СОДЕРЖАНИЕ

Академику Андрею Львовичу Зефирову – 70 лет 1323

Обзоры

Экспериментальные модели когнитивных нарушений при шизофрении
М. В. Дорофейкова, Е. О. Кучер, Н. Н. Петрова, А. Ю. Егоров 1325

Преэклампсия, фиброз и маринобуфагенин
Н. И. Агалакова, В. А. Резник, Н. И. Колодкин, Н. И. Тапильская, А. Я. Багров 1340

Экспериментальные статьи

Иммуннологические и функциональные показатели крыс в модели принудительного плавания с применением потенциальных адаптогенов
Н. В. Гончаров, Е. А. Корф, И. В. Кудрявцев, М. К. Серебрякова, И. А. Добрылко, А. В. Новожилов, И. В. Миндукшев 1350

Динамика параметров малоамплитудных движений рук при повторяющейся двигательно-когнитивной задаче
Н. Д. Бабанов, Е. А. Бирюкова, Э. Р. Джелдубаева, С. А. Махин, Е. Н. Чуян, О. В. Кубряк 1370

Участие гормонов гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы крыс в гастропротекции при сенситизации и десенситизации капсаицин-чувствительных афферентных нейронов
Т. Т. Подвигина, О. Ю. Морозова, О. П. Комкова, Л. П. Филаретова 1385

Влияние ингибирования циклооксигеназных путей на резистентность к нарастающей гипоксии у крыс с повышенным уровнем интерлейкина-1 бета
Ж. А. Донина, Е. В. Баранова, Н. П. Александрова 1400

Трансдукция рекомбинантного аденоассоциированного вирусного вектора гиппокампа млекопитающих в клетки мозжечка молоди кеты *Oncorhynchus keta*
М. Е. Стуканёва, Е. В. Пущина, А. А. Вараксин 1412

Мембранный гидролиз углеводов и всасывание глюкозы в тонкой кишке крыс при хроническом иммобилизационном стрессе
Л. В. Громова, Е. В. Савочкина, А. С. Алексеева, Ю. В. Дмитриева, А. А. Груздков 1421

Иммуногистохимическое исследование иннервации надпочечника крысы
Е. И. Чумасов, Е. С. Петрова, Д. Э. Коржевский 1436

Поправка

Поправка 1451

CONTENTS

Congratulations to academician A.L. Zefirov 1323

Reviews

Animal Models of Cognitive Impairment in Schizophrenia
M. V. Dorofeikova, E. O. Kutcher, N. N. Petrova, and A. Yu. Egorov 1325

Preeclampsia, Fibrosis and Marinobufagenin
N. I. Agalakova, V. A. Reznik, N. I. Kolodkin, N. I. Tapilskaya, and A. Y. Bagrov 1340

Experimental Articles

Immunological and Functional Indicators of Rats in a Forced Swimming Model with the Application of Potential Adaptogens
N. V. Goncharov, E. A. Korf, I. V. Kudryavtsev, M. K. Serebryakova, A. V. Novozhilov, and I. V. Mindukshev 1350

Dynamics of Parameters of Low-Amplitude Hand Movements in a Repetitive Motor-Cognitive Task
N. D. Babanov, E. A. Biryukova, E. R. Dzheldubaeva, S. A. Makhin, E. N. Chuyan, and O. V. Kubryak 1370

Participation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical System Hormones in Gastroprotection in Rats with Sensitisation and Desensitization of Capsaicin-Sensitive Afferent Neurons
T. T. Podvigina, O. Yu. Morozova, O. P. Komkova, and L. P. Filaretova 1385

Influence of Inhibition of Cyclooxygenase Pathways on Hypoxic Resistance in Rats with Increased Levels of Interleukin-1β
Zh. A. Donina, E. V. Baranova, and N. P. Aleksandrova 1400

