16. 2017. (In Russ)].
  20. Wittling W., Block A., Genzel S., Schweiger E. Hemisphere asymmetry in parasympathetic control of the heart. *Neuropsychologia*. 36(5): 461–468. 1998.
  21. Zamrini E.Y., Meador K.J., Loring D.W., Nichols F.T., Lee G.P., Figueroa R.E. Unilateral cerebral inactivation produces differential left/right heart rate responses. *Neurology*. 40: 1408–1411. 1990.
  22. Yoon B.W., Morillo C.A., Cechetto D.F., Hachinski V. Cerebral hemispheric lateralization in cardiac autonomic control. *Arch. Neurol.* 54: 741–744. 1997.
  23. Avnon Y., Nitzan M., Sprecher E., Rogowski Z., Yarnitsky D. Autonomic asymmetry in migraine: augmented parasympathetic activation in left unilateral migraineurs. *Brain*. 127(9): 2099–2108. 2004.

## Association between Periodic Modulations of the Heart Rate and Sensorimotor Cortex Activation

K. I. Pavlov<sup>a, \*</sup>, V. N. Mukhin<sup>b</sup>, A. V. Syrtsev<sup>a</sup>, A. N. Archimuk<sup>a</sup>,  
N. M. Andieva<sup>a</sup>, and M. I. Petrenko<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Kuznetsov Naval Academy, St. Petersburg, Russia*

<sup>b</sup>*Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia*

\**e-mail: youngexp@yandex.ru*

The relevance of this study is a product of insufficient research into the relationships between the physiological substantiation of heart rate variability parameters and bioelectric activity of the sensorimotor cerebral cortex in cognitive work. Our aim was to study the association between the periodic modulations of the heart rate and the sensorimotor cortex activation during cognitive work. 42 first-year cadets of the Naval institute participated in the study ( $n = 44$ ). The average age of the participants was  $18 \pm 0.7$  years. Electroencephalography and electrocardiography were the primary techniques used in the study. The relationship between the heart rate variability and the level of sensorimotor cortex activation was evaluated simultaneously with the presentation of various psychophysiological tests – “Schulte’s test”, “Clock with a turn”, “Reaction to a moving object” (RMO), “Mental arithmetic” with closed eyes. These tests are used to evaluate the perception, selective attention, working memory, spatial orientation, decision making, and thinking. Negative correlations were detected between the activity of the sensorimotor cortex in the left hemisphere and the amplitudes of the heart rhythm modulations in the 0.05 (0.043–0.056) oscillations per cardio interval frequency zone while conducting the RMO-test for spatio-temporal events perception. Significant correlations were found for the 0.13 (0.126–0.136) oscillations per cardio interval frequency range while conducting the arithmetic tasks (“Mental arithmetic” with closed eyes) and for the 0.44 (0.430–0.446) oscillations per cardio interval range during the spatial orientation tasks (Clock with rotation). The relationship between the modulation amplitude at the 0.3–0.45 oscillations per cardio interval frequencies and the sensorimotor cortex activity levels was consistently observed in all functional tests. The activation of the sensorimotor cortex due to cognitive activity is accompanied by the decrease in the amplitude of the heart rate periodic modulations at the 0.05 to 0.13 oscillations per cardio interval frequency range.

*Keywords:* heart rate variability, the structure of heart rate periodic modulations, electroencephalography, sensorimotor cortex activation, EEG desynchronization, frequency and spectral analysis

### ЦИТИРОВАТЬ:

Павлов К.И., Мухин В.Н., Сырцев А.В., Архимук А.Н., Андиева Н.М., Петренко М.И. Связь периодических модуляций сердечного ритма с уровнем активности сенсомоторной коры. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(2): 205–223.

DOI: 10.31857/S0869813920020089

### TO CITE THIS ARTICLE:

Pavlov K.I., Mukhin V.N., Syrtsev A.V., Archimuk A.N., Andieva N.M., Petrenko M.I. Association Between Periodic Modulations of the Heart Rate and Sensorimotor Cortex Activation. Russian Journal of Physiology. 106(2): 205–223.

DOI: 10.31857/S0869813920020089

ПАРВАЛЬБУМИН-СОДЕРЖАЩИЕ ЭНТЕРАЛЬНЫЕ  
МЕТАСИМПАТИЧЕСКИЕ НЕЙРОНЫ В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

© 2020 г. А. Д. Ноздрачев<sup>1</sup>, А. Ф. Будник<sup>2</sup>, П. М. Маслюков<sup>3, 4, \*</sup>

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный университет,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова,  
Нальчик, Россия

<sup>3</sup>Ярославский государственный медицинский университет,  
Ярославль, Россия

<sup>4</sup>Петрозаводский государственный университет,  
Петрозаводск, Россия

\*E-mail: [mpm@ysmu.ru](mailto:mpm@ysmu.ru)

Поступила в редакцию 16.08.2019 г.

После доработки 14.11.2019 г.

Принята к публикации 22.11.2019 г.

Кальций-связывающий белок парвальбумин селективно экспрессируется в различных популяциях нейронов центральной и периферической нервной системы. Локализация и процентный состав парвальбумин-иммунореактивных нейронов определялся в нейронах метасимпатических энтеральных узлов тонкой и толстой кишки у крыс разного возраста (1, 10, 20, 30, 60 сут и 2 года). В межмышечном сплетении парвальбумин-иммунореактивные нейроны выявляются в онтогенезе с момента рождения и до старости, при этом их процент в межмышечном сплетении тонкой кишки возрастает с 10 по 20 сутки жизни, в межмышечном сплетении толстой кишки – в первые 10 суток жизни. В подслизистом сплетении тонкой и толстой кишки у новорожденных крыс парвальбумин отсутствует и определяется с 10-х суток жизни. Процент парвальбумин-иммунореактивных нейронов в подслизистом сплетении увеличивается между 10-ми и 20-ми сутками жизни. При старении доля парвальбумин-иммунореактивных нейронов в межмышечном и подслизистом сплетениях достоверно не меняется. Таким образом, в раннем постнатальном онтогенезе происходит увеличение доли парвальбумин-иммунореактивных нейронов в интрамуральных метасимпатических узлах кишки. Вероятно, данное увеличение связано с буферной ролью парвальбумина в отношении ионов  $Ca^{2+}$ .

*Ключевые слова:* метасимпатическая нервная система, интрамуральные ганглии кишки, парвальбумин, кальций-связывающие белки, иммуногистохимия, онтогенез

DOI: 10.31857/S0869813920020065

Ионы кальция в нервной системе играют важнейшую роль в осуществлении различных физиологических процессов, в т.ч. в возрастных и стресс-индуцированных изменениях нейронов, секреции медиатора, в поддержании оптимального уровня нейропластичности [1, 2]. Ионы  $Ca^{2+}$  могут связываться кальций-связывающими белками. При этом эти белки изменяют свою структуру и могут оказывать влияние на разнообразные процессы внутри клетки. Часть из них широко распространена,

например, кальмодулин, обнаруженный почти во всех клетках животных и растений [3]. К наиболее распространенным в нервной системе относятся кальбиндин массой 28 кДа, кальретинин и парвальбумин [1, 4]. Кальбиндин и кальретинин обнаруживаются в большом числе нейронов энтеральных интрамуральных метасимпатических узлов [5, 6]. Однако в отличие от кальбиндина данные по локализации парвальбумина в узлах автономной нервной системы в литературе немногочисленны [7–9].

Известно, что нейронная организация периферических узлов автономной нервной системы сопровождается возрастной перестройкой, сопровождающейся изменением морфологических и функциональных характеристик нейронов [10–12]. Установлено, что в энтеральных узлах в онтогенезе процентное содержание различных типов кальций-связывающих белков меняется. У крыс и кошек в ходе возрастного развития процент кальбиндин-иммунореактивных симпатических нейронов увеличивается с момента рождения до 10-х суток, а затем снижается до конца первого месяца жизни [4]. В тонкой кишке процент кальбиндин-иммунореактивных нейронов возростал в первые 20 суток жизни, процент кальретинин-иммунореактивных нейронов увеличивался в течение 2 месяцев жизни [13, 14].

Целью настоящего исследования явилось определение локализации и процентного соотношения парвальбумин-иммунореактивных нейронов подслизистого и межмышечного сплетения тонкой и толстой кишки в постнатальном онтогенезе.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на новорожденных, 10-, 20-, 30-, 60-суточных, 2-х-летних крысах (по 5 в каждой возрастной группе). На проведение исследования получено разрешение Этического комитета Ярославского государственного медицинского университета. После введения летальной дозы уретана (3 г/кг, внутрибрюшинно), животных перфузировали транскардиально физиологическим раствором с гепарином, а затем фиксирующей смесью 4%-ного параформальдегида на 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.4). После перфузии участки двенадцатиперстной и поперечно-ободочной толстой кишки длиной 0.5 см извлекались и помещались в ту же фиксирующую смесь, в которой производили перфузию, на 1–2 ч. Продольные серии срезов кишки толщиной 12 мкм изготавливали на криостате.

С целью выявления парвальбумина применялось двойное мечение соответствующими первичными кроличьими антителами фирмы Abcam (США, ab11427), разведение 1 : 500. Срезы преинкубировались в течение 30 мин при комнатной температуре в PBS с добавлением 10% сыворотки, 1% тритона X-100, 0.1% бычьего сывороточного альбумина. Затем срезы инкубировались с первичными антителами в течение 24 ч при комнатной температуре. После кратковременной промывки в PBS срезы инкубировались с ослиными вторичными антителами против кролика, конъюгированными с индокарбоцианином (Cy3, Jackson Immunoresearch, США, 711-165-152, разведение 1 : 150), дающим красную флуоресценцию. Для расчета процента иммунопозитивных нейронов, кроме меток к парвальбумину, производилось иммуномечение всей нейронной популяции при помощи антител морской свинки к протеиновому генному продукту 9.5 (Abcam, США, ab10410, разведение 1 : 300), вторичные ослиные антитела против морской свинки были конъюгированы с флуорохромом флуоресцином изотиоционатом (FITC, Jackson Immunoresearch, США, 706-095-148, разведение 1 : 150), дающим зеленую флуоресценцию.

Негативный контроль проводили путем преабсорбции первичного антитела с рекомбинантным парвальбумином (Abcam, ab69002) или отсутствием первичного антитела.

Анализ препаратов проводили на флуоресцентном микроскопе Olympus BX43 (Токио, Япония) с соответствующим набором светофильтров и охлаждаемой цифровой CCD камерой Tucsen TCC 6.1ICE с программным обеспечением ISCapture 3.6 (Китай). Для анализа размеров и процентного соотношения иммунопозитивных нейронов на цифровых изображениях гистологических препаратов использовали программу Image J (НИН, США, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Долю иммунопозитивных нейронов определяли как их отношение к общему числу нейронов, меченных протеиновым генным продуктом 9.5, которое принимали за 100%. Анализу подлежали нервные клетки, срез которых прошел через ядро. Подсчет производили в 10 случайно выбранных измеренных областях (1 микроскопическое поле составляло 0.12 мм<sup>2</sup>) при 200-кратном увеличении у каждого животного в каждой возрастной группе. Среднее определяли путем усреднения пропорций, полученных от пяти животных.

Математическая обработка данных проведена с использованием пакетов прикладных программ Sigma Plot (StatSoft, США). Все величины представлены как средняя арифметическая  $\pm$  ошибка среднего ( $M \pm m$ ). Достоверность различий средних величин определяли с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с коррекцией Бонферрони. Достоверными считали различия при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

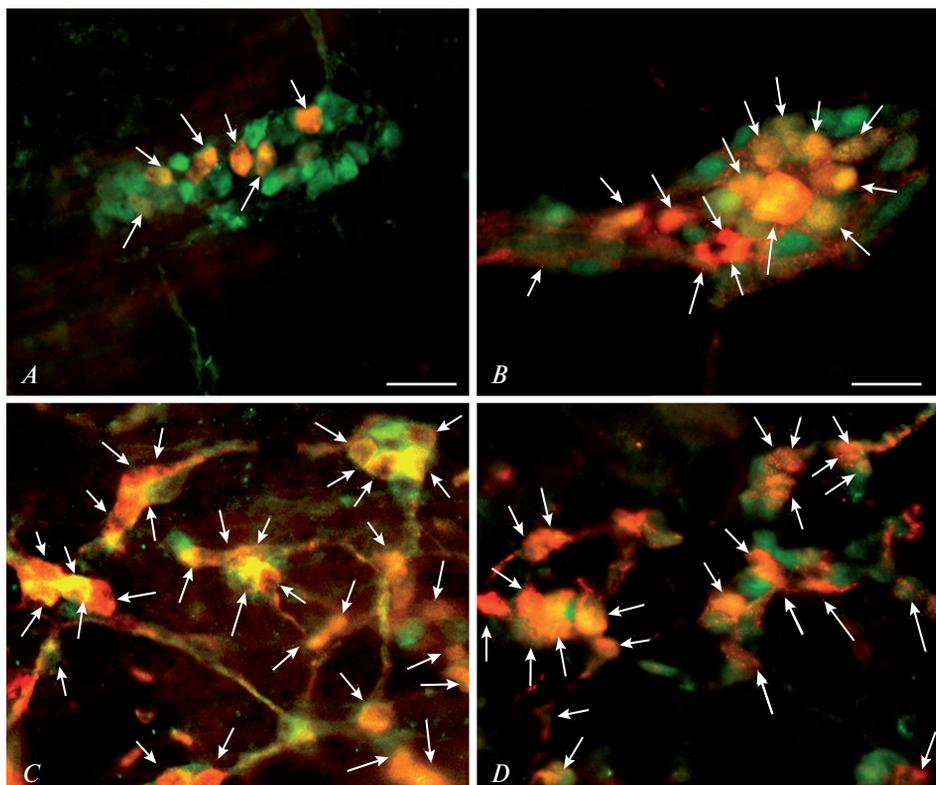
Результаты показали, что парвальбумин-иммунореактивные нейроны обнаруживались в тонкой и толстой кишке у крыс всех исследованных возрастов, начиная с момента рождения до старости. Иммунофлуоресценция наблюдалась главным образом в телах нейронов (рис. 1). Преабсорбция первичных антител с рекомбинантным парвальбумином (Abscam, ab69002), а также отсутствие первичных антител приводило к исчезновению парвальбумин-иммунореактивной флуоресценции.

В межмышечном сплетении тонкой кишки у новорожденных и 10-суточных крысят процент парвальбумин-иммунореактивных нейронов был небольшим. Доля парвальбумин-иммунореактивных нейронов достоверно увеличивалась между 10-ми и 20-ми сутками жизни ( $p < 0.001$ , табл. 1). В межмышечном сплетении толстой кишки процент парвальбумин-иммунореактивных нейронов был низким, но значительно возрастал в первые 10 суток жизни ( $p < 0.001$ ). Начиная с 10 суток жизни, процент таких нейронов в интрамуральных ганглиях межмышечного сплетения был достоверно больше в толстой кишке по сравнению с тонкой ( $p < 0.05$ ).

В подслизистом сплетении у новорожденных крысят парвальбумин не выявлялся, а определялся с 10-х суток жизни (табл. 2). В тонкой кишке процент парвальбумин-иммунореактивных нейронов достоверно увеличивался между 10-ми и 20-ми сутками жизни ( $p = 0.03$ ) и далее не изменялся ( $p > 0.05$ ). При этом в тонкой кишке процент этих нейронов был достоверно большим по сравнению с толстой ( $p < 0.05$ ) кишкой крыс разного возраста ( $n = 5$  в каждой возрастной группе).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе проведенного исследования нами впервые доказана локализация парвальбумина не только в нейронах центральной, но и автономной нервной системы, в том числе в нейронах интрамуральных узлов тонкой и толстой кишки. Предыдущие исследования не выявили парвальбумин в метасимпатических интрамуральных ганглиях органов пищеварения у разных животных: крысы, морской свинки и макаки-резус [7–9]. Вероятно, данные различия связаны с особенностями применяемых антител, различными видами животных и различными исследован-



**Рис. 1.** Микрофотографии парвальбумин (ПБ)-ИР нейронов (указаны стрелками) тонкой кишки в межмышечном сплетении (A) новорожденных, (B) 2-х летних, и подслизистом сплетении (C) 10-суточных и (D) 30-суточных крыс. Флюоресценция Cy3 (красный, ПБ), FITC (зеленый, PGP9.5). Масштаб: 50 мкм.  
**Fig. 1.** Micrographs of parvalbumin IR neurons (indicated by arrows) of the small intestine in the myenteric plexus of (A) newborns, (B) 2-year-old, and submucous plexus of (C) 10-day-old and (D) 30-day-old rats. Fluorescence of Cy3 (red, PB), FITC (green, PGP9.5). Scale: 50 mkm.

ными отделами пищеварительного тракта. Например, работа М. Schemann с соавт. [9] выполнена на желудке морской свинки, а структурно-функциональная организация метасимпатической энтеральной системы у разных животных, в т.ч. морской свинки с одной стороны, мыши и крысы с другой – существенно отличаются [15]. Исследование Т. Endo и Т. Онауа [7] проведено на крысе, но на тощей кишке, наша работа выполнена на двенадцатиперстной и поперечно-ободочной толстой кишке.

Результаты настоящей работы также свидетельствуют, что в раннем онтогенезе доля нейронов, экспрессирующих парвальбумин, увеличивается в подслизистом и межмышечном сплетениях тонкой и толстой кишки. Учитывая, что сходные процессы были ранее нами описаны в отношении других кальций-связывающих белков – кальбиндина и кальретинина [13, 14], можно предположить, что возрастное увеличение экспрессии нейрональных кальций-связывающих белков в раннем постнатальном онтогенезе носит более общий характер.

В отличие от кальбиндина и кальретинина, парвальбумин относится к медленным буферам [1, 16]. Одна из функций парвальбумина – участие в механизмах генерации ритма в нейронах с высокой частотой импульсации [17]. Нейроны с повы-

**Таблица 1.** Процент парвальбумин-иммунореактивных нейронов в интрамуральных ганглиях межмышечного сплетения тонкой и толстой кишки крыс разного возраста ( $n = 5$  в каждой возрастной группе)

**Table 1.** The percentage of PV-IR neurons in the intramural ganglia of myenteric plexus in the small and large intestines of rats of different ages ( $n = 5$  in each age group)

Возраст Age	Тонкая кишка Small intestine	Толстая кишка Large intestine
Новорожденный Newborn	28 ± 3.2	24 ± 3.2
10 суток 10-day-old	30 ± 4.2	71 ± 2.1*,**
20 суток 20-day-old	57 ± 2.3*	70 ± 4.2*,**
30 суток 30-day-old	54 ± 4.6*	68 ± 3.2*,**
2 месяца 2-month-old	58 ± 4.1*	69 ± 3.4*,**
2 года 2-year-old	59 ± 3.3*	69 ± 3.1*,**

\*  $p < 0.01$ , различия достоверны по сравнению с новорожденными животными

\*  $p < 0.01$ , the differences are significant compared with newborn animals;

\*\*  $p < 0.05$ , различия достоверны по сравнению с тонкой кишкой

\*\*  $p < 0.05$ , differences are significant compared with the small intestine.

**Таблица 2.** Процент парвальбумин-иммунореактивных нейронов в интрамуральных ганглиях подслизистого сплетения тонкой и толстой кишки крыс разного возраста ( $n = 5$  в каждой возрастной группе)

**Table 2.** The percentage of parvalbumin-IR neurons in the intramural ganglia of submucous plexus of the small and large intestines of rats of different ages ( $n = 5$  in each age group)

Возраст Age	Тонкая кишка Small intestine	Толстая кишка Large intestine
10 суток 10-day-old	72 ± 1.3	51 ± 2.3**
20 суток 20-day-old	82 ± 2.6*	62 ± 3.4 **
30 суток 30-day-old	82 ± 2.3*	63 ± 3.5**
2 месяца 2-month-old	84 ± 2.3*	61 ± 3.6 **
2 года 2-year-old	87 ± 5.3*	65 ± 5.3**

\*  $p < 0.05$ , различия достоверны по сравнению с новорожденными животными

\*  $p < 0.05$ , the differences are significant compared with newborn animals;

\*\*  $p < 0.05$ , различия достоверны по сравнению с тонкой кишкой

\*\*  $p < 0.05$ , differences are significant compared with the small intestine.

шенным уровнем экспрессии парвальбумина обнаруживали большую устойчивость к гибели после неонатального повреждения аксонов [1].

В ряде работ установлена связь уровня кальбиндина и парвальбумина в нейронах и экспрессии кальциевых каналов. В нейронах гиппокампа мышей каналы Cav1.2 на ранних этапах развития экспрессируются в теле клетки, дендритах и аксоне. По

мере взросления экспрессия в аксоне уменьшается и определяется только в теле клетки и дендритах [18]. В развивающихся нейронах при участии ионов кальция происходит регуляция роста нейронов и морфологической пластичности, в частности, конуса роста и развитие дендритов, что совпадает по времени с увеличением содержания кальций-связывающих белков [19]. На более поздних этапах постнатального развития нейронов интрамуральных узлов кальций-связывающие белки играют роль кальциевых сенсоров и участвуют в поддержании уровня кальция в клетках.