Transduction of the Recombinant Adeno-Associated Mammalian Hippocampal Virus Vector in Cells of the Cerebellum of Juvenile *Oncorhynchus keta*
M. E. Stukaneva, E. V. Pushchina, and A. A. Varaksin 1412

Membrane Hydrolysis of Carbohydrates and Glucose Absorption in the Rat Small Intestine under Chronic Immobilization Stress
L. V. Gromova, E. V. Savochkina, A. S. Alekseeva, Y. V. Dmitrieva, and A. A. Gruzdkov 1421

Immunohistochemical Study of Rat Adrenal Gland Innervation
E. I. Chumasov, E. S. Petrova, and D. E. Korzhevskii 1436

Errata

Errata 1451

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 11, с. 1323–1324

АКАДЕМИКУ АНДРЕЮ ЛЬВОВИЧУ ЗЕФИРОВУ – 70 ЛЕТ

DOI: 10.31857/S0869813920310015

2 октября 2020 г. исполнилось 70 лет академику РАН Андрею Львовичу Зефирову – российскому физиологу, признанному в России и за рубежом специалисту в области нейрофизиологии и фундаментальной медицины, доктору медицинских наук, заслуженному деятелю науки Российской Федерации и Республики Татарстан. А.Л. Зефиров является заведующим кафедрой нормальной физиологии, деканом лечебного факультета, директором Института нейронаук Казанского государственного медицинского университета, а также вице-президентом Физиологического общества им. И.П. Павлова.

А.Л. Зефиров в течение многих лет является лидером Казанской физиологической школы. За годы работы он разработал и развил крупное научное направление по изучению клеточно-молекулярных механизмов функционирования возбудимых структур – в первую очередь, синапсов, путей их регуляции биологически активными веществами, нейромедиаторами, газообразными посредниками, липидами и другими биологически активными веществами. При помощи пионерских, разработанных А.Л. Зефировым методов были изучены закономерности функционирования структурно-функциональных единиц нервных окончаний – активных зон. Проанализированы ионные токи и распределение различных видов ионных каналов в нервной клетке. Были реализованы масштабные научные проекты по изучению механизмов регуляции экзо- и эндоцитоза, а также рециклирования си-

наптических везикул. Значительное место в работе А.Л. Зефирова занимают прикладные биомедицинские разработки: детально исследованы клеточно-молекулярные аспекты патогенеза болезни Альцгеймера, бокового амиотрофического склероза, эпилепсии и ряда других социально-значимых заболеваний нервной системы. Проводятся доклинические исследования оригинальных отечественных фармакологических препаратов и генно-клеточных методов для лечения нейродегенеративных заболеваний. А.Л. Зефировым опубликовано более 240 научных статей, индексируемых в международных базах данных, 12 крупных обзоров и 4 монографии.

Являясь председателем Татарстанского отделения Физиологического общества им. И.П. Павлова, профессор А.Л. Зефиров внес большой вклад в сохранение и развитие традиций, преумножение авторитета Казанской физиологической школы. Благодаря энергии и усилиям А.Л. Зефирова, на базе Казанского государственного медицинского университета создана одна из ведущих российских научных школ нейрофизиологии, являющаяся “магнитом” для людей, увлеченных наукой. Возглавляемый А.Л. Зефировым коллектив реализует крупные научные проекты при поддержке многочисленных отечественных и международных грантов, а также пять раз был удостоен звания “Ведущей научной школы России”. Проводятся совместные исследования с коллегами из физиологических лабораторий Москвы, Санкт-Петербурга, Франции, Италии, Великобритании, Австрии, США.

Заслуги А.Л. Зефирова перед отечественной наукой отмечены Благодарностью Президента РФ, премией им. А.А. Ухтомского РАН, медалями им. И.П. Павлова, П.К. Анохина, А.Д. Сперанского, Государственной премией Республики Татарстан. В 2004 г. А.Л. Зефиров был избран член-корреспондентом РАМН. С 2014 г. он является член-корреспондентом, а с 2019 г. – академиком Российской академии наук.