Согласно литературным сведениям процент кальбиндин-позитивных энтеральных нейронов был меньше у мышей, содержащихся в стерильных условиях [20, 21]. Т.к. заселение кишечника микрофлорой происходит после рождения, можно предположить, что микрофлора кишки оказывает влияние и на нейрохимический состав, в т.ч. на экспрессию кальций-связывающих белков, и изменения их экспрессии в онтогенезе могут быть связаны и с влиянием микробиоты.

Данные литературы свидетельствуют, что при старении процент парвальбумин-иммунореактивных нейронов в коре больших полушарий увеличивается [22]. Тем не менее, мы не обнаружили повышения доли парвальбумин-иммунореактивных нейронов у старых крыс.

Таким образом, в раннем постнатальном онтогенезе происходит увеличение доли парвальбумин-иммунореактивных нейронов в интрамуральных узлах кишки, что соответствует возрастным изменениям содержания других кальций-связывающих белков, в т.ч. кальбиндина и кальретицина в энтеральных узлах. Вероятно, данное увеличение связано с буферной ролью парвальбумина в отношении ионов  $Ca^{2+}$ . Возрастной инволюции парвальбумин-иммунореактивных нейронов кишки у старых крыс не отмечается.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schwaller B. The regulation of a cell's  $Ca^{2+}$  signaling toolkit: the Ca (2+) homeostasome. *Adv. Exp. Med. Biol.* 740: 1–25. 2012.
2. Simons M.J., Pellionisz A.J. Genomics, morphogenesis and biophysics: triangulation of Purkinje cell development. *Cerebellum*. 5: 27–35. 2006.
3. Пермяков Е.А. Кальцийсвязывающие белки. М. Наука. 1993 [*Permyakov E.A. Kaltsiysvyazuvaushchiye belki. [Calcium-Binding Proteins]. Moscow. Nauka. 1993 (In Russ)].*
4. Маслюков П.М., Ноздрачев А.Д., Емануйлов А.И. Возрастные особенности экспрессии кальций-связывающих белков в нейронах ганглиев автономной нервной системы. *Успехи геронтологии*. 29(2): 247–253. 2016. [*Masliukov P.M., Nozdrachev A.D., Emanuilov A.I. Age-related expression of calcium-binding proteins in autonomic ganglionic neurons. Adv. Gerontol.* 29(2): 247–253. 2016. (In Russ)].
5. Mitsui R. Immunohistochemical analysis of substance P-containing neurons in rat small intestine. *Cell Tissue Res*. 343(2): 331–341. 2011.
6. Qu Z.D., Thacker M., Castelucci P., Bagyánszki M., Epstein M.L., Furness J.B. Immunohistochemical analysis of neuron types in the mouse small intestine. *Cell Tissue Res*. 334(2): 147–161. 2008.
7. Endo T., Onaya T. Immunohistochemical localization of parvalbumin in rat and monkey autonomic ganglia. *J. Neurocytol.* 17(1): 73–77. 1988.
8. Celio M.R. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience*. 35(2): 375–475. 1990.
9. Schemann M., Schaaf C., Mäder M. Neurochemical coding of enteric neurons in the guinea pig stomach. *J. Comp. Neurol.* 353(2): 161–178. 1995.
10. Ноздрачев А.Д., Маслюков П.М. Возрастное развитие нейронов автономных ганглиев. СПб. Информ-Навигатор. 2014. [*Nozdrachev A.D., Maslyukov P.M. Vozrastnoye razvitiye neuronov avtonomnykh gangliyev [Age development of autonomic ganglionic neurons]. SPb. Inform-Navigator. 2014 (In Russ)].*
11. Masliukov P.M. Sympathetic neurons of the cat stellate ganglion in postnatal ontogenesis: morphometric analysis. *Auton. Neurosci.* 89(1–2): 48–53. 2001.
12. Маслюков П.М., Ноздрачев А.Д., Timmermans J.P. Возрастные особенности нейротрансмиттерного состава нейронов звездчатого узла. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 92(2): 214–221. 2006. [*Masliukov P.M., Nozdrachev A.D., Timmermans J.P. The age specifics of the neurotransmitter composition of the stellate ganglion neurons. Russ J. Physiol.* 92(2): 214–221. 2006. (In Russ)].

13. Маслюков П.М., Будник А.Ф., Ноздрачев А.Д. Нейрохимические особенности узлов метасимпатической системы в онтогенезе. Успехи геронтологии. 30(3): 347–355 2017. [Masliukov P.M., Budnik A.F., Nozdrachev A.D. Developmental changes of neurotransmitter properties in sympathetic neurons. Adv. Gerontol. 30(3): 347–355. 2017. (In Russ)].
14. Masliukov P.M., Moiseev K., Budnik A.F., Nozdrachev A.D., Timmermans J.-P. Development of calbindin- and calretinin-immunopositive neurons in the enteric ganglia of rats. Cell Mol. Neurobiol. 37(7): 1257–1267. 2017.
15. Furness J.B. The enteric nervous system. Oxford. Blackwell Publishing, 2006.
16. Permyakov E.A., Uversky V.N., Permyakov S.E. Parvalbumin as a Pleomorphic Protein. Curr. Protein Pept. Sci. 18(8): 780–794. 2017.
17. Orduz D., Bishop D.P., Schwaller B., Schiffmann S.N., Gall D. Parvalbumin tunes spike-timing and efferent short-term plasticity in striatal fast spiking interneurons. J. Physiol. 591(Pt 13): 3215–3232. 2013.
18. Obermair G.J., Szabo Z., Bourinet E., Flucher B.E. Differential targeting of the L-type Ca<sup>2+</sup> channel alpha 1C (CaV1.2) to synaptic and extrasynaptic compartments in hippocampal neurons. Eur. J. Neurosci. 8: 2109–2122. 2004.
19. Gasperini R.J., Pavez M., Thompson A.C., Mitchell C.B., Hardy H., Young K.M., Chilton J.K., Foa L. How does calcium interact with the cytoskeleton to regulate growth cone motility during axon pathfinding? Mol. Cell Neurosci. 84: 29–35. 2017.

### Parvalbumin-Containing Enteric Metasympathetic Neurons in Postnatal Ontogenesis

A. D. Nozdrachev<sup>a</sup>, A. F. Budnik<sup>b</sup>, and P. M. Masliukov<sup>c, d, \*</sup>

<sup>a</sup>St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

<sup>b</sup>Berbekov Kabardino-Balkarian State University, Nalchik, Russia

<sup>c</sup>Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russia

<sup>d</sup>Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia

\*e-mail: mpm@ysmu.ru

Calcium-binding protein parvalbumin (PB) is selectively expressed in various populations of neurons in the central and peripheral nervous system. The localization and percentage of PB-immunoreactive (IR) neurons was determined in the neurons of metasympathetic enteric ganglia of the small and large intestine in rats of different ages (1, 10, 20, 30, 60 days and 2 years). In the myenteric plexus (MP) PB-IR neurons are detected in ontogenesis from birth to old age, while their percentage in the MP of small intestine increases from 10 to 20 days of life, in the MP of the colon - in the first 10 days of life. In the submucosal plexus (SP) of the small and large intestine in newborn pups, PB is absent and it is determined from 10 days of life. The percentage of PB-IR neurons in the SP increases between 10 and 20 days of life. With aging, the proportion of PB-IR neurons in the MP and SP does not significantly change. Thus, in the early postnatal ontogenesis, there is an increase in the proportion of PB-IR neurons in the gut metasympathetic intramural ganglia. This increase is likely due to the buffer role of PB in relation to Ca<sup>2+</sup> ions.

**Keywords:** Methasympathetic nervous system, intramural enteric ganglia, parvalbumin, calcium-binding proteins, immunohistochemistry, ontogenesis

#### ЦИТИРОВАТЬ:

Ноздрачев А.Д., Будник А.Ф., Маслюков П.М. Парвальбумин-содержащие энтеральные метасимпатические нейроны в постнатальном онтогенезе. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(2): 224–230.

DOI: 10.31857/S0869813920020065

#### TO CITE THIS ARTICLE:

Nozdrachev A.D., Budnik A.F., Masliukov P.M. Parvalbumin-Containing Enteric Metasympathetic Neurons in Postnatal Ontogenesis. Russian Journal of Physiology. 106(2): 224–230.

DOI: 10.31857/S0869813920020065

---

---

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

---

---

**GLY-PRO И АДАПТИВНЫЕ РЕАКЦИИ  
ПРИ МНОГОКОМПОНЕНТНОМ СТРЕССЕ**

© 2020 г. Т. А. Томова<sup>1, \*</sup>, Т. А. Замошина<sup>2, 3</sup>, М. В. Светлик<sup>2, 3</sup>, М. Л. Седокова<sup>1</sup>,  
А. А. Гостюхина<sup>4</sup>, А. М. Фатюшина<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Томский государственный педагогический университет, Томск, Россия

<sup>2</sup>Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

<sup>3</sup>Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

<sup>4</sup>Сибирский федеральный научно-клинический центр федерального  
медико-биологического агентства, Северск, Россия

\*E-mail: eskovata77@mail.ru

Поступила в редакцию 16.10.2019 г.

После доработки 01.12.2019 г.

Принята к публикации 02.12.2019 г.

В настоящем исследовании было изучено влияние пептида глицилпролина (Gly-Pro) на показатели реактивности и адаптивного потенциала при стимуляции парасимпатической нервной системы карбахолом в условиях последовательного сочетанного воздействия трех стрессорирующих факторов: иммобилизации, оперативного вмешательства и процедуры инъекции. Последовательное сочетанное воздействие оперативного вмешательства в виде наложения лигатуры на пилорический отдел желудка, иммобилизации и процедуры инъекций физиологического раствора на фоне карбахола позволило выявить 4 варианта ответа организма крыс. Эти варианты характеризовались различными комбинациями содержания кортикостерона и отдельных субпопуляций лейкоцитов. Все варианты ответов сопровождалась развитием стресса, на что указывали индексы напряженности адаптации. Самые глубокие стрессорные реакции наблюдали у животных после иммобилизации и операции и сочетанном воздействии инъекций физиологического раствора и карбахола. Gly-Pro за счет модулирования парасимпатического звена вегетативной нервной системы и, вероятно, прямого влияния на надпочечники изменял содержание кортикостерона, отдельных субпопуляций лейкоцитов и индекс напряженности адаптации при многокомпонентном стрессе. В случае введения пептида одновременно с карбахолом, по видимому, он действовал по резистентному (сопротивление, противодействие) пути адаптации, а в случае его предварительного введения перед карбахолом – по типу толерантности (выносливость, терпеливость).

*Ключевые слова:* глицилпролин (Gly-Pro), многокомпонентный стресс, иммобилизация, карбахол, физиологический раствор, адаптивные реакции, кортикостерон, лейкоциты

DOI: 10.31857/S0869813920020107

Изучение механизмов адаптации продолжает оставаться катализатором в решении прикладных вопросов современной медицины. В настоящее время широко изучаются вопросы адаптивной регуляции при старении [1], в динамике развития различных болезней [2], при физических нагрузках [3], при стрессе [4]. В естественных условиях существования на организм действует комплекс факторов од-

новременно или последовательно, длительно или кратковременно. Если хронический стресс играет роль в этиологии многочисленных заболеваний и требует огромных затрат со стороны организма, то, напротив, кратковременный — является одним из основополагающих механизмов выживания, который может быть использован клинически для безопасного и эффективного усиления иммунной защиты, а также функционально для повышения умственной и физической работоспособности [5]. Процесс поддержания функционального состояния организма происходит за счет нервных, иммунных и эндокринных звеньев регуляции, которые обеспечивают его сохранение, развитие и работоспособность в неадекватных условиях среды [6]. Важными составляющими устойчивости организма и активного развития адаптации являются глюкокортикоиды, продукция которых опосредована гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системой, реагирующей на стресс [7]. Также одно из ведущих мест в адаптации на стресс занимает пептидергическое звено регуляции, которое в нейроиммуноэндокринных взаимодействиях считается универсальным [8]. Являясь сигнальными молекулами, пептиды, по мнению академика В.Т. Иванова: "... образуют тканевой полифункциональный и полиспецифичный "биохимический буфер", который смягчает метаболические колебания, что позволяет говорить о новой, ранее неизвестной системе регуляции на основе пептидов. Этот механизм дополняет давно известные нервную и эндокринную системы регуляции, поддерживая в организме своеобразный "тканевой гомеостаз" и устанавливая равновесие между ростом, дифференцировкой, восстановлением и гибелью клеток..." [9]. В медицинской практике уже сегодня применяют успешно лекарственные препараты на основе пептидов [10], но механизм их биологического действия во многом остается загадкой.

В результате исследований последних лет выделен новый класс пептидов — глипролины, включающий Gly-Pro (GP), Pro-Gly-Pro (PGP), циклический Gly-Pro (cGP), а также производные PGP, например, N-ацетилированный PGP (N-a-PGP) и N-метилированный PGP (N-m-PGP), которые имеют высокую стабильность в средах организма [11]. Как оказалось, они обладают широким спектром физиологической активности, включающим противострессорный [12], иммуномодулирующий [13], нейромодулирующий [14] и другие эффекты.

Целью настоящего исследования явилось выявление значимости Gly-Pro в адаптивных реакциях крыс в условиях холинергической стимуляции при многокомпонентном стрессе.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнены в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями, согласно положениям: "Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных" (Приказ МЗ СССР № 742 от 13.11.84 г., № 48 от 23.01.85 г.), принципами надлежащей лабораторной практики (РФ ГОСТ Р-53434-2009) и одобрены комиссией по биоэтике Биологического института НИ ТГУ (№ 28 от 15.10.2019).

В данной работе изучали ответные реакции организма крыс на одновременные или дискретные сочетанные стрессорные воздействия, используя для их оценки маркеры скрытых функциональных резервов организма, и выявляли участие пептида Gly-Pro в этих реакциях. В качестве стрессорных воздействий использовали иммобилизацию, оперативное вмешательство в абдоминальную область и процедуру инъекции. Опыты проводились в утренние часы весной на 80 крысах-самцах (Вистар,  $210 \pm 30$  г) (ФГБУ "НИИ Фармакологии" СО РАМН, Томск). Иммобилизацию осуществляли однократно фиксацией крыс на спине за все конечности на операционном столике [15] на 18 ч. Оперативное вмешательство в абдоминальную

область проводили под эфирным наркозом с наложением лигатуры на пилорический отдел желудка для получения желудочного сока и дальнейшего его изучения. Инъекционный способ введения каких-либо фармакологических агентов и физиологического раствора как контроля к ним нередко используется в эксперименте, и, по признанию многих исследователей, является стрессорирующим фактором для экспериментальных животных [16]. Спустя 2 ч после операции крысам вводили неизбирательный агонист М-, Н-холинорецепторов – карбахол (Reanal, Венгрия) внутримышечно в дозе 25 мкг/кг, моделируя сдвиги в функциональном состоянии парасимпатической нервной системы при стрессе. Время действия карбахола составляло 45 мин, являясь оптимальным промежутком времени, где наиболее явно проявлялись изменения под действием различных факторов, установленного экспериментальным путем. С карбахолом сочетали Gly-Pro (Senn Chemicals, Швеция) внутрибрюшинно в дозе 1 мг/кг в объеме 1 мл на 200 г массы или физиологический раствор в эквивалентном количестве. При выборе используемой в работе дозы пептида руководствовались установленными противоязвенным, модулирующим активность медиаторов, препятствующим развитию стрессогенных нарушений эффектам и т.п. [14]. Время действия пептида составило 45 и 75 мин, что обусловлено пиками максимальной концентрации Gly-Pro в плазме после его введения [17].

Крысы случайным образом были разделены на 9 групп: группа № 0 – интактные крысы, которые не подвергались никаким воздействиям; группа № 1 – крысам производили одновременные инъекции карбахола и физиологического раствора после операции; группа № 2 – крысы получали инъекцию физиологического раствора за 30 мин до карбахола после операции; группа № 3 – крысам одновременно вводили карбахол и физиологический раствор после иммобилизации и операции; группа № 4 – крысы получали инъекцию физиологического раствора за 30 мин до карбахола после иммобилизации и операции; группа № 5 – крысы получали одновременно инъекции карбахола и Gly-Pro после операции; группа № 6 – крысы получали инъекцию Gly-Pro за 30 мин до карбахола после операции; группа № 7 – крысам производили одновременные инъекции карбахола и Gly-Pro после иммобилизации и операции; группа № 8 – крысы получали инъекцию Gly-Pro за 30 мин до карбахола после иммобилизации и операции. Крыс групп № 1, 3, 5, 7 декапитировали через 45 мин после введения физиологического раствора или пептида, а крыс относящихся к группам № 2, 4, 6, 8 декапитировали через 75 мин после введения физиологического раствора или пептида. Декапитацию всех животных производили под эфирным наркозом согласно Хельсинской декларации Всемирной медицинской организации о гуманном отношении к животным и приказу Минздрава СССР № 755 от 12.08.77 г. и правил проведения работ с использованием экспериментальных животных (РФ ГОСТ Р-53434-2009). Во время декапитации у крыс из артерии собирали кровь (2.5–5 мл) в пробирку, промытую гепарином.

В качестве критериев оценки постстрессорного состояния организма и его реактивности использовали изменения в составе крови, что согласуется с мнением многих исследователей [18, 19]. В рамках работы в крови определяли и рассчитывали: 1) содержание кортикостерона; 2) общее количество лейкоцитов и их отдельных морфологических форм в крови; 3) индекс напряженности адаптации по Л.Х. Гаркави (ИГ).

Содержание кортикостерона в сыворотке крови определяли после размораживания с помощью твердофазного иммуноферментного “сэндвич”-метода (ELISA). Процедура выполнения иммуноферментного анализа проводилась по инструкциям, предлагаемым производителями тест-систем (IBL, Германия). Перед использованием все реагенты прогревались до комнатной температуры. Каждый флакон с реагентом аккуратно перемешивался, избегая образования пены. Иммунофермент-

ный анализ проводился с использованием поликлональных антител кортикостерона, нанесенных на внутреннюю поверхность полистирола в микротитровальных ячейках. В ячейки микропланшета добавлялось по 100 мкл исследуемой сыворотки крови, стандартов кортикостерона с известными концентрациями и контрольного раствора из набора. Затем в каждую лунку вносилось по 100 мкл ферментного конъюгата и инкубировалось 16–20 ч при 2–8°C. После трехкратной автоматической промывки буфером в каждую ячейку добавлялось по 200 мкл раствора субстрата с красителем и пробы инкубировались при комнатной температуре. Через 30 мин раскапывалось по 50 мкл “стоп-реагента”. Измерения проводились с помощью планшетного фотометра StatFax 303 Plus (США) при длине волны 450 нм. Концентрация гормона вычислялась по калибровочной кривой из прилагаемого набора.

Подсчет общего количества лейкоцитов производили в счетной камере Горяева и лейкограммы на 250 клеток после окраски мазка по Романовскому с использованием микроскопа МБИ ЗУ42 Ломо. ИГ представлял собой отношение лимфоцитов (%) к сегментоядерным нейтрофилам (%) в условных единицах (усл. ед) [20] и критическое предстрессовое значение индекса напряженности адаптации для белых крыс составляло 1.6 усл. ед. [21]. Чем ниже значение ИГ в эксперименте, тем глубже стрессовая реакция.

Статистическая обработка данных выполнялась в R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/> с применением методов проверки нормальности распределений значений в выборках Шапиро–Вилка, оценка меры статистической значимости различий выполнялась с помощью непараметрических критериев Манна–Уитни (в случае сравнения двух независимых выборок) и Краскала–Уолиса (в случае сравнения трех и более независимых выборок), в качестве критерия статистической значимости считали значения при  $p < 0.05$ , результаты представлены в виде медианы анализируемого показателя (Me), 1-го и 3-го квартилей (Q1;Q3).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящем исследовании изучалось влияние пептида Gly-Pro на показатели реактивности и адаптивного потенциала при стимуляции парасимпатической нервной системы карбахолом в условиях последовательного сочетанного воздействия трех стрессирующих факторов: иммобилизации, оперативного вмешательства и процедуры инъекции.

Одновременное сочетание инъекции физиологического раствора (контроль для Gly-Pro и карбахола крысам после операции (группа № 1) не сопровождалось какими-либо изменениями в содержании кортикостерона и нейтрофилов в крови в сравнении с аналогичными показателями интактных животных (табл. 1). Вместе с тем, в обсуждаемой группе наблюдалось пониженное содержание моноцитов и лимфоцитов, что обусловило низкий уровень суммарного количества лейкоцитов в крови по сравнению с аналогичными показателями интактных крыс. По данным литературы, критическое предстрессовое значение индекса напряженности адаптации для белых крыс составляет в среднем 1.6 усл. ед. [21]. В группе № 1 в указанных условиях индекс напряженности адаптации был значимо ниже критического практически на 25%, что указывало на развитие у них реакции стресса.

Если введение физиологического раствора проводилось за 30 мин до введения карбахола после операции (группа № 2), то наблюдались уже совершенно другие изменения исследуемых показателей. Во-первых, значительно понижался уровень кортикостерона и уменьшалось общее количество лейкоцитов по сравнению с аналогичными показателями интактных животных (табл. 1). Во-вторых, значения всех

**Таблица 1.** Влияние Gly-Pro и карбахола на показатели стресс-реакции у крыс в условиях многокомпонентного стресса (Me (Q1; Q3))**Table 1.** Effect of GP and carbachol on stress response in rats under multicomponent stress (Me (Q1; Q3))

Показатели (Indicators)	Контроль Control					Пептид Peptide			
	операция surgery		иммобилизация + + операция immobilization + + surgery			операция surgery		иммобилизация + + операция immobilization + + surgery	
	группа №0, n = 10	группа №1 кбх + ф.р., n = 14	группа №2 ф.р + 30' + кбх, n = 7	группа №3 кбх + ф.р., n = 8	группа №4 ф.р + 30' + кбх, n = 7	группа №5 кбх + Gly-Pro, n = 10	группа №6 Gly-Pro + 30' + кбх, n = 10	группа №7 кбх + Gly-Pro, n = 7	группа №8 Gly-Pro + 30' + кбх, n = 7
Общее количество лейкоцитов, $\times 10^9$ /л Total white blood cell count, $\times 10^9$ /L	7.4 (6.2; 9.5)	3.6 (3.1; 3.9) $p_0 < 0.05$	3.8 (3.880; 3.885) $p_0 < 0.05$	13.8 (10.3; 14.4) $p_0 < 0.05$	9.9 (7.0; 19.2) $p_0 < 0.05$	5.88 (4.4; 8.8) $p_1 < 0.05$ $p_0 < 0.05$	7.61 (5.9; 9.3) $p_1 < 0.05$	6.93 (6.0; 10.1) $p_1 < 0.05$ $p_0 < 0.05$	7.87 (7.0; 9.1) $p_1 < 0.05$
Абсолютное количество нейтрофилов, $\times 10^9$ /л Absolute number of neutrophils, $\times 10^9$ /L	2.3 (1.7; 2.5)	2.04 (1.8; 2.5)	6.6 (1.9; 13.9)	10.25 (7.8; 13.0) $p_0 < 0.05$	11.5 (6.3; 15.4) $p_0 < 0.05$	2.21 (1.3; 3.3)	3.9 (2.9; 6.4) $p_0 < 0.05$	6.82 (3.8; 9.8) $p_0 < 0.05$	5.1 (4.5; 5.6) $p_0 < 0.05$
Абсолютное количество моноцитов, $\times 10^9$ /л Absolute number of monocytes, $\times 10^9$ /L	0.3 (0.2; 0.5)	0.07 (0.05; 0.08) $p_0 < 0.05$	0.44 (0.1; 0.8)	0.47 (0.4; 0.6)	0.15 (0.09; 0.2) $p_0 < 0.05$	0.09 (0.07; 0.17) $p_0 < 0.05$	0.13 (0.06; 0.4) $p_1 < 0.05$	0.39 (0.2; 0.7)	0.51 (0.3; 0.8) $p_1 < 0.05$
Абсолютное количество лимфоцитов, $\times 10^9$ /л Absolute number of lymphocytes, $\times 10^9$ /L	5.3 (3.6; 7.4)	1.7 (0.9; 2.08) $p_0 < 0.05$	1.7 (1.2; 4.3)	1.8 (1.1; 3.2) $p_0 < 0.05$	2.9 (2.1; 3.6)	3.9 (3.1; 5.3) $p_1 < 0.05$	2.87 (2.3; 3.9) $p_0 < 0.05$	2.29 (1.9; 4.4)	2.25 (1.9; 2.3) $p_0 < 0.05$
Кортикостерон, нг/мл Corticosterone, ng/ml	195.9 (176.5; 216.3)	193.2 (168.2; 221.5)	49.3 (10.9; 104.2) $p_0 < 0.05$	79.7 (46.4; 152.9)	329.9 (219.8; 533.4)	208.8 (131.9; 473) $p_1 < 0.05$	335.5 (307.7; 335.3) $p_1 < 0.05$ $p_0 < 0.05$	263.9 (209; 335.3) $p_1 < 0.05$	442.6 (357.4; 483.9) $p_0 < 0.05$
ИГ, усл. ед. IG, conventional unit	3.0 (1.3; 4.1)	1.2 (1.0; 1.3) $p_0 < 0.05$	0.7 (0.3; 0.9) $p_0 < 0.05$	0.16 (0.1; 0.5) $p_0 < 0.05$	0.3 (0.27; 0.4) $p_0 < 0.05$	1.9 (1.3; 2.3) $p_1 < 0.05$	0.6 (0.4; 1.7) $p_0 < 0.05$	0.4 (0.3; 0.7) $p_0 < 0.05$	0.4 (0.3; 0.5) $p_0 < 0.05$

Me (Q1; Q3) – медиана анализируемого показателя (1-ый квартиль; 3-ий квартиль); n – количество животных; кбх – карбахол; ф.р. – физиологический раствор; ИГ – индекс напряженности адаптации; группа № 0 – интактные крысы, которые не подвергались воздействию стрессорирующих факторов; группа № 1 – одновременные инъекции карбахола и физиологического раствора после операции; группа № 2 – инъекция физиологического раствора за 30 мин до карбахола после операции; группа № 3 – одновременные инъекции карбахола и физиологического раствора после иммобилизации и операции; группа № 4 – инъекция физиологического раствора за 30 мин до карбахола после иммобилизации и операции; группа № 5 – одновременные инъекции карбахола и Gly-Pro после операции; группа № 6 – инъекция Gly-Pro за 30 мин до карбахола после операции; группа № 7 – одновременные инъекции карбахола и Gly-Pro после иммобилизации и операции; группа № 8 – инъекция Gly-Pro за 30 мин до карбахола после иммобилизации и операции;  $p_0 < 0.05$  по сравнению с соответствующим показателем интактных крыс;  $p_1 < 0.05$  по сравнению с соответствующим показателем крыс, получавшим ф.р. в данной модели.

Me (Q1; Q3) – median of the analyzed indicator (1st quartile; 3rd quartile); n – number of animals; cch – carbachol; s – saline; IG – index of adaptation intensity; group № 0 – intact rats that were not exposed to stressors; group № 1 – simultaneous injections of carbachol and saline after surgery; group № 2 – injection of saline and after 30 minutes the introduction of carbachol after surgery; group № 3 – simultaneous injections of carbachol and saline after immobilization and surgery; group № 4 – injection of saline and after 30 min the introduction of carbachol after immobilization and surgery; group № 5 – simultaneous injections of carbachol and Gly-Pro after surgery; group № 6 – injection of Gly-Pro and after 30 min the introduction of carbachol after surgery; group № 7 – simultaneous injections of carbachol and Gly-Pro after immobilization and surgery; group № 8 – injection of Gly-Pro and after 30 min the introduction of carbachol after immobilization and surgery;  $p_0 < 0.05$  compared to the corresponding index of intact rats;  $p_1 < 0.05$  compared to the corresponding index of rats treated with saline in this model.)

остальных исследуемых показателей в этой группе соответствовали значениям аналогичных показателей интактных крыс, т.е. существенно не изменялось содержание лимфоцитов, нейтрофилов и моноцитов. При этом, индекс напряженности адаптации понижался практически на 60% от критического уровня, что указывало на нарастание стрессовой реакции у этой группы в сравнении с группой № 1.

В третьей серии экспериментов одновременное сочетание инъекции физиологического раствора и карбахола после иммобилизации и операции (группа № 3) сопровождалось третьим вариантом изменений исследуемых показателей в сравнении с таковыми интактной группы (табл. 1). Существенно не изменялось содержание в крови кортикостерона и моноцитов, но значительно повысился уровень нейтрофилов, за счет чего увеличилось общее количество лейкоцитов, а также снизилось содержание лимфоцитов. В этих условиях отметили сдвиг индекса напряженности адаптации на 90% в сравнении с критическим уровнем, что указывало на углубление стресс-реакции в условиях сочетанного воздействия иммобилизации, операции с последующими одновременными инъекциями физиологического раствора и карбахола.

Наконец, последний вариант стрессовой реакции наблюдался в случае, когда вводили физиологический раствор крысам за 30 мин до карбахола после иммобилизации и операции (группа № 4). Такое сочетание стрессорных воздействий значимо не изменяло уровень кортикостерона и содержание лимфоцитов в сравнении с аналогичными показателями интактных животных (табл. 1). Вместе с тем, в этой группе регистрировали высокое общее количество лейкоцитов за счет нейтрофилов и низкие содержание моноцитов по сравнению с аналогичными показателями интактных крыс. И в этом случае сдвиг индекса напряженности адаптации указывал на развитие стресс-реакции и отличался от критического уровня на 80%.

Таким образом, с помощью комплекса используемых показателей (содержание кортикостерона, количество лейкоцитов и их отдельных морфологических форм, индекс напряженности адаптации) нам удалось выявить на фоне холинергической стимуляции 4 варианта ответа организма крыс на комплекс стрессорных воздействий (оперативное вмешательство в виде наложения лигатуры на пилорический отдел желудка, иммобилизация и процедура инъекции физиологического раствора), предъявляемых в разной последовательности. Эти варианты характеризовались различными комбинациями содержаний кортикостерона и отдельных субпопуляций лейкоцитов. Все варианты ответов сопровождалось развитием стресса, на что указывали индексы напряженности адаптации. Самые глубокие стрессорные реакции наблюдали у животных после сочетанного последовательного воздействия иммобилизации, оперативного вмешательства и инъекций физиологического раствора с карбахолом.

Введение Gly-Pro одновременно с карбахолом после оперативного вмешательства (группа № 5) вызывало статистически значимые повышения содержания кортикостерона, абсолютного количества лимфоцитов по сравнению с аналогичными показателями крыс группы № 1, получавших физиологический раствор вместо пептида (табл. 1), обусловив соответствие этих показателей аналогичным у интактных крыс. Но при этом, пептид увеличивал общее количество лейкоцитов, уровень которых все же оказывался ниже чем у интактных крыс, и индекс напряженности адаптации практически на 60%, значение которого превысило критический уровень (1.6 усл. ед.), что означает отсутствие реакции стресс. Вместе с тем, пептид не влиял на содержание нейтрофилов и моноцитов, которые остались на уровне контрольных значений.

Введение Gly-Pro за 30 мин до введения карбахола крысам также после операции (группа № 6) сопровождалось статистически значимым увеличением содержания кортикостерона по сравнению с уровнем гормона у крыс контрольной группы № 2, и это значение было выше, чем у интактных крыс (табл. 1). Увеличение общего количества лейкоцитов под действием Gly-Pro практически привело к значениям

данного показателя, сравнимого с аналогичным у интактных крыс. Абсолютное количество лимфоцитов у прооперированных крыс, получавших пептид, по сравнению с интактными животными было низким. Индекс напряженности адаптации под действием пептида значимо не изменялся в сравнении с контрольной группой № 2 и соответствовал значению, указывающему на развитие стрессорной реакции.

Одновременное сочетание инъекции Gly-Pro и карбахола после иммобилизации и операции (группа № 7) увеличивало концентрацию кортикостерона в крови по сравнению с соответствующим показателем у крыс контрольной группы № 3, но так же, как и в контрольной группе, она не отличалась от таковой интактных крыс (табл. 1). Введение пептида сопровождалось уменьшением общего количества лейкоцитов по сравнению с контрольной группой. Однако их уровень оставался ниже, чем у интактных животных. Под влиянием Gly-Pro отсутствовали значимые изменения в содержании нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов в сравнении с аналогичными показателями соответствующего контроля, причем уровень лимфоцитов и моноцитов оказались в пределах значений интактных крыс. Индекс напряженности адаптации под действием пептида значимо не изменялся в сравнении с контрольной группой и также как в предыдущей группе № 6 соответствовал значению, указывающему на развитие реакции стресс.

Наконец, если пептид вводился за 30 мин до карбахола иммобилизованным и оперированным животным (группа № 8), то общее количество лейкоцитов снижалось, но увеличивалось абсолютное содержание моноцитов по сравнению с соответствующими показателями контрольной группы № 4. При этом обсуждаемые показатели в этой группе животных максимально приближались к таковым интактных крыс (табл. 1) и существенно не отличались от последних. Кроме того, пептид не изменял концентрацию гормона и индекс напряженности адаптации по сравнению с контрольной группой, что указывало на сохранение у животных стрессовой реакции.

Таким образом, изменения содержания кортикостерона, отдельных субпопуляций лейкоцитов и индекса напряженности адаптации организма посредством модуляции Gly-Pro холинергических влияний при многокомпонентном стрессе были обусловлены особенностями комбинаций стрессоров.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В формировании компенсаторно-приспособительных реакций организма при экстремальных воздействиях кровь является ключевой гомеостатической системой [22, 23]. Кортикостероиды и показатели гемограммы отражают состояние гомеостатической системы и играют решающую роль в специфических и неспецифических адаптационных реакциях при любых типах воздействий; они, в конечном счете, определяют резистентность и реактивность организма [19]. Рядом исследователей показано, что при действии стрессоров основные гормоны и медиаторы стресса (норадреналин, адреналин и кортикостерон) перераспределяют субпопуляции лейкоцитов в организме [7, 24] и участвуют в перестройке активности вегетативных систем [25]. Они индуцирует перераспределение лейкоцитов между кровью и органами, направляя субпопуляции лейкоцитов в конкретные органы-мишени (места ранений, кожа, оболочки пищеварительного, урогенитального и дыхательного трактов и мозг, селезенка, легкие, костный мозг и лимфатические узлы) и, тем самым значительно повышая скорость, эффективность и регуляцию иммунного ответа [24].

В наших экспериментах продемонстрировано влияние сложного комплекса факторов, каждый из которых является стрессором разной степени выраженности. Сочетанное воздействие стрессирующих факторов в разной последовательности (операция, иммобилизация, инъекции) на фоне стимуляции парасимпатической нервной

системы сопровождается четырьмя типами ответных реакций, характеризующихся различными комбинациями содержания кортикостерона и отдельных субпопуляций лейкоцитов, а также разными уровнями индекса напряженности адаптации.

Известно, что при комплексном воздействии между отдельными факторами устанавливаются особые взаимоотношения, при которых действие одного фактора в какой-то степени изменяет (усиливает, ослабляет и т.п.) характер воздействия другого, а также огромное значение имеет качество фактора и режим его воздействия [26]. В нашем случае реакция организма изменялась на комплекс раздражителей, которые воздействовали однократно с определенной последовательностью и режимом (дискретно). Время последовательного действия факторов в эксперименте составило не более 22 ч, что является первой фазой адаптационного процесса или срочной адаптацией, где адаптивные реакции протекают на основе готовых физиологических механизмов.

Одновременное сочетание инъекций используемых веществ (физиологического раствора и карбахола) после операции (общее время действия факторов 5 ч) обусловило самую низкую в нашем эксперименте напряженность адаптации (самый малый стресс), которая сопровождалась лейкоцитопенией, моноцитопенией и лимфопенией на фоне содержания кортикостерона, соответствующего уровню интактных крыс.

Дискретное применение инъекций физиологического раствора и карбахола после операции (общее время действия факторов 5 ч) обусловило несколько иную картину: при резко пониженном уровне гормона (ниже референсных значений) и лейкоцитопении, абсолютные количества нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов были сравнимы с таковыми интактных крыс, но напряженность адаптации существенно не отличалась от таковой при одновременном сочетании инъекций. Возможно, в этом случае мы столкнулись с пассивной формой адаптивного ответа, которая проявилась в ареактивности. По-видимому, ареактивность — это результат снижения реактивности рецепторов, торможения центральной части рефлекторной дуги или исключения (или снижения) реакции эффекторов в ответ на дискретное действие стрессорных факторов [26].

Одновременное сочетание физиологического раствора и карбахола после иммобилизации и операции (общее время действия факторов 22 ч) формировало самую высокую в нашем эксперименте напряженность адаптивных механизмов, но при этом лейкоцитоз, нейтрофилез, лимфоцитопения и концентрация кортикостерона была как у интактных крыс.

Наконец, введение физиологического раствора за 30 мин до карбахола после иммобилизации и операции (общее время действия факторов 22 ч) способствовало стрессу с высокими уровнями напряженности адаптивных механизмов, лейкоцитозу, нейтрофилезу, моноцитопении, хотя уровень кортикостерона находился при этом в пределах референсных значений.

Таким образом, особенности показателей неспецифического звена срочной адаптации при многокомпонентном стрессе были обусловлены качеством и количеством стрессоров в нашем эксперименте и дискретностью их предъявлений. Низкая напряженность адаптивных механизмов наблюдалась при использовании инъекций после операции, в то время как высокая — при сочетании иммобилизации и операции, где дискретность предъявлений инъекций не имела значения. Напротив, концентрация кортикостерона и содержание субпопуляций лейкоцитов зависели и от качества и количества стрессоров, а также дискретности предъявлений веществ.

Нельзя исключить, что в наших экспериментах при комплексном воздействии между отдельными факторами установились взаимоотношения, при которых действие одного фактора в какой-то степени изменило характер воздействия другого. Учитывая факт перекрестных отношений используемых факторов, уместно пред-

положить, что мы, возможно, наблюдали перекрестную адаптацию [26], при которой содержание кортикостерона уменьшалось, либо оставалось на уровне референсных значений после многокомпонентного стресса. Подобную картину изменений уровня кортикостерона в ответ на повторяющиеся стрессорные воздействия можно наблюдать в некоторых исследованиях [27]. Разные реакции на холинергическую стимуляцию при различном сочетании используемых факторов стресса, по-видимому, обусловлены многоканальным нейрогенным контролем через гипоталамо-гипофизарную и симпатoadреналовую системы, где варианты ответной реакции были спровоцированы сочетаниями стрессогенных факторов в различной последовательности. Учение Н.Е. Введенского о парабиозе указывает, что на одном и том же субстрате эффекты, закономерно переходящие от возбуждения к торможению, зависят от количественной характеристики раздражителя (частоты и силы) и от функциональной подвижности реагирующей структуры. В нашем случае на комплекс раздражителей, которые воздействовали однократно с определенной последовательностью и режимом (дискретно) мы получили различные функциональные состояния организма, реагирующего на холинергическую стимуляцию. Н.Е. Введенский подчеркивал, что на раздражители возбудимые ткани отвечают фазной реакцией (характеризующейся пониженной лабильностью), одинаковой во всех случаях, которую он назвал парабиозом. Если допустить, что различное сочетание используемых нами стрессорных факторов в эксперименте сформировали разные функциональные состояния животных, то, и, возможно, на холинергическую стимуляцию мы получили разные фазы парабиотической реакции.

При введении пептида вместо физиологического раствора одновременно с карбахолом после операции (общее время действия факторов 5 ч) наблюдалась тенденция к восстановлению уровня лейкоцитов и лимфоцитов, сниженных стрессом и значимо повышалась концентрация кортикостерона в пределах референсных значений. Следует отметить, что в этом случае Gly-Pro значимо снижал напряженность адаптации, тем самым демпфируя стресс. В случае применения Gly-Pro при ареактивности, когда он вводился после операции, но за 30 мин до карбахола (общее время действия факторов 5 ч) напряженность адаптации не изменялась, она оставалась на уровне стресса, но нормализовался уровень лейкоцитов и формировалась моноцитопения. Пептид значительно увеличивал содержание кортикостерона, тем самым, предупреждая ареактивность.

Введение Gly-Pro одновременно с карбахолом после иммобилизации и операции (общее время действия факторов 22 ч) вызывало лишь тенденцию к снижению напряженности адаптации, но так же, как и после операции пептид практически нормализовал уровень лейкоцитов и значимо повысил концентрацию гормона в пределах референсных значений.

Наконец, введение пептида за 30 мин до карбахола после иммобилизации и операции (общее время действия факторов 22 ч) поддерживало напряженность адаптации на уровне стресса, нормализуя уровень общего количества лейкоцитов и абсолютного количества моноцитов на фоне концентрации кортикостерона выше референсных значений.