Андрей Львович ведет большую работу по проведению Всероссийских и международных научных конференций. При его непосредственном участии организованы Всероссийские симпозиумы “Физиология медиаторов” и Всероссийские школы по нейробиологии. Наивысшим проявлением организаторских способностей А.Л. Зефирова является проведение Съезда физиологов России в Казани (2001), Всероссийских школ для преподавателей “Избранные лекции по современной физиологии” (2010 и 2016 гг.), международных конференций “Газомедиаторы” (2014), “Заболевания мозга: вызов XXI века” (2018).

Большое место в профессиональной деятельности А.Л. Зефирова занимает подготовка врачей, ученых и преподавателей. Будучи деканом лечебного факультета, профессор Зефиров принимает активное участие в воспитании и подготовке высококвалифицированных медицинских кадров для здравоохранения. За более чем 30 лет пребывания на этой должности он завоевал глубокое уважение и авторитет среди обучающихся и сотрудников университета. Под руководством А.Л. Зефирова защищено 27 кандидатских и 7 докторских диссертаций. Ученики профессора Зефирова работают во многих городах России, а также за рубежом – в США, Франции, Финляндии и других странах.

Коллеги, друзья академика Андрея Львовича Зефирова и редакция Российского физиологического журнала им. И.М. Сеченова искренне поздравляют его с юбилеем, желают ему крепкого здоровья, благополучия и долгих лет плодотворной деятельности на благо российской науки.

Мухамедьяров М.А., Нигматуллина Р.Р.

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 11, с. 1325–1339

ОБЗОРЫ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ КОГНИТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ ПРИ ШИЗОФРЕНИИ

© 2020 г. М. В. Дорофейкова[1, *], Е. О. Кучер[1, 2], Н. Н. Петрова[2], А. Ю. Егоров[1, 2, 3]

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

[2]Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

[3]Северо-западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

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

Поступила в редакцию 11.04.2020 г.
После доработки 04.06.2020 г.
Принята к публикации 26.08.2020 г.

Когнитивные нарушения при шизофрении в настоящее время рассматриваются как третья ключевая группа симптомов наряду с негативной и продуктивной психопатологической симптоматикой. Они встречаются у подавляющего большинства больных и определяют функциональный исход заболевания. В статье представлен обзор литературы, посвященной моделированию когнитивных нарушений при шизофрении на животных. Освещены фармакологические, онтогенетические, генетические модели, их механизмы и характерные проявления, а также способы оценки когнитивных функций у грызунов. В данное время существует множество методов моделирования отдельных когнитивных нарушений, характерных для больных шизофренией, у животных. Такие модели необходимы для дальнейшего развития психофармакологии и изучения патофизиологических механизмов, однако пока что ни одна из них не позволяет воспроизвести всю комплексную и неоднородную структуру когнитивного дефицита пациентов. Особое внимание привлекают онтогенетические модели, которые могут быть применены для исследования факторов риска развития шизофрении и ранних вмешательств при состояниях высокого риска развития психоза.

Ключевые слова: экспериментальное моделирование, шизофрения, когнитивное функционирование, когнитивный дефицит, доклиническое исследование

DOI: 10.31857/S0869813920110059

Когнитивные нарушения в настоящее время рассматриваются как третья ключевая группа симптомов при шизофрении наряду с негативной и продуктивной психопатологической симптоматикой. Они встречаются у подавляющего большинства больных. Клинически значимые нарушения как минимум одной когнитивной функции отмечаются в 90% случаев, не менее двух функций – в 75% случаев. В целом, когнитивный дефицит при шизофрении носит генерализованный характер, при том, что его структура может различаться у отдельных пациентов [1]. Когнитивные нарушения тесно взаимосвязаны с функциональным исходом этого расстройства, однако поиск средств для их коррекции пока что не привел к значимому успеху [2]. В то время как нейровизуализация с помощью функциональной магнитно-резонансной томографии у пациентов позволяет выявить особенности активации зон мозга типичные для больных шизофренией, она не позволяет полу-

чать данные об ее клеточных механизмах. Когнитивные нарушения у людей возникают в результате действия генетических факторов, нарушения развития, внешних воздействий, при этом поиск причинно-следственных связей затруднен, и именно моделирование на животных позволяет изучать эти связи и искать мишени для потенциальных терапевтических вмешательств [3].