Парасимпатические и симпатические нервные волокна образуют сплетения в корковой и мозговой зонах надпочечников. Карбахол, как известно, карбамоиловое производное спирта холина и, так же, как ацетилхолин, является прямым М-, и Н-холиномиметиком, но длительного действия. Максимальная плотность Н-холинорецепторов определяется в симпатических и парасимпатических ганглиях и мозговом слое надпочечников, их связывание с карбахолом приводит к повышению как симпатического, так и парасимпатического влияния на надпочечники, и повышению секреции адреналина. Исходя из того, что Gly-Pro усиливал ответ клеток на ацетилхолин в отношении кардиомиоцитов [28] и обладал сосудорасширяющим эф-

фектом, непосредственно воздействуя на сосудистые гладкомышечные клетки [29], мы посчитали возможным анализировать эффекты сочетанного назначения карбахола и Gly-Pro в нашем эксперименте аналогично. То есть, Gly-Pro потенцировал карбахоловую стимуляцию надпочечников, вероятно, усиливая кровоток как непосредственно, так и через симпатическое и парасимпатическое звено, тем самым обуславливая рост содержания кортикостерона в крови. В свою очередь, гормоны и медиаторы стресса (норадреналин, адреналин и кортикостерон) перераспределяли субпопуляции лейкоцитов в организме и участвовали в перестройке активности вегетативных систем [7, 24, 25].

Таким образом, Gly-Pro за счет модулирования парасимпатического звена вегетативной нервной системы и возможно, прямого влияния на надпочечники изменял неспецифические компоненты срочной адаптации при многокомпонентном стрессе, стремясь обеспечить динамическую устойчивость организму. В случае одновременного сочетания Gly-Pro и карбахола, по-видимому, пептид действовал по резистентному (сопротивление, противодействие) пути адаптации, оказывал противострессорное действие, повышая содержание кортикостерона в пределах референсных значений, снижал напряженность адаптации, пытаясь нормализовать общее количество лейкоцитов. В случае же дискретного предъявления инъекций Gly-Pro и карбахола, пептид действовал по толерантному (выносливость, терпеливость) пути адаптации, где формировал высокий уровень кортикостерона, не изменял напряженность адаптации и восстанавливал уровень лейкоцитов, измененный стрессорами.

Таким образом, Gly-Pro реализовывал компенсаторно-приспособительные реакции организма, выступая в роли эндогенного биологически активного вещества как элемента системы саморегуляции или буфера [9], призванного адаптировать организм к экстраемальным воздействиям и участвующего в обеспечении перекрестной адаптации. Возвращаясь к учению Н.Е. Введенского о парабиозе, и, допуская предположение о том, что в эксперименте при различном сочетании факторов стресса нами получены фазы парабиоза на холинергическую стимуляцию, можно предположить, что пептид запускал парабиотическую реакцию. Вероятно, GP формировал тормозную фазу парабиоза, создавая границы ответа организма (показатели неспецифической резистентности) на уровне нормергического типа, предупреждая, таким образом, перевозбуждение органа и возможное развитие его патологии.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа имела финансовую поддержку из средств государственного бюджета

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pomatto L.C.D., Davies K.J.A. The role of declining adaptive homeostasis in ageing. *J. Physiol.* 595(24): 7275–7309. 2017.
2. Прусаков В.М., Прусакова А.В. Динамика риска заболеваемости и адаптационного процесса как показатели воздействия локальных факторов окружающей среды на население. *Гигиена и санитария.* 97(2): 124–131. 2018. [Prusakov V.M., Prusakova A.V. The dynamics of the risk of the morbidity and the adaptation process as indices of the impact of local environmental factors on the population. *Hygiene and Sanitation.* 97(2): 124–131. 2018. (In Russ)].
3. Witard O.C., Garthe I., Phillips S.M. Dietary protein for training adaptation and body composition manipulation in track and field athletes. *Int. J. Sport. Nutr. Exerc. Metab.* 29(2): 165–174. 2019.
4. Gibson O.R., Taylor L., Watt P.W., Maxwell N.S. Cross-Adaptation: heat and cold adaptation to improve physiological and cellular responses to hypoxia. *Sports Med.* 47(9): 1751–1768. 2017.
5. Dhabhar F.S. The short-term stress response – mother nature’s mechanism for enhancing protection and performance under conditions of threat, challenge, and opportunity. *Front. Neuroendocrinol.* 49: 175–192. 2018.
6. McCarty R. Learning about stress: neural, endocrine and behavioral adaptations. *Stress.* 19(5): 449–475. 2016.

7. Кондашевская М. В. Сравнительная анализ гормональных и поведенческих изменений в моделях посттравматического стрессового расстройства и остром стрессе. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 105(7): 879–887. 2019. [*Kondashevskaya M.V.* Comparative analysis of hormonal and behavioral changes in models of post-traumatic stress disorders and acute stress. Russ. J. Physiol. 105(7): 879–887. 2019. (In Russ)].
8. Fabry Z., Raine C.S., Hart M.N. Nervous tissue as an immune compartment: the dialect of the immune response in the CNS. Immunol. Today. 15(5): 218–224. 1994.
9. Ivanov V.T. Peptides as universal biological regulators. Herald Russ. Acad. Sci. 80(5): 419–429. 2010.
10. Filatova E., Kasian A., Kolomin T., Rybalkina E., Alieva A., Andreeva L., Limborska S., Myasoedov N., Pavlova G., Slominsky P., Shadrina M. GABA, selank, and olanzapine affect the expression of genes involved in gabaergic neurotransmission in IMR-32 Cells. Front. Pharmacol. 8(FEB): 89. 2017.
11. Шевченко К.В., Нагаев И.Ю., Андреева Л.А., Шевченко В.П., Мясоедов Н.Ф. Устойчивость пролинсодержащих пептидов в биологических средах. Биомед. химия. 65(3): 180–201. 2019. [*Shevchenko K.V., Nagaev I.Yu., Andreeva L.A., Shevchenko V.P., Myasoedov N.F.* Stability of Proline-Containing Peptides in Biological Media. Biomed. Khim. 65(3): 180–201. 2019. (In Russ)].
12. Томова Т.А. Превентивное и постстрессорное влияние глицилпролина (GLY-PRO) на секреторную функцию желудка. Эксперим. клин. фармакол. 69(2): 34–36. 2006. [*Tomova T.A.* Preventive and post-stressor effects of Gly - Pro on gastric secretion in dogs. Eksp. Klin. Farmakol. 69(2): 34–36. 2006. (In Russ)].
13. Kolomin T., Morozova M., Volkova A., Shadrina M., Andreeva L., Slominsky P., Limborska S., Myasoedov N. The temporary dynamics of inflammation-related genes expression under tuftsin analog selank action. Mol. Immunol. 58(1): 50–55. 2014.
14. Томова Т.А., Замощина Т.А., Светлик М.В. Влияние глицилпролина на показатели стимулированной карбахолом желудочной секреции у крыс в условиях многокомпонентного стресса. Эксперим. клин. фармакол. 81(12): 3–6. 2018. [*Tomova T.A., Zamoshchina T.A., Svetlik M.V.* The influence of glycyproline (gly-pro) peptide on the carbachol-stimulated secretory activity of stomach under multicomponent stress conditions. Eksp. Klin. Farmakol. 81(12): 3–6. 2018. (In Russ)].
15. Selye H. Stress and the reduction of distress. J. SC Med. Assoc. 75(11): 562–566. 1979.
16. Замощина Т.А., Мелешко М.В. Ритмомодулирующие свойства лития оксипропионата на фоне электролитического разрушения правого супрахиазматического ядра гипоталамуса. Эксперим. и клин. фармакология. 68(1): 13–16. 2005. [*Zamoshchina T.A., Meleshko M.V.* The rhythm-modulant effect of lithium hydroxybutyrate on the background of electrolytic lesion of the right suprachiasmatic nucleus of hypothalamus. Eksperimental'naya i Klinicheskaya Farmakologiya. 68(1): 13–16. 2005. (In Russ)].
17. Zolotarev Yu.A., Zhuikova S.E., Ashmarin I.P., Vas'kovskii B.V., Samonina G.E. Metabolism of PGP peptide after administration via different routes. Bull. Exp. Biol. Med. 135(4): 361–364. 2003.
18. Колесникова Л.А., Оскина И.Н. Концентрация кортикостерона в крови и лейкоцитарная формула при изучении стресса у серых крыс с различными типами поведения. Известия АН Сер. Биологическая. 1: 88–92. 2003. [*Kolesnikova L.A., Os'kina I.N.* Blood corticosterone concentration and differential leukocyte count in stressed Norway rats with different modes of behavior. Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol. 1: 88–92. 2003. (In Russ)].
19. Yeltokova M., Ulyanova O., Askarov M., Chernyshova A., Kozina L. Integral hematologic indices in the evaluation of the immunologic reactivity of the organism in a patient with complication of type 1 diabetes mellitus: a case of diabetic retinopathy after autologous mesenchymal stem cell transplant. Exp. Clin. Transplant. 17(1): 234–235. 2019.
20. Garkavi L.H., Zhukova G.V., Shikhliarova A.I., Evstratova O.F., Barteneva T.A., Gudzkova T.N., Bragina M.I., Maschenko N.M., Grigorov S.V., Sakun P.G. Antitumor action and other regulatory effects of low-intensity electromagnetic and chemical factors in an experiment. Biophysics. 59(6): 944–953. 2014.
21. Mulik A., Novochadov V., Bondarev A., Lipnitskaya S., Ulesikova I., Shatyr Y. New insights into genotype-phenotype correlation in individuals with different level of general non-specific reactivity of an organism. J. Integr. Bioinform. 13(4): 295. 2016.
22. Юшков Б.Г. Система крови и адаптация организма к экстремальным воздействиям. Вестн. РАМН. 3: 3–6. 2006. [*Yushkov B.G.* The blood system and the adaptation of the organism to extreme factors. Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk. 3: 3–6. 2006. (In Russ)].
23. Semenza G.L. Involvement of oxygen-sensing pathways in physiologic and pathologic erythropoiesis. Blood. 114(10): 2015–2019. 2009.
24. Dhabhar F.S., Malarkey W.B., Neri E., McEwen B.S. Stress-induced redistribution of immune cells from barracks to battlefields: a tale of three hormones-cortisol award winner. Psychoneuroendocrinology. 37(9): 1345–68. 2012.
25. Reul J.M.H.M., Collins A., Saliba R.S., Mifsud K.R., Carter S.D., Gutierrez-Mecinas M., Qian X., Linthorst A.C.E. Glucocorticoids, epigenetic control and stress resilience. Neurobiol. Stress. 1: 44–59. 2015.
26. Меерсон Ф.З., Кругликов Р.И., Соломатина Е.С. Влияние адаптации к высотной гипоксии на фиксацию временных связей. Журн. высш. нервн. деятел. им. И.П. Павлова.

- 26(5): 1026–1031. 1976. [*Meyerson F.Z., Kruglikov R.I., Solomatina E.S.* The influence of adaptation to altitude hypoxia on the fixation of temporary connections. *Zhurn. Vyssei. Nervn. Deyatelnosti. Im. I.P. Pavlova.* 26(5): 1026–1031. 1976. (In Russ)].
27. *Rabasa C., Gagliano R., Pastor-Ciurana J., Fuentes S., Belda X., Nadal R., Armario A.* Adaptation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis to daily repeated stress does not follow the rules of habituation: A new perspective. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 56(9): 35–49. 2015.
28. *Babskaya N.E., Ashmarin I.P.* Effect of the dipeptides Gly-Pro and Pro-Gly, glycine, and proline on cardiotropic effects of acetylcholine. *Bull. Exp. Biol. Med.* 126(8): 765–767. 1998.
29. *Bakaeva Z.V., Badmaeva K.E., Sergeev I.Yu., Samonina G.E.* Effect of glyprolines on norepinephrine tone of isolated rat aortic rings. *Bull. Exp. Biol. Med.* 135(4): 334–336. 2003.

### Gly-Pro and Adaptive Reactions under Multicomponent Stress

T. A. Tomova<sup>a,\*</sup>, T. A. Zamoshchina<sup>b, c</sup>, M. V. Svetlik<sup>b, c</sup>, M. L. Sedokova<sup>a</sup>,  
A. A. Gostyukhina<sup>d</sup>, and A. M. Fatyushina<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Tomsk State Pedagogical University, Tomsk, Russia*

<sup>b</sup>*Siberian State Medical University, Tomsk, Russia*

<sup>c</sup>*National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia*

<sup>d</sup>*Siberian Federal Science-Clinical Center of Federal Medicobiological Agency, Seversk, Russia*

\*e-mail: eskovata77@mail.ru

Here, we studied the effect of the Gly-Pro peptide on the reactivity and adaptive potential during the stimulation of the parasympathetic nervous system by carbachol under the conditions of successive combined effects of three stressors: immobilization, surgical intervention, and the injection procedure. Consistent combined effect of the surgical intervention in the form of the ligature application to the pyloric stomach, the immobilization, and the saline injection procedure under the carbachol allowed to identify 4 types of responses. These types were characterized by different combinations of corticosterone contents, and separate leukocyte subpopulations. All responses were accompanied by the stress development, as indicated by the adaptation intensity index. The most prominent stress reactions were observed in animals after the immobilization and surgery, and the combined effects of saline and carbachol injections. Through the modulation of the parasympathetic link of the autonomic nervous system, and probably the direct effect on the adrenal glands, Gly-Pro changed the corticosterone levels, individual leukocyte subpopulations, and the adaptation intensity index under multicomponent stress. In the case of the simultaneous peptide and carbachol administration, it apparently activated the resistant (resistance, counteraction) pathway of adaptation, and in the case when it was administered before carbachol, – the tolerance (endurance, patience) pathway.

*Keywords:* glycyproline (Gly-Pro), multicomponent stress, immobilization, carbachol, saline, adaptive reactions, corticosterone, leukocytes

### ЦИТИРОВАТЬ:

Томова Т.А., Замошина Т.А., Светлик М.В., Седокова М.Л., Гостюхина А.А., Фатюшина А.М. Gly-Pro и адаптивные реакции при многокомпонентном стрессе. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 106(2): 231–242.

DOI: 10.31857/S0869813920020107

### TO CITE THIS ARTICLE:

Tomova T.A., Zamoshchina T.A., Svetlik M.V., Sedokova M.L., Gostyukhina A.A., Fatyushina A.M. Gly-Pro and Adaptive Reactions Under Multicomponent Stress. *Russian Journal of Physiology.* 106(2): 231–242.

DOI: 10.31857/S0869813920020107

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ НЕРЕЦЕПТОРНОЙ ТИРОЗИНКИНАЗЫ  
c-Abl В РЕГУЛЯЦИИ p53-ЗАВИСИМОЙ АКТИВАЦИИ  
ERK1/2-ЗАВИСИМОГО КАСКАДА

© 2020 г. Е. А. Олейник<sup>1</sup>, А. А. Наумова<sup>1</sup>, Д. В. Немирич<sup>2</sup>, С. Д. Николаева<sup>1</sup>,  
В. Т. Бахтеева<sup>1</sup>, А. С. Березовская<sup>1</sup>, Е. В. Черниговская<sup>1</sup>, М. В. Глазова<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Университет ИТМО, кафедра компьютерных технологий,  
Санкт-Петербург, Россия

\*E-mail: mglazova@iephb.ru

Поступила в редакцию 28.08.2019 г.

После доработки 02.12.2019 г.

Принята к публикации 03.12.2019 г.

Белок p53 является транскрипционным фактором, который в ответ на клеточный стресс запускает старение, остановку клеточного цикла, или апоптоз. Данные литературы свидетельствуют о том, что проапоптотный белок p53 участвует не только в апоптозе, но и в регуляции процессов нейрональной дифференцировки, а также оказывает активирующее влияние на ERK1/2 сигнальный каскад. Однако до сих пор нет точного ответа на вопрос, касающийся характера и механизмов влияния p53 на ERK1/2 сигнальный каскад. В данной работе мы провели анализ внутриклеточных механизмов, опосредующих активирующее влияние p53 на ERK1/2. Исследование было проведено на недифференцированных клетках линии PC12. Для кратковременной активации TrkA-рецепторов в среду добавляли фактор роста нервов NGF. Результаты показали, что активация p53 введением Nutlin-3 привела к повышению активности TrkA/cRaf/ERK каскада и нерцепторной киназы c-Abl. Ингибирование c-Abl на фоне активации p53 не изменило активность TrkA-рецепторов, но при этом сохранялась повышенная активность cRaf и ERK1/2. Однако сочетанное введение Nutlin-3 и ингибиторов c-Abl и TrkA-рецепторов привело к значительному снижению активности ERK1/2. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что p53 оказывает активирующее влияние на ERK1/2 каскад как опосредованно, в составе комплекса p53/c-Abl и активируя Trk-рецепторы, так и независимо от c-Abl, влияя на ERK1/2 каскад на уровне или выше cRaf.

*Ключевые слова:* ERK1/2, клетки PC12, NGF, TrkA-рецепторы, Nutlin-3, GNF-5, GW 441756

**DOI:** 10.31857/S0869813920020077

Изучению роли p53 посвящены тысячи исследований, но до сих пор этот белок вызывает огромный интерес. Показано, что p53 регулирует стабильность генома, апоптоз, клеточный цикл, дифференцировку, развитие, метаболизм и т.д. [1–3]. Известно, что p53 является транскрипционным фактором и контролирует экспрессию множества генов. С другой стороны, p53 также работает и как цитоплазматический белок. При этом его транскрипционная и цитоплазматическая активность зависит не только от посттрансляционных изменений, но и от прямых белковых

взаимодействий, и одним из белков, связывающихся с p53 и регулирующих его активность является c-Abl (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1). Так, показано, что c-Abl повышает транскрипционную активность p53 [4–7]. В цитоплазме белковый комплекс p53/c-Abl связывается с тирозинкиназным доменом Ttk-рецепторов, защищает p53 от MDM2-зависимой деградации и стабилизирует p53 [6, 8].

Нерецепторная тирозинкиназа c-Abl экспрессируется практически во всех типах клеток млекопитающих с максимальным уровнем в мозге, селезенке и тимусе [9]. В нейронах киназа c-Abl преимущественно локализована в цитоплазме, где связывается с мембранами, актиновыми филаментами и различными белками. Ядерная локализация c-Abl определяет ее транскрипционную активность, основанную на ее прямом связывании с С-терминальным доменом РНК-полимеразы II типа, или, как уже было сказано выше, на образовании комплекса с p53. Более того, c-Abl участвует в регуляции репарации ДНК и контроле клеточного цикла [10]. Также показана ее роль в процессах апоптоза, где она может вести себя как про- так и анти-апоптотный фактор. Нокаутирование c-Abl летально для организма (приводит к гибели на ранних сроках эмбрионального развития) [9]. В нейронах c-Abl регулирует формирование синапсов [11]. Последние исследования свидетельствуют о связи активации c-Abl с нейродегенеративными процессами, в частности, с болезнями Паркинсона и Альцгеймера. Было показано, что c-Abl может фосфорилировать белок Parkin, что приводит к его инактивации и, соответственно, к гибели дофаминергических нейронов [12]. На основании этих данных c-Abl рассматривается как потенциальная мишень в разработке новых подходов в лечении болезни Паркинсона [13, 14]. С другой стороны, показано, что c-Abl и ERK1/2-киназа (extracellular signal related protein kinase 1 and 2) функционально связаны [15]. Известно, что ERK1/2 киназа также является одним из факторов, вовлеченным в патогенез болезни Паркинсона [16, 17]. В частности, показано, что гибель дофаминергических нейронов черной субстанции непосредственно связана с повышением активности ERK1/2 в тельцах Леви на ранних стадиях развития болезни Паркинсона [16]. При этом гибель дофаминергических нейронов опосредована активацией p53-зависимого пути апоптоза [18]. В свою очередь опубликованные данные свидетельствуют об активирующем влиянии p53 на ERK1/2-сигнальный каскад. Было показано, что в клетках меланомы, экспрессирующих мутантную, неактивную, форму p53 отмечается снижение активности ERK1/2 [19]. На различных клеточных линиях также были получены аналогичные результаты, при этом было показано, что функционально активные Ras и cRaf являются необходимыми посредниками p53-зависимой активации каскада [20–23]. С другой стороны, активирующее влияние p53 на ERK1/2 каскад может быть опосредовано c-Abl. На культуре клеток PC12 было показано, что при NGF-стимулированной дифференцировке белок p53 является необходимым фактором для стимуляции ERK1/2 [24]. Таким образом, в разных типах клеток влияние p53 на активность ERK1/2 одинаково, однако механизм выявленного эффекта до конца не выяснен. Предполагается, что эти эффекты опосредованы транскрипционной активностью p53, поскольку мутантная форма p53, не обладающая транскрипционной активностью, снижает активность ERK1/2, а ингибирование транскрипционной активности p53 введением специфического блокатора Pifithrin-alfa снижает уровень фосфорилирования ERK1/2 *in vivo* [20, 25–27]. Важно подчеркнуть, что c-Abl, так же, как и p53, принимает участие в регуляции активности ERK1/2 каскада как в норме, так и при различных патологических состояниях клетки [28, 29].