Среди когнитивных функций, нарушения которых характерны для больных шизофренией, – внимание, рабочая память, проблемно-решающее поведение (исполнительные функции), скорость обработки информации, зрительные и вербальные обучаемость и память, а также социальные когнитивные функции. В то время как для людей были определены тесты для оценки данных когнитивных функций в клинических исследованиях (MATRICS Consensus Cognitive Battery), аналогичные батареи тестов были предложены и для доклинических исследований потенциальных средств улучшения когнитивных функций при шизофрении, к примеру, инициативой CINTRICS, the Cognitive Neuroscience Treatment Research to Improve Cognition in Schizophrenia [4–6].

Подходы к моделированию шизофрении можно разделить на 1) фармакологические, 2) связанные с развитием, 3) осуществляемые с помощью разрушения структур мозга и 4) генетические [7]. По мнению Lipska и Weinberger [8], согласно Lazar и соавт. [9], различают:

- фармакологические модели, основанные на изменении передачи дофамина;
- модели нарушения развития нервной системы:
  - модели, тестирующие этиологические теории (пренатальная протеиновая депривация, пре- и перинатальные инфекционные воздействия и т.д.),
  - модели нарушения нейрогенеза,
  - модели перинатального стресса,
  - модели неонатального повреждения,
- модели глутаматергической гипофункции;
- генетические модели.

Говоря о проблеме трансляционных исследований и соответствии моделей расстройствам человека, необходимо упомянуть о концепции валидности. Среди видов валидности выделяют 1) конструктную валидность, отражающую соответствие этиологии, 2) очевидную (лицевая, одна из вариантов содержательной) валидность, говорящую о степени отражения симптоматики, внешних проявлений расстройства у животного, 3) предсказательную валидность, определяющую применимость модели для прогнозирования эффективности средств терапии в клинических условиях. Достижение данных критериев представляет собой сложную задачу, в том числе, и из-за недостаточной изученности этиологии многих психических расстройств, невозможности воспроизвести всю полноту симптоматики у дальних филогенетических родственников. Для преодоления этих препятствий на данном этапе некоторые авторы предлагают параллельно использовать две основные группы моделей: обладающих высокой предсказательной и лицевой валидностью и направленных в большей степени на изучение патогенеза расстройств (с высокой конструктной валидностью) [10].

По мнению Wong и Josselyn [11], причинами ограниченной эффективности моделей шизофрении в целом и когнитивных нарушений при ней, в частности, может быть то, что 1) возникающие признаки психиатрических заболеваний не являются простой суммой отдельных симптомов, 2) невозможно добиться эквивалентности между поведением животных и психопатологическими симптомами у человека, 3) модельные животные не могут страдать от тех же болезней, что и люди. Также стоит добавить, что в эпоху начала разработки данных моделей когнитивные нарушения еще не были выделены как отдельный значимый домен шизофрении, а в лучшем случае рассматривались как часть негативной симптоматики [2].

Целями данного обзора стало описание и анализ избранных фармакологических, связанных с нарушением развития и генетических моделей шизофрении у

грызунов с акцентом на их применимость в отношении изучения когнитивного дефицита при шизофрении.