Таким образом, наличие функциональных связей между p53 и cAbl, p53 и ERK1/2, и cAbl и ERK1/2 объединяет их в тесно связанное функциональное трио, однако это третичное взаимодействие до сих пор остается не изученным. В данной работе было проведено исследование внутриклеточных механизмов, опосредую-

щих влияние p53 на активность ERK1/2 в экспериментах с использованием различных сочетаний блокаторов и/или активаторов p53, c-Abl и членов ERK1/2 каскада. В качестве модели исследования мы выбрали клетки линии PC12, которые являются широко применяемым объектом для изучения регуляции функциональной активности дофаминергических нейронов. Полученные результаты показали, что p53-зависимая активация ERK каскада опосредована взаимодействием p53, TrkA и протеинкиназы c-Abl.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Роль протеинкиназы c-Abl в опосредовании влияния p53 на активацию ERK каскада исследовалась на клеточной линии PC12 (Sigma-Aldrich). Данную клеточную линию получают из феохромоцитомы крыс – опухоли, представленной хромаффинными клетками мозгового вещества надпочечников, они секретируют дофамин и широко используются как модель дофаминергических нейронов, а также широко применяются в исследованиях механизмов внутриклеточной сигнализации. Культуры клеток PC12 инкубировали в среде DMEM (#D5796, Sigma-Aldrich), с добавлением 10% лошадиной сыворотки (HS) (#H1138, Sigma-Aldrich) и 5% сыворотки плодов коровы (FBS) (#F9665, Sigma-Aldrich). Клетки содержались в инкубаторе с подачей 5% CO<sub>2</sub> при температуре 37°C с 95%-ной влажностью. Клетки инкубировались на планшетах, покрытых коллагеном IV типа. Смена среды производилась каждые два дня. Исследуемые вещества добавляли в среду на 5-й день инкубации по достижению 70% конfluenceности культуры. Каждая серия экспериментов включала следующие экспериментальные группы:

1. Контроль – введение DMSO;
2. Введение селективного активатора p53 Nutlin-3 (20 мкМ; #3984/10, Tocris);
3. Сочетанное введение Nutlin-3 (20 мкМ) и селективного аллостерического ингибитора c-Abl GNF-5 (10 мкМ; #4908/10, Tocris);
4. Сочетанное введение Nutlin-3 (20 мкМ) и селективного ингибитора TrkA-рецепторов GW 441756 (50 мкМ; 2238/10, Tocris);
5. Сочетанное введение Nutlin-3 (20 мкМ), GNF-5 (10 мкМ) и GW 441756 (50 мкМ).

Известно, что клетки PC12 как в дифференцированном, так и в недифференцированном состоянии экспрессируют не только катехоламины, c-Abl, p53 и белки ERK1/2 MAPK каскада, но также TrkA-рецепторы фактора роста нервов NGF. При этом связывание TrkA-рецепторов с NGF приводит к быстрому фосфорилированию тирозинкиназного домена TrkA-рецептора и к последующей активации ERK1/2. При длительном введении NGF постоянная активация TrkA/ERK1/2 каскада вызывает остановку клеточного цикла и дифференцировку клеток PC12 [30]. Для активации TrkA-рецепторов в недифференцированных клетках NGF (100 нг/мл; #01-125, Millipore) добавляли в среду за 15 мин перед добавлением исследуемых веществ. Клетки инкубировали 3 ч и затем собирали в лизатном буфере для дальнейшего Вестерн-блот анализа. Было проведено 4 серии экспериментов с двойным повтором каждой экспериментальной группы.

### *Вестерн-блот анализ*

Белки в пробах разделяли с помощью электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле по Лэммли (SDS-PAGE) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Для Вестерн-блот анализа были использованы следующие антитела против: cRaf1 (1 : 1000; Cell Signaling, #9422), p-cRaf1 (Ser3381 : 1000; Cell Signaling, #2330), ERK1/2 (1 : 10000; Cell Signaling, #9102), pERK1/2 (Thr202/Thr204; 1 : 10 000; Cell Signaling, #4376); p53 (1 : 1000; Cell Signaling, #2524), p-p53 (Ser392; 1 : 500; Santa

Cruz, #sc-51960), p-TrkA (Tyr496; 1 : 500, Santa Cruz, #sc-8058), TrkA (1 : 500, Santa Cruz, #sc-7268), p-c-Abl (Tyr393/412; 1 : 1000, Sigma, #SAB4504330) и Actin (1 : 2000, abcam, # ab3280). Визуализация результатов проводилась при помощи SuperSignal@West Dura Extended Duration Substrate (#34075, ThermoFisher Scientific).

После промывок в TBST-Т мембраны помещали в раствор вторых антител против иммуноглобулина G кролика, конъюгированные с биотином (1 : 3000, Sigma) или против иммуноглобулина G мыши, конъюгированные с биотином (1 : 3000, Sigma) в TBS-Т. Затем мембраны инкубировали с раствором стрептавидин-пероксидазы (Sigma). Визуализация результатов проводилась при помощи ECL plus системы (Amersham Biosciences).

Денситометрический анализ количества белка осуществлялся в программе ImageJ после сканирования пленок, полученных в результате как минимум трех экспериментов. Уровень серого специфических бендов был скорректирован по фоновому сигналу и нормирован по уровню GAPDH, используемого для определения общего количества белка в пробе. Также в анализе учитывалась площадь специфических бендов.

#### *Статистическая обработка результатов*

Обработка полученных данных производилась при помощи непараметрического теста ANOVA (критерий Краскела—Уоллиса) и U-критерия Манна—Уитни в коммерческой программе GraphPad Prism7. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Достоверными считались отличия при уровне значимости  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Анализ уровня активности p53*

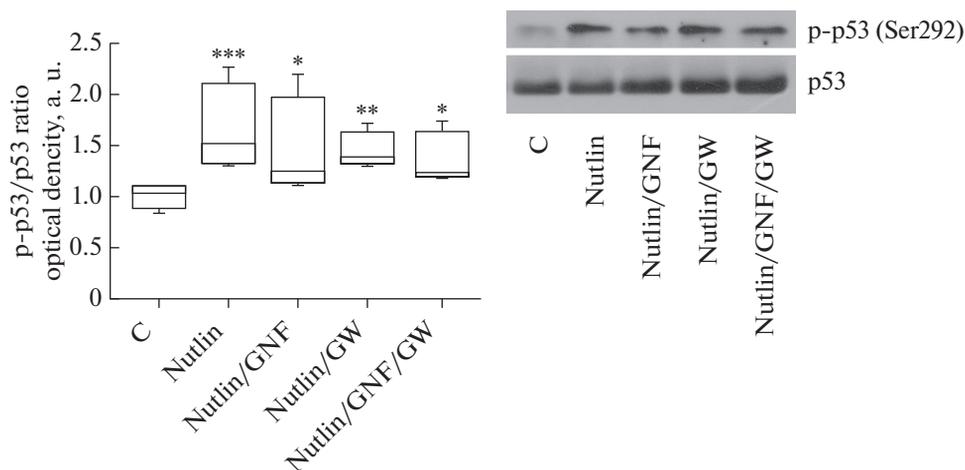
Полученные данные показали, что при введении Nutlin-3, как и ожидалось, наблюдалось достоверное увеличение уровня фосфорилирования p53 (рис. 1). В группах с сочетанным введением активатора p53 и ингибиторов c-Abl и TrkA также наблюдалось достоверное повышение уровня активности белка p53 относительно контроля (рис. 1). Мы полагаем, что активация p53 в группах с введением ингибитора TrkA-рецепторов связана с активацией NGF нейротрофинового рецептора p75<sup>NTR</sup>, что, как известно, приводит к активации p53.

### *Активация p53 повышает активность c-Abl*

При введении активатора p53 происходит значительное увеличение активности протеинкиназы c-Abl (рис. 2). При этом введение ингибитора c-Abl GNF-5 на фоне активации p53 не привело к изменению активности c-Abl (рис. 2). Также активность c-Abl не изменялась и при сочетанном введении Nutlin-3, GNF-5 и ингибитора TrkA-рецепторов GW 441756 (рис. 2). Однако введение и ингибитора TrkA-рецепторов GW 441756 и ингибитора c-Abl GNF-5 на фоне активации p53 привело к достоверному снижению активности c-Abl (рис. 2).

### *p53 повышает активность TrkA-рецепторов и членов ERK1/2-зависимого сигнального каскада*

Анализ уровня активности TrkA-рецепторов показал, что активация p53 введением Nutlin-3 значительно повышала уровень фосфорилирования TrkA (рис. 3А). Однако ингибирование c-Abl на фоне активации p53 не изменило активность TrkA-рецепторов по сравнению с контрольными значениями, но была достоверно



**Рис. 1.** Анализ активности белка p53 в клетках линии PC12. Относительное содержание фосфорилированного p53 по Ser292 (p-p53) оценивалось методом Вестерн-блот анализа. Нормировка количества белка в пробе производилась по общей форме p53. По оси ординат – оптическая плотность, измеренная в условных единицах; по оси абсцисс – исследуемые группы: C – контроль, Nutlin – введение Nutlin-3 20 мкМ, Nutlin/GNF – сочетанное введение Nutlin 3 (20 мкМ) и GNF-5 (10 мкМ), Nutlin/GW – сочетанное введение Nutlin 3 (20 мкМ) и GW 441746 (50 мкМ), Nutlin/GNF/GW – сочетанное введение Nutlin 3 (20 мкМ), GNF-5 (10 мкМ) и GW 441746 (50 мкМ). Полученные данные представлены в виде медиан и интерквартильных размахов. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  по сравнению с контрольной группой.

**Fig. 1.** Analysis of p53 activity in the PC12 cells p53 phosphorylation at Ser292 (p-p53) was estimated using the Western blot analysis and calculated as p-p53 to p53 ratio. Y axis – optical density in arbitrary units. X axis – experimental groups: C – control, Nutlin – treatment with Nutlin-3 (20 мкМ), Nutlin/GNF – treatment with Nutlin 3 (20 μM) and GNF-5 (10 μM), Nutlin/GW – treatment with Nutlin 3 (20 μM) and GW 441746 (50 μM), Nutlin/GNF/GW – treatment with Nutlin 3 (20 μM), GNF-5 (10 μM) and GW 441746 (50 μM). Data are shown as box-plots. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  versus control.

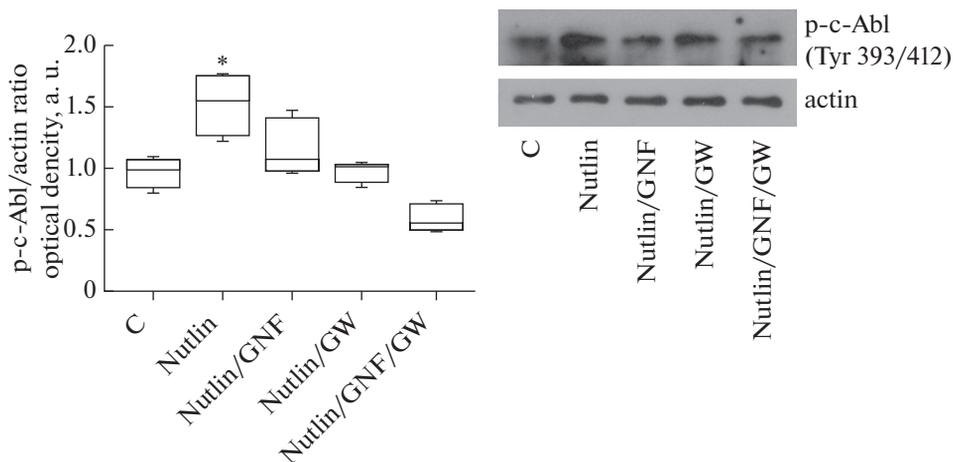
ниже, чем при введении Nutlin-3 (рис. 3A). При этом ингибирование TrkA как на фоне активации p53, так и при сочетанном введении Nutlin-3 и GNF-5, как и ожидалось, привело к значительному снижению уровня фосфорилирования TrkA (рис. 3A).

Под влиянием повышения активированного p53 происходило увеличение фосфо-c-Raf. Также увеличение уровня активности cRaf наблюдалось в группе с сочетанным введением Nutlin-3 и GNF-5 (рис. 3B). В группах с введением GW 441756 наблюдалась тенденция к снижению уровня фосфорилирования cRaf относительно контрольной группы, однако это снижение было не достоверным (рис. 3B).

Далее мы проанализировали уровень активности ERK1/2. Результаты показали, что введение блокатора TrkA привело к достоверному снижению активных форм ERK1/2 (рис. 3C). При этом в группе с введением активатора p53, а также в группе с сочетанным введением Nutlin-3 и GNF-5 наблюдалось достоверное увеличение уровня активности ERK1/2 (рис. 3C).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

Полученные в ходе данного исследования данные показали, что влияние p53 на ERK1/2 каскад во многом зависит не только от активности p53, но и от уровня ак-

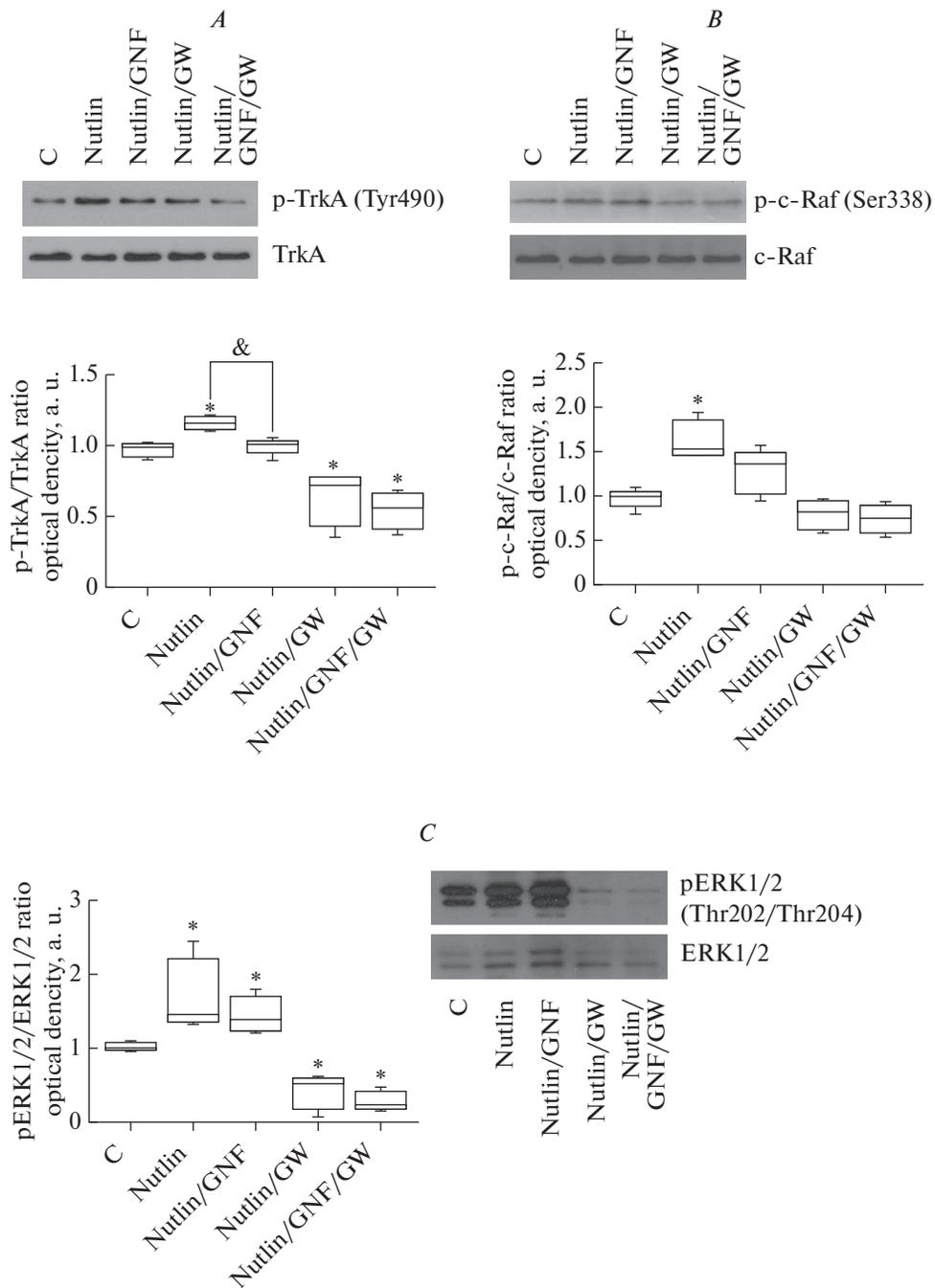


**Рис. 2.** Оценка уровня фосфорилирования нереперторной тирозинкиназы c-Abl. Содержание фосфорилированной киназы c-Abl по Tyr393/412 (p-c-Abl) в клетках PC12 было исследовано с помощью Вестерн-блот анализа. В качестве контроля количества белка в пробах использовался актин. По оси ординат – оптическая плотность, измеренная в условных единицах; по оси абсцисс – исследуемые группы: C – контроль, Nutlin – введение Nutlin-3 (20 мкМ), Nutlin/GNF – сочетанное введение Nutlin 3 (20 мкМ) и GNF-5 (10 мкМ), Nutlin/GW – сочетанное введение Nutlin 3 (20 мкМ) и GW 441746 (50 мкМ), Nutlin/GNF/GW – сочетанное введение Nutlin 3 (20 мкМ), GNF-5 (10 мкМ) и GW 441746 (50 мкМ). Данные представлены в виде медиан и интерквартильных размахов. \* $p < 0.05$  по сравнению с контрольной группой.

**Fig. 2.** Estimation of the non-receptor tyrosine kinase c-Abl phosphorylation c-Abl at Tyr393/412 (p-c-Abl) phosphorylation was estimated using the Western blot analysis and calculated as p-c-Abl to actin ratio. Y axis – optical density in arbitrary units. X axis – experimental groups: C – control, Nutlin – treatment with Nutlin-3 (20 мкМ), Nutlin/GNF – treatment with Nutlin 3 (20 мкМ) and GNF-5 (10 мкМ), Nutlin/GW – treatment with Nutlin 3 (20 мкМ) and GW 441746 (50 мкМ), Nutlin/GNF/GW – treatment with Nutlin 3 (20 мкМ), GNF-5 (10 мкМ) and GW 441746 (50 мкМ). Data are shown as box-plots. \*  $p < 0.05$ , versus control. #  $p < 0.05$ , versus Nutlin.

**Рис. 3.** Анализ активности TrkA-рецепторов и членов ERK1/2 сигнального каскада. Оценка содержания фосфорилированных форм рецепторов TrkA (p-TrkA по Tyr490) (A), c-Raf (p-c-Raf по Ser 338) (B) и ERK1/2-киназ (p-ERK1/2 по Thr202/Thr204) (C) в клетках PC12 проводилась с применением Вестерн-блот анализа. Для нормировки количества белка в пробе были использованы общие формы TrkA (A), c-Raf (B) и ERK1/2 (C). По оси ординат – оптическая плотность, измеренная в условных единицах; по оси абсцисс – исследуемые группы: C – контроль, Nutlin – введение Nutlin-3 (20 мкМ), Nutlin/GNF – сочетанное введение Nutlin 3 (20 мкМ) и GNF-5 (10 мкМ), Nutlin/GW – сочетанное введение Nutlin 3 (20 мкМ) и GW 441746 (50 мкМ), Nutlin/GNF/GW – сочетанное введение Nutlin 3 (20 мкМ), GNF-5 (10 мкМ) и GW 441746 (50 мкМ). Данные представлены в виде медиан и интерквартильных размахов. \*  $p < 0.05$  по сравнению с контрольной группой. &  $p < 0.05$  при сравнении уровня активности TrkA между группами с введением Nutlin-3 и группой с сочетанным введением Nutlin-3 и GW 441746 (Манн–Уитни U-тест).

**Fig. 3.** Analysis of the TrkA receptor and members of ERK1/2 cascade activity Estimation of phosphorylated TrkA (p-TrkA Tyr490) (A), c-Raf (p-c-Raf Ser 338) (B) and ERK1/2 (p-ERK1/2 Thr202/Thr204) was performed using the Western blot analysis. TrkA, c-Raf and ERK1/2 phosphorylation was calculated as a ratio between phosphorylated and total studied proteins. Y axis – optical density in arbitrary units. X axis – experimental groups: C – control, Nutlin – treatment with Nutlin-3 (20 мкМ), Nutlin/GNF – treatment with Nutlin 3 (20 мкМ) and GNF-5 (10 мкМ), Nutlin/GW – treatment with Nutlin 3 (20 мкМ) and GW 441746 (50 мкМ), Nutlin/GNF/GW – treatment with Nutlin 3 (20 мкМ), GNF-5 (10 мкМ) and GW 441746 (50 мкМ). Data are shown as box-plots. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  versus control. &  $p < 0.05$  Nutlin-3 vs Nutlin-3/GW 441746 (by Mann-Whitney test).