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ КОГНИТИВНЫХ ФУНКЦИЙ И ИХ НАРУШЕНИЕ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ МОДЕЛИРОВАНИЯ ШИЗОФРЕНИИ

1. Внимание

Наиболее распространенным методом оценки внимания у грызунов является тест, заключающийся в том, что животное должно реагировать на появление светового сигнала в одном из пяти отверстий и отвечать на него помещением в это отверстие носа для получения пищевого подкрепления ("five-choice serial reaction-time task", 5-CSRTT, тест на время ответа при слежении за пятью стимулами). Помимо внимания, данный тест позволяет оценить степень импульсивности по количеству ответов до появления сигнала и компульсивное поведение по количеству повторных ответов. Модификацией данной задачи является тест на поддержание постоянной производительности при слежении за пятью стимулами (five-choice continuous performance test, 5C-CPT), этот тест дополнительно включает попытки без какого-либо светового сигнала, во время которых животное не должно реагировать [12–14]. Хорошо изучены эффекты NMDA-антагонистов в отношении внимания: их острое однократное введение снижает аккуратность исполнения 5-CSRTT, а повторное ведет к ухудшению результатов теста 5C-CPT, но не 5-CSRTT [15]. Повреждение вентральной части гиппокампа также ведет к ухудшению внимания, которое может быть дополнительно нарушено при использовании фенциклидина. Ранняя социальная изоляция (после периода материнского вскармливания), а также пренатальное введение метилазоксиметанолацетата (MAM) не влияют на выполнение 5-CSRTT. Мыши с чрезмерной экспрессией катехол-*о*-метилтрансферазы (catechol-*o*-methyltransferase, COMT) дольше обучаются выполнению этого теста, но после стабилизации результатов их показатели не отличаются от таковых обычных животных. Внимание не нарушается при делеции NR1-субъединицы NMDA-рецептора в префронтальной коре (ПФК) или гиппокампе [16].

2. Рабочая память

Простейшим методом оценки рабочей памяти у грызунов является тест в T- или Y-образном лабиринте, основанный на тенденции к чередованию выбора разных отсеков, однако, стоит отметить, что, помимо памяти, в результаты этого теста также вносит свой вклад интерес к новому. Более сложным, рекомендованным CINTRICS методом является оперантный тест отсроченного подбора соответствующего положения (delayed non-match-to-position, DNMTP; delayed match-to-position, DMTP), в котором животному предоставляется выбор между двумя рычагами (левым и правым), с помощью нажатия на рычаги в верной последовательности они получают пищевое подкрепление (необходимо чередовать нажатия на разные рычаги или, наоборот, все время нажимать на один и тот же, в зависимости от теста). Существует также тест в восьмилучевом лабиринте, в котором пищевое вознаграждение располагается в ранее (на предварительном этапе) не посещенных отсеках. Таким образом, задачи для оценки рабочей памяти обычно предполагают запоминание информации о пространстве для получения вознаграждения. Для оценки объема рабочей памяти разработан тест на запоминание диапазона запахов (odour span task), в котором при каждой новой попытке появляется новая емкость, помеченная новым запахом, и крысы должны находить спрятанную награду с помощью выявления этих новых емкостей [17].

Вызываемые однократным введением NMDA-антагонистов нарушения рабочей памяти выявляются в задаче DNMTP, повторными инъекциями фенциклидина – в тесте с постоянным чередованием, пренатальным введением MAM и разрушением

вентральной части гиппокампа – в тесте в восьмилучевом лабиринте и задаче спонтанного чередования. Активация иммунной системы матери сказывается на выполнении DNMTP взрослых крыс. Также нарушения рабочей памяти происходят у трансгенных мышей с полиморфизмом COMT-Val, мутацией в гене дисбиндина и избыточной экспрессией D2-рецепторов в стриатуме. Снижение объема рабочей памяти выявляется у грызунов после введения NMDA-антагонистов и в иммунологических моделях [16].