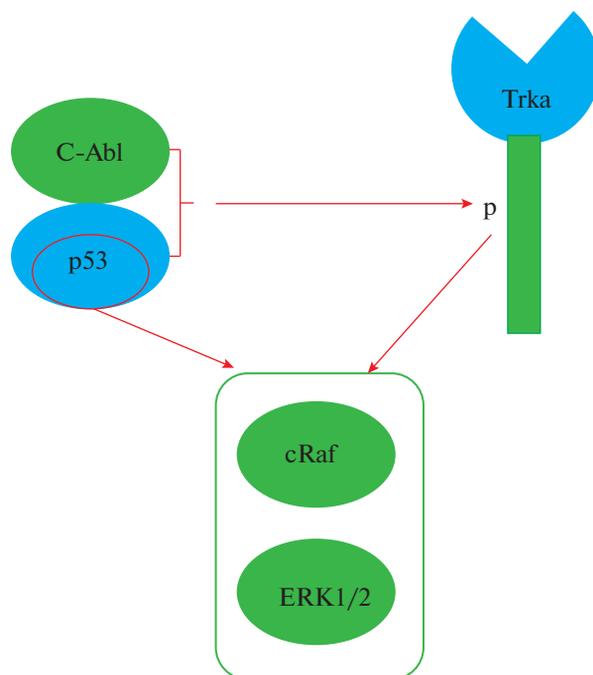


тивности нейротрофиновых рецепторов и нерцепторной протеинкиназы c-Abl. Наши данные показали, что на фоне повышения активности p53 также происходит повышение активности c-Abl. Одним из объяснений данного влияния является прямое белок-белковое взаимодействие p53 и c-Abl, которое приводит к переходу киназного домена c-Abl в открытую активную конформацию [6]. С другой стороны, мы показали, что ингибирование активности c-Abl приводит к де-фосфорилированию p53. Однако данных литературы, свидетельствующих о c-Abl-зависимом фосфорилировании p53 мы не обнаружили. Было показано, что c-Abl повышает транскрипционную активность p53 [5, 6]. Также известно, что c-Abl фосфорилирует белок p75, относящийся к семейству белков p53 [5], а формирование комплекса p53/c-Abl стабилизирует активность p53 [6]. На основании полученных нами данных о снижении уровня фосфорилирования p53 при введении ингибитора c-Abl и данных литературы о c-Abl-зависимом фосфорилировании p75 можно предположить, что протеинкиназа c-Abl не только стабилизирует белок p53, но и принимает участие в его фосфорилировании. Таким образом, мы показали, что связь между p53 и c-Abl двухсторонняя: не только c-Abl регулирует активность p53, но и от уровня активности p53 может зависеть активность c-Abl.

Известно, что дифференцировка клеток линии PC12 по нейрональному типу происходит за счет активации ERK1/2 зависимого каскада при введении NGF [30], что также сопровождается активацией белка p53 [24]. С другой стороны, в цитоплазме белковый комплекс p53/c-Abl связывается с тирозинкиназным доменом Trk-рецепторов, приводя к активации ERK1/2 каскада [6, 8]. Кроме того, было показано, что эффект p53 на ERK1/2 каскад может быть опосредован взаимодействиями только одного белка p53 с рецептором TrkA [31, 32]. Однако имеются данные, свидетельствующие о позитивном влиянии p53 на активность ERK1/2 без участия нейротрофиновой стимуляции Trk-рецепторов [20, 23]. При этом авторы показали, что p53 активирует ERK-зависимый MAPK каскад на уровне или выше cRaf-киназы. Мы показали, что при введении ингибитора c-Abl на фоне активации p53 в группах с введением NGF наблюдается снижение уровня фосфорилирования TrkA-рецепторов по сравнению с введением только Nutlin-3. Этот факт позволяет предположить, что протеинкиназа c-Abl действительно способствует активации TrkA-рецепторов при участии p53. С другой стороны, активация c-Raf и ERK1/2 при сочетанном введении Nutlin-3 и GNF-5 свидетельствует о том, что при активации TrkA-рецепторов p53 может оказывать влияние на активность ERK1/2-сигнального каскада на уровне или выше c-Raf и независимо от c-Abl.

Важно отметить, что p53, c-Abl и ERK1/2 вовлечены в развитие нейродегенеративных болезней, в частности, болезни Хантингтона, Альцгеймера и Паркинсона [12, 18, 33, 34]. На сегодняшний день в терапии в основном раковых заболеваний уже применяются или разрабатываются препараты, основанные на точечном влиянии на p53, c-Abl и ERK1/2 [13, 35–38]. Однако действие применяемых препаратов ограничено и в ряде случаев малоэффективно, а в большинстве случаев также развивается толерантность к применяемым препаратам. Логично предположить, что малая эффективность препаратов, направленных только на одну мишень, связана с изменением активности как минимум одного или обоих составляющих данного комплекса.

Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что p53 оказывает активирующее влияние на ERK1/2 каскад как опосредованно, в составе комплекса p53/c-Abl и активируя Trk-рецепторы, так и независимо от c-Abl, влияя на ERK1/2 каскад на уровне или выше cRaf (рис. 4). Также на основании полученных нами данных можно предположить, что применение различных сочетаний блокаторов



**Рис. 4.** Предполагаемая схема p53 зависимой регуляции активности ERK1/2 сигнального каскада.

**Fig. 4.** Hypothetical scheme of p53-dependent regulation of the ERK1/2 signaling.

и/или активаторов p53, c-Abl и членов ERK1/2 каскада может стать основой для разработки комплексной терапии для лечения нейродегенеративных состояний.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Гос.задания по теме № 075-00776-19-02 и при использовании ЦКП ИЭФБ РАН № 441590.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ko L.J., Prives C.* p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* 10(9): 1054–1072. 1996.
2. *Sola S., Aranha M.M., Rodrigues C.M.* Driving apoptosis-relevant proteins toward neural differentiation. *Mol. Neurobiol.* 46(2): 316–331. 2012.
3. *Vousden K.H., Prives C.* Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell.* 137(3): 413–431. 2009.
4. *Jing Y., Wang M., Tang W., Qi T., Gu C., Hao S., Zeng X.* c-Abl tyrosine kinase activates p21 transcription via interaction with p53. *J. Biochem.* 141(5): 621–626. 2007.
5. *Kharbanda S., Yuan Z.M., Weichselbaum R., Kufe D.* Determination of cell fate by c-Abl activation in the response to DNA damage. *Oncogene.* 17(25): 3309–3318. 1998.
6. *Levav-Cohen Y., Goldberg Z., Zuckerman V., Grossman T., Haupt S., Haupt Y.* C-Abl as a modulator of p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331(3): 737–749. 2005.
7. *Nie Y., Li H.H., Bula C.M., Liu X.* Stimulation of p53 DNA binding by c-Abl requires the p53 C terminus and tetramerization. *Mol. Cell Biol.* 20(3): 741–748. 2000.
8. *Brown A., Browes C., Mitchell M., Montano X.* c-abl is involved in the association of p53 and trk A. *Oncogene.* 19(26): 3032–3040. 2000.
9. *Tsygankov A.Y.* Non-receptor protein tyrosine kinases. *Front. Biosci.* 8: s595–635. 2003.

10. Raitano A.B., Whang Y.E., Sawyers C.L. Signal transduction by wild-type and leukemogenic Abl proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1333(3): F201–F216. 1997.
11. Wang J.Y. The capable ABL: what is its biological function? *Mol. Cell Biol.* 34(7): 1188–1197. 2014.
12. Ko H.S., Lee Y., Shin J.H., Karuppagounder S.S., Gadad B.S., Koleske A.J., Pletnikova O., Troncoso J.C., Dawson V.L., Dawson T.M. Phosphorylation by the c-Abl protein tyrosine kinase inhibits parkin's ubiquitination and protective function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107(38): 16691–16696. 2010.
13. Abushouk A.I., Negida A., Elshenawy R.A., Zein H., Hammad A.M., Menshawy A., Mohamed W.M.Y. C-Abl Inhibition; A Novel Therapeutic Target for Parkinson's Disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 17(1): 14–21. 2018.
14. Zhou H., Yamamura Y., Ogawa M., Tsuji R., Tsuchiya K., Kasahara J., Goto S. c-Abl Inhibition Exerts Symptomatic Antiparkinsonian Effects Through a Striatal Postsynaptic Mechanism. *Front. Pharmacol.* 9: 1311. doi: eCollection 2018  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01311>
15. Long J., Liao G., Yinna Wang Y., Tang D.D. Specific protein 1, c-Abl and ERK1/2 form a regulatory loop. *J. Cell Science.* 132. doi: 2019  
<https://doi.org/10.1242/jcs.222380>
16. Dzamko N., Zhou J., Huang Y., Halliday G.M. Parkinson's disease-implicated kinases in the brain; insights into disease pathogenesis. *Front. Mol. Neurosci.* 7, article 57.  
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00057>
17. Bohush A., Niewiadomska G., Filippek A. Role of Mitogen Activated Protein Kinase Signaling in Parkinson's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 2973; doi: 2018  
<https://doi.org/10.3390/ijms19102973>
18. Szybińska A., Leśniak W. P53 Dysfunction in Neurodegenerative Diseases – The Cause or Effect of Pathological Changes? *Aging and Disease.* 8(4): 506–518. 2017.
19. Gulati A.P., Yang Y.M., Harter D., Mukhopadhyay A., Aggarwal B.B., Benzil D.L., Whysner J., Albino A.P., Murali R., Jhanwar-Uniyal M. Mutant human tumor suppressor p53 modulates the activation of mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB, but not c-Jun N-terminal kinase and activated protein-1. *Mol. Carcinog.* 45(1): 26–37. 2006.
20. Lee S.W., Fang L., Igarashi M., Ouchi T., Lu K.P., Aaronson S.A. Sustained activation of Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase cascade by the tumor suppressor p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97(15): 8302–8305. 2000.
21. Sablina A.A., Chumakov P.M., Levine A.J., Kopnin B.P. p53 activation in response to microtubule disruption is mediated by integrin-Erk signaling. *Oncogene.* 20(8): 899–909. 2001.
22. Singh S., Upadhyay A.K., Ajay A.K., Bhat M.K. p53 regulates ERK activation in carboplatin induced apoptosis in cervical carcinoma: a novel target of p53 in apoptosis. *FEBS Lett.* 581(2): 289–295. 2007.
23. Zosen D.V., Glazova M.V. The role of the interaction of p53 and the MAPK cascade in controlling neuronal differentiation in the PC12 cell line. *Neurosci. Behav. Physiol.* 46(5): 559–565. 2016
24. Zhang J., Yan W., Chen X. p53 is required for nerve growth factor-mediated differentiation of PC12 cells via regulation of TrkA levels. *Cell Death Differ.* 13(12): 2118–2128. 2006.
25. Wu G.S. The functional interactions between the p53 and MAPK signaling pathways. *Cancer Biol. Ther.* 3(2): 156–161. 2004.
26. Dorofeeva N.A., Chernigovskaya E.V., Nikitina L.S., Glazova M.V. Effect of p53 inhibition by pifithrin-alpha on functional activity of vasopressin neurones in rat hypothalamus. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 99(8): 901–916. 2013.
27. Nikitina L.S., Dorofeeva N.A., Kirillova O.D., Korotkov A.A., Glazova M., Chernigovskaya E.V. Role of the ERK signaling pathway in regulating vasopressin secretion in dehydrated rats. *Bio-tech. Histochem.* 89(3): 199–208. 2014.
28. Cilloni D., Saglio G. Molecular pathways: BCR-ABL. *Clin. Cancer Res.* 18(4): 930–937. 2012.
29. Jain A., Tripathi R., Turpin C.P., Wang C., Plattner R. Abl kinase regulation by BRAF/ERK and cooperation with Akt in melanoma. *Oncogene.* 36(32): 4585–4596. 2017.
30. Vaudry D., Stork P.J., Lazarovici P., Eiden L.E. Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections. *Science.* 296(5573): 1648–1649. 2002.
31. Montano X. P53 associates with trk tyrosine kinase. *Oncogene.* 15(3): 245–256. 1997.
32. Browes C., Rowe J., Brown A., Montano X. Analysis of trk A and p53 association. *FEBS Lett.* 497(1): 20–25. 2001.
33. Bowles K.R., Jones L. Kinase signalling in Huntington's disease. *J. Huntingtons Dis.* 3, 89–123. 2014.
34. Schapira A.H., Olanow C.W., Greenamyre J.T., Bezdard E. Slowing of neurodegeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease: future therapeutic perspectives. *Lancet.* 384. 545–555. 2014.

35. Burgess A., Chia K.M., Haupt S., Thomas D., Haupt Y., Lim E. Clinical Overview of MDM2/X-Targeted Therapies. *Front Oncol.* 2016. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00007>
36. Liu F., Yang X., Geng M., Huang M. Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy. *Acta Pharm. Sin. B.* 8: 552–562. 2018.
37. Rossari F., Minutolo F., Orciuolo E. Past, present, and future of Bcr-Abl inhibitors: from chemical development to clinical efficacy. *J. Hematol. Oncol.* 11(1): 84. 2018.
38. Khorasanizadeh, M., Eskian, M., Gelfand, E.W., Rezaei, N. Mitogen-activated protein kinases as therapeutic targets for asthma. *Pharmacol. Ther.* 174: 112–126. 2017.

### The Role of Non-Receptor Tyrosine Kinase c-Abl in the Regulation of p53-Dependent Activation of ERK1/2 Signaling Cascade

E. A. Oleynik<sup>a</sup>, A. A. Naumova<sup>a</sup>, D. V. Nemirich<sup>b</sup>, S. D. Nikolaeva<sup>a</sup>, V. T. Bachtееva<sup>a</sup>,  
A. S. Berezovskaya<sup>a</sup>, E. V. Chernigovskaya<sup>a</sup>, and M. V. Glazova<sup>a</sup>, \*

<sup>a</sup>*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry Russian Academy of Sciences, St-Petersburg, Russia*

<sup>b</sup>*ITMO University, St-Petersburg, Russia*

\**e-mail: mglazova@iephb.ru*

Protein p53 is a transcription factor that induces aging, cell cycle arrest and apoptosis in response to cell stress. Published findings suggest that proapoptotic protein p53 is involved not only in apoptosis, but also in the regulation of neural differentiation along with the activation of ERK1/2 signaling cascade. However, the nature and the mechanisms of p53 effects on ERK1/2 are not completely understood. Here, we examine the intracellular mechanisms underlying p53-dependent activation of ERK1/2. The study was performed on undifferentiated PC12 cells. For short-term activation of TrkA receptors the cells were incubated with NGF. Our results demonstrate that p53 activation with Nutlin-3 results in the increase of TrkA/cRaf/ERK cascade and c-Abl activity. c-Abl inhibition under p53 activation had no effect on TrkA receptors, but was associated with enhanced activity of cRaf and ERK1/2. At the same time, combined application of Nutlin-3 with c-Abl and TrkA inhibitors evoked considerable decrease of ERK1/2 activity. Our results suggest that p53 activates ERK1/2 cascade either in complex with c-Abl or in c-Abl-independent manner by modulating the c-Raf or upstream targets.

*Keywords:* ERK1/2, PC12 cells, NGF, TrkA- receptors, Nutlin-3, GNF-5, GW 441756

#### ЦИТИРОВАТЬ:

Олейник Е.А., Наумова А.А., Немирич Д.В., Николаева С.Д., Бахтеева В.Т., Березовская А.С., Черниговская Е.В., Глазова М.В. Исследование роли нерецепторной тирозинкиназы c-Abl в регуляции p53-зависимой активации ERK1/2-зависимого каскада. *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова.* 106(2): 243–253.

DOI: 10.31857/S0869813920020077

#### TO CITE THIS ARTICLE:

Oleynik E.A., Naumova A.A., Nemirich D.V., Nikolaeva S.D., Bachtееva V.T., Berezovskaya A.S., Chernigovskaya E.V., Glazova M.V. The Role of Non-Receptor Tyrosine Kinase c-Abl in the Regulation of p53-Dependent Activation of ERK1/2 Signaling Cascade. *Russian Journal of Physiology.* 106(2): 243–253.

DOI: 10.31857/S0869813920020077

**РАННИЕ СТЕРОИДОГЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ ГОНАДОТРОПИНА  
И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО АГОНИСТА РЕЦЕПТОРА  
ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА ПРИ ВВЕДЕНИИ  
ИХ СУБМАКСИМАЛЬНЫХ ДОЗ САМЦАМ КРЫС**

© 2020 г. А. А. Бахтюков<sup>1</sup>, К. В. Деркач<sup>1</sup>, А. О. Шпаков<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,  
Санкт-Петербург, Россия

\*E-mail: alex\_shpakov@list.ru

Поступила в редакцию 06.11.2019 г.

После доработки 04.12.2019 г.

Принята к публикации 06.12.2019 г.

Рецепторы лютеинизирующего гормона (ЛГ) играют ключевую роль в регуляции стероидогенеза в семенниках. Они могут быть активированы гонадотропинами — ЛГ и хорионическим гонадотропином человека (ХГЧ), и низкомолекулярными агонистами, в том числе производными тиено-[2,3-*d*]пиримидинов, которые связываются с аллостерическим сайтом, расположенным в трансмембранном канале рецептора ЛГ. Ранее были выявлены различия в стероидогенных эффектах гонадотропинов и тиено-[2,3-*d*]пиримидинов в экспериментах *in vitro* и при длительном введении самцам крыс, но их ранние стероидогенные эффекты в семенниках, в том числе при введении в субмаксимальных дозах, практически не изучены. Целью работы было изучить влияние однократного введения самцам крыс субмаксимальных доз ХГЧ и тиено-[2,3-*d*]пиримидинового производного ТР03 на уровень тестостерона (Т) в крови и на экспрессию генов стероидогенных белков и паттерн стероидных гормонов, прекурсоров Т, в семенниках в течение 5 ч после такой обработки. Показано, что ТР03 (15 мг/кг) и ХГЧ (50 МЕ/крысу) через 30 мин после введения крысам повышают интратестикулярные уровни Т и его прекурсоров — 17-гидроксипрогестерона и андростендиона, а также снижают уровень прегненолона, что указывает на его расходование для синтеза прогестерона. Экспрессия генов стероидогенных белков значительно менялась через 3 ч после введения препаратов — при введении ТР03 и ХГЧ повышалась экспрессия генов *Star* и *Cyp17a1*, кодирующих транспортный белок StAR и цитохром P450-17 $\alpha$ , ключевые компоненты системы стероидогенеза. При этом выявлены различия между уровнем экспрессии гена *Hsd17b*, кодирующего дегидрогеназу HSD17 $\beta$ , содержание которой было выше в группе с обработкой ХГЧ в сравнении с группой, обработанной ТР03. Через 1 и 3 ч после обработки крыс ХГЧ прирост уровня Т в крови был выше, чем в группе с обработкой ТР03, но уже через 5 ч уровни Т в обеих группах крыс были сопоставимыми, что обусловлено ослаблением стероидогенного эффекта ХГЧ при сохранении такового ТР03. Таким образом, несмотря на сходство ранних стероидогенных эффектов ТР03 и ХГЧ, применяемых в субмаксимальных дозах, уже в первые часы после их введения крысам начинают выявляться особенности их влияния на тестикулярный стероидогенез, которые при длительном введении приводят к существенным различиям в их стероидогенной активности.

**Ключевые слова:** низкомолекулярный агонист, рецептор лютеинизирующего гормона, стероидогенез, тестостерон, семенники, хорионический гонадотропин, белок StAR, цитохром P450-17 $\alpha$

DOI: 10.31857/S0869813920020028

В настоящее время во вспомогательных репродуктивных технологиях и для коррекции гипогонадотропного гипогонадизма и других репродуктивных дисфункций, ассоциированных со снижением продукции половых стероидных гормонов, широко используют препараты гонадотропинов – рекомбинатного лютеинизирующего гормона (ЛГ) и рекомбинантных и мочевых форм хорионического гонадотропина человека (ХГЧ). Однако при использовании в медицине гонадотропины имеют ряд серьезных недостатков, среди которых сравнительно быстрое развитие к ним резистентности тканей семенников и яичников и, как следствие, ослабление стероидогенного ответа при продолжительном применении, необходимость исключительно парентерального применения и иммуногенность, особенно при использовании недостаточно очищенных препаратов ХГЧ [1]. Многие побочные эффекты гонадотропинов обусловлены низкой избирательностью ЛГ и ХГЧ в отношении определенных внутриклеточных сигнальных каскадов, поскольку в условиях длительного воздействия на рецепторы ЛГ они активируют не только цАМФ-зависимые пути, нацеленные в основном на стимуляцию стероидогенеза, но и  $\beta$ -аррестиновые пути, ведущие к десенситизации рецептора ЛГ и опосредующие снижение чувствительности клеток-мишеней к гонадотропинам [2].

Альтернативой гонадотропинам являются низкомолекулярные агонисты рецептора ЛГ, которые в отличие от ЛГ и ХГЧ взаимодействуют не с высокоаффинным ортостерическим сайтом, расположенным в значительном по размеру внеклеточном домене рецептора, а с его аллостерическим сайтом, локализованным внутри трансмембранного домена, сформированного семью трансмембранными спиралями рецептора [3, 4]. Наибольший интерес среди них представляют производные тиено-[2,3-*d*]пиримидина, которые специфично активируют цАМФ-зависимые сигнальные пути в клетках-мишенях, характеризуются стероидогенной активностью при внутрибрюшинном и пероральном введении грызунам, а в условиях клиники способны вызывать овуляцию у женщин, не приводя при этом к развитию синдрома гиперстимуляции яичников – тяжелому осложнению, возникающему при проведении контролируемой индукции овуляции [3, 5–8].

На основе изучения специфической активности и биодоступности большого количества производных тиено-[2,3-*d*]пиримидинов нами было отобрано соединение ТР03, 5-амино-*N*-*mpe*m-бутил-2-(метилсульфанил)-4-(3-(никотинамидо)фенил) тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид, наделенное активностью аллостерического агониста рецептора ЛГ. В условиях *in vitro* ТР03 повышал активность аденилатциклазной системы в тестикулярных и овариальных мембранах, при этом слабо влияя на другие сигнальные каскады, стимулировал стероидогенез в культивируемых клетках Лейдига, а в условиях *in vivo* при однократном или на протяжении нескольких дней введении самцам крыс повышал у них продукцию тестостерона (Т) [9–12]. Были выявлены значительные различия механизмов стероидогенного действия ХГЧ и ТР03 при их длительном введении самцам крыс, а также при однократном введении животным ТР03 и ХГЧ в высокой дозе (100 МЕ/крысу). Следует, однако, отметить, что механизмы действия гонадотропинов сильно зависят от дозы, вследствие чего представляет интерес сравнить механизмы действия ХГЧ и ТР03 и динамику развития стероидогенного эффекта при однократном введении препаратов в субмаксимальных дозах. Использование более низких, субмаксимальных, доз ХГЧ позволяет, по крайней мере, частично предотвратить его мощное ингибирующее воздействие на систему стероидогенеза, которое при применении высоких доз гонадотропина начинает выявляться уже через несколько часов после обработки [12–14]. Изучение ранних стероидогенных эффектов различающихся по природе агонистов рецептора ЛГ позволяет оценить перспективы и преимущества использования таких препаратов для однократной стимуляции стероидогенной функции. Целью исследования было сравнительное изучение влияния однократного введения

самцам крыс ТР03 и ХГЧ, взятых в субмаксимальных дозах 15 мг/кг и 50 МЕ/крысу соответственно, на уровень Т в крови, на экспрессию генов стероидогенных белков и паттерн стероидных гормонов, прекурсоров Т, в семенниках крыс в течение 5 ч после такой обработки.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для экспериментов использовали самцов крыс Вистар (возраст 3 мес.), которых содержали в стандартных условиях и на стандартном рационе. Все процедуры проводили в соответствии с правилами, разработанными Комитетом по биоэтике ИЭФБ РАН (15.02.2018 г.), и правилами и требованиями, изложенными в документах “European Communities Council Directive 1986” (86/609/ЕЕС) и “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”.

Препарат ХГЧ (Московский эндокринологический завод, Россия) вводили крысам однократно в дозе 50 МЕ/крысу (подкожно), соединение ТР03, которое синтезировали и характеризовали, как описано ранее [9] вводили однократно в дозе 15 мг/кг (внутрибрюшинно, в диметилсульфоксиде (ДМСО)). В каждой исследуемой группе было по шесть животных. Инъекции проводили в 11.00 ч, уровень Т оценивали до введения препаратов (10.00 ч) и через 1, 3 и 5 ч (12.00, 14.00, 16.00 ч) после их введения в образцах крови, полученных из хвостовой вены при использовании местного наркоза (2%-ный лидокаин, 2–4 мг/кг). Контрольным крысам в те же сроки вводили ДМСО. Концентрацию Т в крови животных определяли с помощью набора “Тестостерон-ИФА” (Алкор-Био, Россия).

Для исследования содержания стероидных гормонов и оценки экспрессии генов рецептора ЛГ и стероидогенных белков в семенниках крыс дополнительно использовали самцов крыс того же возраста (в каждой группе  $n = 6$ ), которых декапитировали под наркозом через 30 мин (11.30 ч) и через 3 ч (14.00 ч) после введения препаратов или ДМСО (11.00 ч). Ткани семенников гомогенизировали на льду в лизирующем буфере (мМ): 20 Трис-НСI, рН 7.5, 150 NaCl, 1 EGTA, 1 EDTA, 0.1% Тритон X-100 в соотношении 1 : 20, гомогенат центрифугировали (10 мин, 12000 g), собирали супернатант, замораживали его при  $-18^{\circ}\text{C}$  и использовали для определения уровня гормонов. Содержание Т в семенниках измеряли с помощью набора фирмы Алкор-Био (Россия), содержание прогестерона и 17-гидроксипрогестерона – с помощью наборов фирмы Хема (Россия), содержание прегненолона и андростендиона – с помощью наборов фирмы DRG Instruments GmbH (Германия).

Экспрессию мРНК оценивали с помощью ПЦР в реальном времени, для чего из тканей семенников выделяли тотальную РНК с помощью реагента ExtractRNA (Евроген, Россия). Обратную транскрипцию осуществляли с помощью набора MMLV RT Kit (Евроген, Россия), количественную оценку экспрессии проводили с помощью амплификатора 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Использовали следующие праймеры: *Lhr* (рецептор ЛГ) – CTGC-GCTGTCCTGGCC (For) и CGACCTCATTAAGTCCCCTGAA (Rev); *Star* (StAR-белок) – AAGGCTGGAAGAAGGAAAGC (For) и CACCTGGCACCACCTTACTT (Rev); *Cyp11a1* (цитохром P450<sub>scc</sub>) – TATCCCGCTTTGCCTTTGAG (For) и CACGATCTCCTC-CAACATCC (Rev); *Hsd3b* (3 $\beta$ -гидростероиддегидрогеназа, HSD3 $\beta$ ) – AGGCCTGT-GTCCAAGCTAGTGT (For) и CTCGGCCATCTTTTGCTGTAT (Rev); *Cyp17a1* (цитохром P450-17 $\alpha$ ) – CATCCCCACAAGGCTAAC (For) и TGTGTCCTTGGGG-ACAGTAAA (Rev); *Hsd17b* (17 $\beta$ -гидростероиддегидрогеназа, HSD17 $\beta$ ) – CCTTTG-GCTTTGCCATGAGA (For) и CAATCCATCCTGCTCCAACCT (Rev). Для исследования использовали референсные гены  $\beta$ -актина (*Actb*) и глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (*Gapdh*). Результаты анализировали с помощью метода  $\Delta\Delta C_t$  и

**Таблица 1.** Уровни тестостерона в крови при однократном введении самцам крыс ХГЧ в дозе 50 МЕ/животное и соединения ТР03 в дозе 15 мг/кг

**Table 1.** The plasma levels of testosterone in a single administration of hCG at a dose of 50 IU/animal and TP03 at a dose of 15 mg/kg in male rats

	До введения, 10.00 ч Before administration, 10.00 h*	Через 1 ч, 12.00 After 1 h, 12.00	Через 3 ч, 14.00 After 3 hs, 14.00	Через 5 ч, 16.00 After 5 hs, 16.00	AUC <sub>12.00–16.00</sub> , усл. ед. AUC <sub>12.00–16.00</sub> , arb.un.
Контроль Control	15.6 ± 2.6	16.0 ± 2.5	14.8 ± 2.0	14.4 ± 4.5	59.9 ± 7.6
ХГЧ, 50 МЕ/крысу hCG, 50 IU/rat	13.9 ± 2.0	71.2 ± 8.6 <sup>a</sup>	111.5 ± 10.4 <sup>a</sup>	86.1 ± 8.9 <sup>a</sup>	380.3 ± 21.6 <sup>b</sup>
ТР03, 15 мг/кг TP03, 15 mg/kg	14.3 ± 1.8	36.8 ± 5.0 <sup>a,c</sup>	62.3 ± 5.4 <sup>a,c</sup>	59.4 ± 5.2 <sup>a</sup>	220.8 ± 17.6 <sup>b,c</sup>

\* – препараты вводили в 11.00 ч. <sup>a</sup> – различия по сравнению с базовым уровнем Т статистически значимы при  $p < 0.05$ ; <sup>b</sup> – различия значений AUC<sub>12.00–16.00</sub> по сравнению с таковыми в контроле статистически значимы при  $p < 0.05$ ; <sup>c</sup> – различия уровней Т и значений AUC<sub>12.00–16.00</sub> между группами, обработанными ХГЧ и ТР03, статистически значимы при  $p < 0.05$ . Значения представлены как  $M \pm SEM$ ,  $n = 6$ .

\* – the drugs were administered at 11.00 h. <sup>a</sup> – the differences in comparison with the baseline T level are significant at  $p < 0.05$ ; <sup>b</sup> – the differences of the AUC<sub>12.00–16.00</sub> values as compared with those in the control are significant at  $p < 0.05$ ; <sup>c</sup> – the differences in the T levels and the AUC<sub>12.00–16.00</sub> values between the groups treated with hCG and TP03 are significant at  $p < 0.05$ . The values are presented as  $M \pm SEM$ ,  $n = 6$ .

программного обеспечения 7500 Software v2.0.6 и Expression Suite Software v1.0.3, значения RQ рассчитывали по отношению к контрольной группе.

Статистическую обработку проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, США). Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения двух выборок с нормальным распределением использовали *t*-критерий Стьюдента, для сравнения трех и более групп – дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони. Статистически значимыми считали отличия при  $p < 0.05$ . Данные представляли как  $M \pm SEM$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Введение самцам крыс ХГЧ и ТР03 через 1 ч приводило к достоверному повышению у них уровня Т с максимумом стероидогенного эффекта через 3 ч, причем ХГЧ был более активным в сравнении с ТР03 (табл. 1). На это указывает более высокое значение AUC<sub>12.00–16.00</sub> для его стероидогенного эффекта, которое на 72% выше, чем в случае ТР03 (табл. 1). Стимулирующий продукцию Т эффект гонадотропина нарастал быстрее, но затем ослабевал, в то время как соответствующий эффект ТР03 повышался более плавно и сохранялся на одном уровне через 3 и 5 ч. Так, через 3 ч после введения ХГЧ прирост уровня Т был выше прироста, вызываемого ТР03, на 104%, в то время как через 5 ч – на 60%. Полученные данные демонстрируют различия во временной динамике стероидогенных эффектов различающихся по природе и механизмам действия агонистов рецептора ЛГ. Причинами этого могут быть различия в биодоступности ХГЧ и ТР03, поскольку гонадотропина легче

**Таблица 2.** Влияние ХГЧ и ТР03 на уровни стероидных гормонов – тестостерона и его прекурсоров, в семенниках самцов крыс через 30 мин после введения препаратов  
**Table 2.** The effect of hCG and TP03 on the levels of steroid hormones, testosterone and its precursors, in the testes of male rats 30 minutes after drug administration

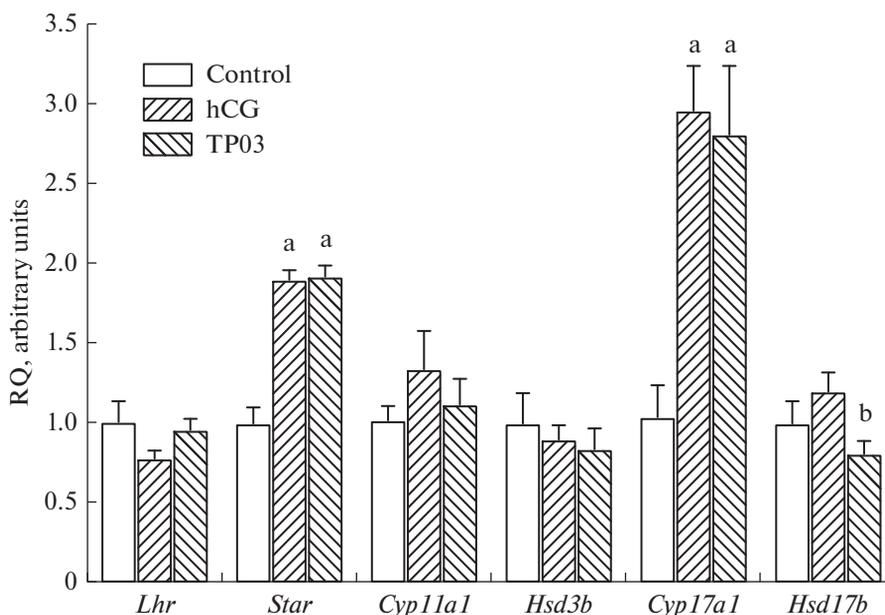
Стероидный гормон Steroid hormone	Контроль Control	ХГЧ, 50 МЕ/крысу hCG, 50 IU/rat	ТР03, 15 мг/кг TP03, 15 mg/kg
	Концентрация стероидного гормона, нмоль/г ткани The concentration of steroid hormone, nmol/g of the tissue		
Прегненолон Pregnenolone	1.27 ± 0.07	0.76 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.88 ± 0.05 <sup>a</sup>
Прогестерон Progesterone	0.41 ± 0.05	0.47 ± 0.06	0.45 ± 0.03
17-Гидрокси-прогестерон 17-Hydroxypregesterone	0.044 ± 0.010	0.317 ± 0.026 <sup>a</sup>	0.064 ± 0.004 <sup>b</sup>
Андростендион Androstenedione	0.045 ± 0.003	0.137 ± 0.015 <sup>a</sup>	0.074 ± 0.010 <sup>a,b</sup>
Тестостерон Testosterone	0.49 ± 0.12	2.85 ± 0.22 <sup>a</sup>	0.99 ± 0.07 <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> – различия по сравнению с контролем статистически значимы при  $p < 0.05$ ; <sup>b</sup> – различия по сравнению с группой, обработанной ХГЧ, статистически значимы при  $p < 0.05$ . Значения представлены как  $M \pm SEM$ ,  $n = 6$ .

<sup>a</sup> – the differences in comparison with the control are significant at  $p < 0.05$ ; <sup>b</sup> – the differences in the comparison with the hCG-treated group are significant at  $p < 0.05$ . The values are presented as  $M \pm SEM$ ,  $n = 6$ .

достигают семенников и преодолевают гематотестикулярный барьер в сравнении с гидрофобными тиено-[2,3-*d*]пиримидинами, а также в индукции гонадотропинами десенситизации рецепторов ЛГ, что ведет к постепенному ослаблению их стероидогенного эффекта [2].

Нами показано, что уже через 30 мин после введения ХГЧ и ТР03 содержание Т и ряда его прекурсоров в семенниках крыс в сравнении с контролем менялось. Так, содержание прегненолона, синтез которого из холестерина осуществляется в митохондриях и катализируется цитохромом P450<sub>sc</sub>, при обработке крыс ХГЧ и ТР03 снижалось ниже контрольного уровня (табл. 2). Это обусловлено тем, что накопленный в клетках Лейдига прегненолон после активации рецепторов ЛГ с помощью ХГЧ или ТР03 превращается в прогестерон, что говорит о значительной стимуляции ферментов, катализирующих начальные, митохондриальные, стадии стероидогенеза. Уровень прогестерона, синтез которого из прегненолона катализируется дегидрогеназой HSD3β, во всех исследуемых группах не различался. Это указывает на быструю конверсию прогестерона с помощью цитохрома P450-17α сначала в 17-гидроксипрогестерон, а затем уже в андростендион. В свою очередь, уровни 17-гидроксипрогестерона, андростендиона и Т, синтезируемого из андростендиона с помощью дегидрогеназы HSD17β, у самцов крыс, обработанных ХГЧ и ТР03, были повышены, в наибольшей степени при обработке гонадотропином (табл. 2). Так, в сравнении с контролем ХГЧ повышал уровень 17-гидроксипрогестерона, андростендиона и Т в семенниках крыс на 620, 204 и 492%, в то время как ТР03 – на 45, 64 и 90%. Следует отметить положительную корреляцию между интратестикулярным уровнем Т через 30 мин после введения крысам ХГЧ и ТР03 и подъемом концентрации Т в крови животных через 1 ч после введения. Соотношение между приростами уровня интратестикулярного Т в группах с обработкой ХГЧ и ТР03 составило 4.72 и было сопоставимым с соотношением уровней Т в крови, которое составило 2.65.



**Рис. 1.** Влияние ХГЧ и TP03 на экспрессию генов, кодирующих рецептор ЛГ/ХГЧ и стероидогенные белки, в семенниках самцов крыс через 3 ч после введения препаратов.

<sup>a</sup> – различия по сравнению с контролем статистически значимы при  $p < 0.05$ ; <sup>b</sup> – различия по сравнению с группой, обработанной ХГЧ, статистически значимы при  $p < 0.05$ . Значения представлены, как  $M \pm SEM$ ,  $n = 6$ .

**Fig. 1.** The effect of hCG and TP03 on the expression of the genes encoding LH/hCG receptor and the steroidogenic proteins in the testes of male rats three hours after drug administration.

<sup>a</sup> – the differences in comparison with the control are significant at  $p < 0.05$ ; <sup>b</sup> – the differences in comparison with the hCG-treated group are significant at  $p < 0.05$ . The values are presented as  $M \pm SEM$ ,  $n = 6$ .

Экспрессия стероидогенных генов в семенниках крыс через 30 мин после их обработки ХГЧ и TP03 существенно не отличалась от таковой в контроле (данные не представлены), что, как можно полагать, обусловлено недостаточностью времени, прошедшего с момента воздействия ХГЧ и TP03 на клетки Лейдига, для изменения в них транскрипционной активности генов. Полученные данные согласуются с выявленным нами соотношением стероидных гормонов в семенниках, которое указывает на быструю “перекачку” прегненолона и прогестерона в конечные продукты стероидогенеза без заметного их синтеза *de novo*. В этой связи следует отметить, что ключевую роль в интенсификации синтеза прегненолона и прогестерона играет белок StAR, который отвечает за активный транспорт холестерина через митохондриальную мембрану внутрь митохондрий, где осуществляются начальные стадии стероидогенеза [15].

Через 3 ч после введения крысам ХГЧ и TP03 отмечали значимые изменения экспрессии гена *Star*, кодирующего белок StAR, которая в обеих группах повышалась в среднем в два раза, и экспрессии гена *Cyp17a1*, кодирующего цитохром P450-17 $\alpha$ , которая повышалась в тех же группах крыс в среднем в три раза (рис. 1). Как отмечалось выше, транспортный белок StAR катализирует транспорт холестерина в митохондрии, что является скоростью-лимитирующей стадией тестикулярного стероидогене-

неза, и повышение экспрессии белка StAR положительно коррелирует с продукцией Т в семенниках. Наши данные согласуются с результатами других авторов о повышении экспрессии гена *Star* при обработке ХГЧ культуры клеток Лейдига крысы [16, 17]. Этот эффект гонадотропина обусловлен стимуляцией активности ERK1/2-киназ, осуществляемой как через цАМФ-зависимый, так и через фосфоинозитидный пути. Необходимо отметить, что активация ERK1/2-киназ в клетках Лейдига не только повышает экспрессию гена *Star*, но и стимулирует активность белка StAR, что, в конечном итоге, стимулирует синтез прогестерона, основного субстрата цитохрома P450-17 $\alpha$  [15, 18].