3. Проблемно-решающее поведение

Проблемно-решающее поведение отражает исполнительные функции, необходимые для контроля над поведением и его координации, и одной из исполнительных функций является когнитивная гибкость, которая позволяет корректировать поведение в соответствии с изменяющимися внешними условиями и, таким образом, обеспечивает адаптацию. Для больных шизофренией характерен недостаток когнитивной гибкости, что проявляется, к примеру, в персеверациях в задаче сортирования карточек в Висконсинском тесте. У грызунов когнитивную гибкость оценивают с помощью теста на переключение внимания (attentional set-shifting task, ASST), в котором животные должны переключаться между двумя характеристиками (к примеру, запах и структура материала, которым покрыта содержащая пищу кормушка) для осуществления верного выбора места расположения награды и получения пищевого подкрепления. Как у человека, так и у крысы когнитивная гибкость обеспечивается ПФК, и ее оценка позволяет получать ценную, четкую информацию с точки зрения трансляционных исследований. Помимо вышеописанного теста, в качестве метода оценки исполнительных функций у грызунов также используется задача обратного обучения (reversal learning), у которой существует множество модификаций, включая тесты на выбор отсека в лабиринте или проводимые в автоматизированных оперантных камерах [18–20].

Нарушения когнитивной гибкости были продемонстрированы на многих моделях шизофрении, в том числе, при остром, повторном и постнатальном введениях кетамина или фенциклидина мышам и крысам, на моделях, связанных с развитием, включая метод ранней социальной изоляции, генетических моделях (мышах с полиморфизмом COMT-Val, делецией NR2A-субъединицы NMDA-рецептора) [16].

4. Скорость обработки информации

Скорость обработки информации – одна из базовых характеристик когнитивного функционирования, которая часто нарушается при шизофрении. Данная функция может быть оценена у грызунов с помощью задач на время реакции, которые требуют от них оперантного ответа – нажатия на педаль или помещения носа в отверстие (чаще для крыс и мышей соответственно). К примеру, 5-CSRTT позволяет оценить быстроту правильного ответа, которая снижается в результате однократного или повторного введения NMDA-антагонистов, повреждения вентральной части гиппокампа, но не в моделях изоляции и при применении MAM [16].

5. Зрительные обучение и память

В то время как для оценки зрительной памяти у людей применяют различные задания с воспроизведением сложных геометрических фигур или набора отдельных фигур, аналогом для грызунов служит тест распознавания новых объектов (novel object recognition test), который основан на врожденном интересе этих животных к новому. В данном тесте на первом, подготовительном этапе животным предоставляется возможность изучать два объекта, а на втором этапе один из этих объектов заменяется на альтернативный, новый, который в норме привлекает больше внимания. Среди

преимуществ этого метода – отсутствие необходимости в длительном обучении и стресса, а из недостатков – то, что многие потенциальные лекарства демонстрируют в нем свою эффективность у грызунов, но она не наблюдается у людей на этапе клинических исследований [21]. Для большего сходства задачи с оценкой кратковременной памяти у людей были предложены модификации с использованием пространственных подсказок, с заменой не объекта, а его местонахождения, демонстрацией объектов, оба из которых были ранее продемонстрированы, но в разное время (более давно изученный должен быть более активно изучаемым) и т.д. [22]. Инициатива CINTRICS в качестве наиболее валидного метода оценки долговременной зрительной памяти выделила задачу на ассоциативное запоминание пар объектов и местоположений (touchscreen object-location paired-associate learning, PAL).

Одним из наиболее распространенных методов скрининга эффективности соединений в отношении когнитивного дефицита при шизофрении является их применение при нарушении распознавания новых объектов в результате введения NMDA-антагонистов. Узнавание также ухудшается после неонатального разрушения вентральной части гиппокампа, активации иммунного ответа у матери, ранней социальной изоляции и в генетических моделях [16].