Цитохром P450-17 $\alpha$ , фермент с двойной специфичностью, катализирует сразу две стадии стероидогенеза – превращение прогестерона в 17-гидроксипрогестерон (17 $\alpha$ -гидроксилазная активность) и конверсию 17-гидроксипрогестерона в андростендион (C<sub>17–20</sub>-лиазная активность) [19, 20]. Показанное нами повышение экспрессии гена *Cyp17a1* в сочетании со значительным повышением уровня Т в крови крыс через 3 ч после введения им TP03 и ХГЧ указывает на то, что повышение экспрессии и активности цитохрома P450-17 $\alpha$  также вносит значительный вклад в стероидогенный эффект тиено-[2,3-*d*]пиримидинов, сходно с тем, как это происходит при действии ХГЧ. Стимуляция гонадотропинами с ЛГ-активностью экспрессии и активности цитохрома P450-17 $\alpha$  ранее была показана при обработке ими культуры клеток Лейдига семенников [21, 22] и клеток теки яичников [23, 24]. Следует, однако, отметить, что данные по влиянию гонадотропинов на цитохром P450-17 $\alpha$  в клеточных культурах отличаются от результатов, полученных в условиях *in vivo*, что обусловлено особенностями временной динамики развития стероидогенного эффекта и различиями паттерна регуляторных влияний в изолированных клетках и в репродуктивных тканях. Однократное введение высоких доз ХГЧ пациентам и экспериментальным животным уже в первые часы повышало у них активность цитохрома P450-17 $\alpha$  [13, 25], но через 6 ч, как было продемонстрировано в опытах с самцами крыс, этот эффект затухал [25]. При введении гонадотропинов с ЛГ-активностью в течение нескольких дней отмечали подавление экспрессии гена *Cyp17a1* и активности цитохрома P450-17 $\alpha$ , что показано в семенниках, яичниках и плаценте [13, 26–30]. Необходимо обратить внимание на тот факт, что соединения, ингибирующие экспрессию и активность цитохрома P450-17 $\alpha$ , характеризуются сильно выраженным антиандрогенным эффектом, и это позволяет использовать их для лечения ЛГ-зависимых опухолей [31]. Следует также отметить, что трехдневное введение TP03 самцам крыс, в отличие от ХГЧ, вызывало повышение, а не снижение экспрессии гена *Cyp17a1* в семенниках животных, что коррелировало с сохранением у TP03 стероидогенного эффекта [29].

Экспрессия генов, кодирующих дегидрогеназы HSD3 $\beta$  и HSD17 $\beta$ , в семенниках крыс, обработанных TP03 и ХГЧ, существенно не отличалась от таковой в контрольной группе. При этом экспрессия гена *Hsd17b* в группе, обработанной TP03, была достоверно ниже, чем в группе с введением ХГЧ (рис. 1), что указывает на разнонаправленное влияние на нее тиено-[2,3-*d*]пиримидинов и гонадотропинов. Дегидрогеназа HSD17 $\beta$  катализирует заключительную стадию тестикулярного стероидогенеза, осуществляя конверсию андростендиона в Т [19, 20]. Другими авторами было показано, что при однократном введении ХГЧ самцам крыс на первом этапе экспрессия и активность дегидрогеназы HSD17 $\beta$  существенно не отличалась от контроля, как и в нашем случае, но в дальнейшем заметно снижалась [14, 32]. Так, при воздействии ХГЧ экспрессия гена *Hsd17b* снижалась, достигая минимума через 24 ч, и восстанавливалась до контрольного уровня только на девятые сутки после инъекции гонадотропина [14]. Нами ранее было показано, что при трехдневном введении самцам крыс ХГЧ экспрессия гена *Hsd17b* снижалась в два раза, в то

время как в группе с длительной обработкой TP03 экспрессия гена дегидрогеназы HSD17 $\beta$  сохранялась на контрольном уровне [29].

Суммируя результаты, полученные ранее и в рамках настоящего исследования, можно заключить, что в течение первых часов после введения ХГЧ и TP03 самцам крыс их эффекты на экспрессию стероидогенных ферментов различаются в небольшой степени, но в дальнейшем различия становятся значительными. Среди причин этого изменение экспрессии рецепторов ЛГ. Так, через 3 ч после введения ХГЧ и TP03 экспрессия гена *Lhr* в семенниках самцов крыс практически не менялась (рис. 1). В то же время, как показано нами ранее, при длительном введении ХГЧ она снижалась в три раза и, напротив, парадоксальным образом возрастала при обработке TP03 [29]. Мы полагаем, что TP03 как при краткосрочном, так и при длительном его введении самцам крыс не способен в достаточной степени стимулировать  $\beta$ -аррестинный и фосфоинозитидный пути в клетках Лейдига, контролирующие процесс эндоцитоза и экспрессию гена *Lhr*, что обусловлено специфичностью TP03 в отношении цАМФ-зависимых каскадов, ответственных за активацию стероидогенеза [6, 10]. В то же время ХГЧ, будучи низкоселективным в отношении внутриклеточных сигнальных каскадов, стимулирует  $\beta$ -аррестинный и фосфоинозитидный пути, причем при повышении силы и продолжительности воздействия эти его эффекты только усиливаются, что и приводит к снижению экспрессии рецептора ЛГ и ослаблению стероидогенного ответа.

Таким образом, тиено-[2,3-*d*]пиримидиновое производное TP03, аллостерический агонист рецептора ЛГ, через 30 мин после введения самцам крыс стимулирует стероидогенез, причем, его стероидогенный эффект на начальном этапе воздействия на клетки Лейдига сходен с таковым ХГЧ. Так, TP03 и ХГЧ через 30 мин повышают в семенниках уровни Т и его прекурсоров – 17-гидроксипрогестерона и андростендиона, а также снижают уровень прегненолона, что указывает на расхождение последнего для синтеза прогестерона и других предшественников Т. Изменение экспрессии генов стероидогенных белков через 30 мин после введения препаратов отсутствовало, но выявлялось через 3 ч. При введении TP03 и ХГЧ значимо повышалась экспрессия генов *Star* и *Cyp17a1*, кодирующих белок StAR и цитохром P450-17 $\alpha$ , ключевые компоненты тестикулярного стероидогенеза. В то же время в группе, обработанной TP03, уровень экспрессии гена *Hsd17b*, кодирующего дегидрогеназу HSD17 $\beta$ , был достоверно ниже, чем в группе с обработкой ХГЧ. Поскольку продукция Т, индуцированная гонадотропином через 5 ч заметно снижалась, то стероидогенный эффект ХГЧ становился сопоставимым с таковым TP03, несмотря на то что еще через 1 и 3 ч он в значительной степени его превосходил. Эти изменения стероидогенного эффекта ХГЧ и тиено-[2,3-*d*]пиримидина предшествуют значимым различиям, которые выявляются позднее, при более длительной обработке крыс тиено-[2,3-*d*]пиримидинами и ХГЧ и обусловлены различиями их механизмов действия на внутриклеточные сигнальные каскады в клетках Лейдига.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 19-75-20122). ЯМР исследования проведены с использованием оборудования ресурсного центра СПбГУ “Магнитно-резонансные методы исследования”, масс-спектры высокого разрешения получены на оборудовании ресурсного центра СПбГУ “Методы анализа состава вещества”.

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Шпаков А.О.* Гонадотропины – от теории к клинической практике. Санкт-Петербург. ПОЛИТЕХ-ПРЕСС. 2018. ISBN 978-5-7422-6330-2. [*Shpakov A.O.* Gonadotropiny – ot teorii k klinicheskoy praktike [Gonadotropins – from theory to clinical practice]. St-Petersburg. POLYTECH-PRESS. 2018. ISBN 978-5-7422-6330-2. (In Russ)].
2. *Riccetti L., Yvines R., Klett D., Gallay N., Combarous Y., Reiter E., Simoni M., Casarini L., Ayoub M.A.* Human luteinizing hormone and chorionic gonadotropin display biased agonism at the LH and LH/CG receptors. *Sci. Rep.* 7(1): 940. 2017.
3. *van Straten N.C., Timmers C.M.* Non-Peptide ligands for the gonadotropin receptors. *Annu. Rep. Med. Chem.* 44: 171–188. 2009. [https://doi.org/10.1016/S0065-7743\(09\)04408-X](https://doi.org/10.1016/S0065-7743(09)04408-X)
4. *Шпаков А.О.* Новые достижения в разработке и изучении механизмов действия низкомолекулярных агонистов рецепторов тиреотропного и лютеинизирующего гормонов. *Цитология.* 57(3): 167–176. 2015. [*Shpakov A.O.* Novye dostizheniya v razrabotke i izuchenii mekhanizmov dejstviya nizkomolekulyarnyh agonistov receptorov tireotropnogo i lyuteiniziruyushchego gormonov [New achievements in the development and study of the mechanisms of action of low-molecular-weight agonists of the receptors of the thyroid-stimulating and luteinizing hormones]. *Tsitologiya.* 57(3): 167–176. 2015. (In Russ)].
5. *van Straten N.C., Schoonus-Gerritsma G.G., van Someren R.G., Draaijer J., Adang A.E., Timmers C.M., Hanssen R.G., van Boeckel C.A.* The first orally active low molecular weight agonists for the LH receptor: Thienopyr(im)idines with therapeutic potential for ovulation induction. *Chem. BioChem.* 3(10): 1023–1026. 2002.
6. *van Koppen C.J., Zaman G.J., Timmers C.M., Kelder J., Mosselman S., van de Lagemaat R., Smit M.J., Hanssen R.G.* A signaling-selective, nanomolar potent allosteric low molecular weight agonist for the human luteinizing hormone receptor. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 378(5): 503–514. 2008. <https://doi.org/10.1007/s00210-008-0318-3>
7. *van de Lagemaat R., Timmers C.M., Kelder J., van Koppen C., Mosselman S., Hanssen R.G.* Induction of ovulation by a potent, orally active, low molecular weight agonist (Org 43553) of the luteinizing hormone receptor. *Hum. Reprod.* 24(3): 640–648. 2009. <https://doi.org/10.1093/humrep/den412>
8. *Newton C.L., Whay A.M., McArdle C.A., Zhang M., van Koppen C.J., van de Lagemaat R., Segaloff D.L., Millar R.P.* Rescue of expression and signaling of human luteinizing hormone G protein-coupled receptor mutants with an allosterically binding small-molecule agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108(17): 7172–7176. 2011. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015723108>
9. *Derkach K.V., Dar'in D.V., Bakhtyukov A.A., Lobanov P.S., Shpakov A.O.* *In vitro* and *in vivo* studies of functional activity of new low molecular weight agonists of the luteinizing hormone receptor. *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. A: Memb. Cell Biol.* 10(4): 294–300. 2016. <https://doi.org/10.1134/S1990747816030132>
10. *Derkach K.V., Bakhtyukov A.A., Shpakov A.A., Dar'in D.V., Shpakov A.O.* Specificity of heterotrimeric G protein regulation by human chorionic gonadotropin and low-molecular agonist of luteinizing hormone receptor. *Cell Tissue Biol.* 11(6): 475–482. 2017. <https://doi.org/10.1134/S1990519X17060037>
11. *Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Dar'in D.V., Stepanchikina A.M., Shpakov A.O.* A low molecular weight agonist of the luteinizing hormone receptor stimulates adenylyl cyclase in the testicular membranes and steroidogenesis in the testes of rats with type 1 diabetes. *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. A: Memb. Cell Biol.* 13(4): 301–309. 2019. <https://doi.org/10.1134/S1990747819040032>
12. *Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Dar'in D.V., Shpakov A.O.* Conservation of steroidogenic effect of the low-molecular-weight agonist of luteinizing hormone receptor in the course of its long-term administration to male rats. *Dokl. Biochem. Biophys.* 484(1): 78–81. 2019. <https://doi.org/10.1134/S1607672919>
13. *Forest M.G., Roulier R.* Kinetics of the steroidogenic response of the testis to stimulation by hCG. V. Blockade of 17–20 lyase induced by hCG is an age-dependent phenomenon inducible by pre-treatment with hCG. *Ann. Endocrinol. (Paris).* 45: 281–290. 1984.
14. *Tsai-Morris C.H., Khanum A., Tang P.Z., Dufau M.L.* The rat 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type III: molecular cloning and gonadotropin regulation. *Endocrinology.* 140(8): 3534–3542. 1999.
15. *Castillo A.F., Orlando U., Helfenberger K.E., Poderoso C., Podesta E.J.* The role of mitochondrial fusion and StAR phosphorylation in the regulation of StAR activity and steroidogenesis. *Mol. Cell Endocrinol.* 408: 73–79. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.12.011>

16. *Martinelle N., Holst M., Söder O., Svechnikov K.* Extracellular signal-regulated kinases are involved in the acute activation of steroidogenesis in immature rat Leydig cells by human chorionic gonadotropin. *Endocrinology*. 145(10): 4629–4634. 2004.
17. *Manna P.R., Jo Y., Stocco D.M.* Regulation of Leydig cell steroidogenesis by extracellular signal-regulated kinase 1/2: role of protein kinase A and protein kinase C signaling. *J. Endocrinol.* 193(1): 53–63. 2007.
18. *Poderoso C., Maloberti P., Duarte A., Neuman I., Paz C., Cornejo Maciel F., Podesta E.J.* Hormonal activation of a kinase cascade localized at the mitochondria is required for StAR protein activity. *Mol. Cell Endocrinol.* 300(1–2): 37–42. 2009.  
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.10.009>
19. *Labrie F., Luu-The V., Lin S.X., Labrie C., Simard J., Breton R., Bélanger A.* The key role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology. *Steroids*. 62(1): 148–158. 1997.
20. *Marchais-Oberwinkler S., Henn C., Möller G., Klein T., Negri M., Oster A., Spadaro A., Werth R., Weizel M., Xu K., Frotscher M., Hartmann R.W., Adamski J.* 17 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenases (17 $\beta$ -HSDs) as therapeutic targets: protein structures, functions, and recent progress in inhibitor development. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 125(1–2): 66–82. 2011.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.12.013>
21. *Clark A.M., Chuzel F., Sanchez P., Saez J.M.* Regulation by gonadotropins of the messenger ribonucleic acid for P450 side-chain cleavage, P450<sub>17</sub> alpha-hydroxylase/C17,20-lyase, and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in cultured pig Leydig cells. *Biol. Reprod.* 55(2): 347–354. 1996.
22. *Бахтукоев А.А., Соколова Т.В., Дар'ин Д.В., Деркач К.В., Шпаков А.О.* Сравнительное изучение стимулирующего эффекта низкомолекулярного агониста рецептора лютеинизирующего гормона и хорионического гонадотропина на стероидогенез в клетках Лейдига крысы. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 103(10): 1181–1192. 2017. [*Bakhtuykov A.A., Sokolova T.V., Dar'in D.V., Derkach K.V., Shpakov A.O.* A comparative study of the stimulating effect of a low-molecular-weight agonist of luteinizing hormone receptor and chorionic gonadotropin on the steroidogenesis in the rat Leydig cells]. *Russ. J. Physiol.* 103(10): 1181–1192. 2017. (In Russ)].
23. *Magoffin D.A.* Evidence that luteinizing hormone-stimulated differentiation of purified ovarian thecal-interstitial cells is mediated by both type I and type II adenosine 3',5' monophosphate-dependent protein kinases. *Endocrinology*. 125: 1464–1473. 1987.
24. *Wang X., Zou P., He Y., Meng K., Quan F., Zhang Y.* Effect of luteinizing hormone on goat theca cell apoptosis and steroidogenesis through activation of the PI3K/AKT pathway. *Anim. Reprod. Sci.* 190: 108–118. 2018.  
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.01.014>
25. *Chasalow F., Marr H., Haour F., Saez J.M.* Testicular steroidogenesis after human chorionic gonadotropin desensitization in rats. *J. Biol. Chem.* 254(13): 5613–5617. 1979.
26. *Suzuki K., Tamaoki B.* Acute decrease by human chorionic gonadotropin of the activity of pre-ovulatory ovarian 17 alpha-hydroxylase and C-17-C-20 lyase is due to decrease of microsomal cytochrome P-450 through *de novo* synthesis of ribonucleic acid and protein. *Endocrinology*. 113(6): 1985–1991. 1983.
27. *Johnson D.C., Griswold T.* Relationship between *in vivo* and *in vitro* 17 alpha-hydroxylase and C17,20-lyase activity in ovaries of immature hypophysectomized rats treated chronically with human chorionic gonadotropin. *J. Steroid. Biochem.* 24(2): 637–643. 1986.
28. *Durkee T.J., McLean M.P., Hales D.B., Payne A.H., Waterman M.R., Khan I., Gibori G.* P450(17 alpha) and P450SCC gene expression and regulation in the rat placenta. *Endocrinology*. 130(3): 1309–1317. 1992.
29. *Bakhtuykov A.A., Derkach K.V., Dar'in D.V., Sharova T.S., Shpakov A.O.* Decrease in the basal and luteinizing hormone receptor agonist-stimulated testosterone production in aging male rats. *Adv. Gerontol.* 9(2): 179–185. 2019.  
<https://doi.org/10.1134/S2079057019020036>
30. *Kakuta H., Iguchi T., Sato T.* The Involvement of Granulosa Cells in the Regulation by Gonadotropins of Cyp17a1 in Theca Cells. *In Vivo*. 32(6): 1387–1401. 2018.  
<https://doi.org/10.21873/invivo.11391>
31. *Ye L., Chen X., Li X., Zhu Q., Yu L., Guo J., Chen B., Akingbemi B.T., Ge R.S., Li H.* Effects of methoxychlor and its metabolite 2,2-bis(p-hydroxyphenyl)-1,1,1-trichloroethane on human and rat 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase activity. *Toxicol. Lett.* 225(3): 407–412. 2014.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.01.011>
32. *Marín-Juez R., Castellana B., Manchado M., Planas J.V.* Molecular identification of genes involved in testicular steroid synthesis and characterization of the response to gonadotropic stimulation in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*) testis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 172(1): 130–139. 2011.  
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.02.003>

**Early Steroidogenic Effects of Gonadotropin and a Low-Molecular-Weight Agonist of Luteinizing Hormone Receptor when Administered to Male Rats at Submaximal Doses**

**A. A. Bakhtyukov<sup>a</sup>, K. V. Derkach<sup>a</sup>, and A. O. Shpakov<sup>a, \*</sup>**

<sup>a</sup>*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of Russian Academy of Sciences, St.-Petersburg, Russia*

*\*e-mail: alex\_shpakov@list.ru*

The receptors of luteinizing hormone (LH) play a key role in the regulation of testicular steroidogenesis. They can be activated by gonadotropins, LH and human chorionic gonadotropin (hCG), and by the low-molecular-weight agonists, including the derivatives of thieno[2,3-*d*]pyrimidines, which bind to an allosteric site located in the transmembrane channel of LH receptor. The differences in the steroidogenic effects of gonadotropins and thieno[2,3-*d*]pyrimidines in the *in vitro* experiments and in a long-term administration to male rats were previously identified, but their early steroidogenic effects in the testes when administered at submaximal doses, have not been studied. The aim of the work was to study the effect of a single administration of hCG and TP03, a thieno[2,3-*d*]pyrimidine derivative, in submaximal doses on testosterone (T) plasma levels and on the expression of steroidogenic protein genes of, as well as the pattern of steroid hormones, the precursors of T, in the testes for 5 hours after the treatment of male rats. We demonstrate that TP03 (15 mg/kg) and hCG (50 IU/rat) 30 minutes after their administration to rats cause an increase in the intratesticular levels of T and its precursors, such as 17-hydroxyprogesterone and androstenedione, and also reduce the level of pregnenolone, which indicates its expenditure for progesterone synthesis. The gene expression of steroidogenic proteins significantly changed 3 hours after drug administration. The administration of TP03 and hCG led to an increase in the expression of the *Star* and *Cyp17a1* genes encoding the transport protein StAR and the cytochrome P450-17 $\alpha$ , the key components of the steroidogenesis system. At the same time, the difference between the expressions of the *Hsd17b* gene encoding the dehydrogenase HSD17 $\beta$ , which were higher in the hCG-treated group as compared to the TP03-treated group, is shown. An increase in the plasma T levels one and three hours after treatment of rats with hCG was higher than in the TP03-treated group, but after 5 hours the T levels in both groups of rats were comparable, which was due to the weakening of the steroidogenic effect of hCG while maintaining the corresponding effect of TP03. Thus, despite the similarity of the early steroidogenic effects of TP03 and hCG used at the submaximal doses, even in the first hours after their administration to rats, the peculiarities of their effect on testicular steroidogenesis begin to appear, which, after a long-term administration, lead to significant differences in their steroidogenic activity.

**Keywords:** low-molecular-weight agonist, luteinizing hormone receptor, steroidogenesis, testosterone, testes, chorionic gonadotropin, StAR protein, cytochrome P450-17 $\alpha$

**ЦИТИРОВАТЬ:**

Бахтюков А.А., Деркач К.В., Шпаков А.О. Ранние стероидогенные эффекты гонадотропина и низкомолекулярного агониста рецептора лютеинизирующего гормона при введении их субмаксимальных доз самцам крыс. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(2): 254–264.

DOI: 10.31857/S0869813920020028

**TO CITE THIS ARTICLE:**

Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Shpakov A.O. Early Steroidogenic Effects of Gonadotropin and a Low-Molecular-Weight Agonist of Luteinizing Hormone Receptor when Administered to Male Rats at Submaximal Doses. Russian Journal of Physiology. 106(2): 254–264.

DOI: 10.31857/S0869813920020028