6. Социальные когнитивные функции

Нарушение социальных когнитивных функций значимо предопределяет функциональный исход шизофрении и отражает степень повседневного функционирования. Обработку эмоциональной информации у людей оценивают с помощью теста распознавания эмоций, в котором испытуемым демонстрируют изображения с различными выражениями лиц [23]. У крыс же проводят тесты социального взаимодействия, к примеру, измеряя время повторной коммуникации или сравнивая длительность ее с двумя другими крысами – ранее знакомой и встречаемой впервые. Также социальную активность можно оценивать, предоставляя крысе выбор между нахождением в отсеках с доступом к другому животному или без него (“трехкомнатный тест”, three-chamber test) [24]. От социальных ситуаций зависят звуковые сигналы крыс, которые можно делить на негативно окрашенные (22 кГц, более низкочастотные звуки, которые могут издаваться при встрече с хищником или агрессивных взаимодействиях между самцами) и положительно окрашенные высокочастотные сигналы (50 кГц) [25].

Нарушения социального функционирования были продемонстрированы в моделях острого и повторного введения NMDA-антагонистов, при воздействии фенциклидина в неонатальном периоде. Недостаток социального взаимодействия характерен также для других дизонтогенетических моделей [26], а также ряда трансгенных мышей, в том числе, с нарушениями функционирования гена *DISC1* [16]. К примеру, воздействие фенциклидина в процессе развития приводит к устойчивому нарушению социального взаимодействия, снижению мотивации к данному поведению в тесте предпочтения места; результаты применения антипсихотиков в отношении социальных когнитивных функций у таких животных разнятся, а долгосрочные эффекты и вовсе не были достигнуты [16]. Модели внутриутробной иммунной реакции приводят к нарушениям социального взаимодействия, эмпатии и вокализаций; связанные с этим механизмы пока что не изучены [27].

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ

Среди фармакологических моделей наиболее важную роль играют методы, основанные на блокаде глутаматергических NMDA-рецепторов, разработка этих методов началась в конце 1980-х годов. Острое, повторное или раннее постнатальное введение NMDA-антагонистов (фенциклидина, кетамина, дизоцилпина) приводило к развитию у грызунов шизофреноподобной симптоматики, включая когнитивные нарушения. Показано, что повторные введения фенциклидина приводят к значитель-

ным нейрохимическим и поведенческим нарушениям, даже длительное время спустя после их прекращения [28]. Сохраняет актуальность и одна из первых фармакологических моделей шизофрении – амфетаминовая, основанная на введении животным агониста дофаминовых рецепторов 2 подтипа амфетамина (фенамина).

Амфетаминовая модель шизофрении. Хроническое введение амфетамина грызунам приводит к сенситизации его активирующего эффекта и нарушению когнитивных функций, связанных с ПФК (когнитивная гибкость, внимание), однако, не позволяет получить снижение интереса к социальному взаимодействию или нарушение пространственной зрительной памяти, т.е. функционирования гиппокампа [29–32].

Нами была предложена альтернативная дофаминергическая модель шизофрении с использованием противопаркинсонического препарата Леводопа + Карбидопа (Наком®). Было показано, что введение Леводопа + Карбидопа крысам вызывает гиперчувствительность к звуковым стимулам и стереотипное поведение, а также приводит к снижению социальных взаимодействий, исследовательской и двигательной активности крыс [33, 34].

В целом, модели, связанные с активацией преимущественно дофаминергической системы, хороши для воспроизведения позитивной симптоматики, но не когнитивных нарушений, т.е. их лицевая валидность в отношении когнитивного функционирования недостаточна.

Фенциклидиновая модель шизофрении. Введение фенциклидина, антагониста NMDA-рецепторов, здоровым добровольцам вызывает обратимые психотические симптомы, сопровождающиеся также и когнитивными нарушениями, что свидетельствует о роли глутамата в патогенезе когнитивного дефицита при шизофрении [35]. Острое, повторное или перинатальное введение фенциклидина приводит к нарушению памяти, внимания и обучения [36].

У грызунов острое введение фенциклидина вызывает моторное возбуждение, социальную отстраненность и нарушения когнитивных функций, однако, субхроническое или повторное его введение (к примеру, 2 раза в сутки в течение 7 дней, после чего следуют 7 дней без применения фенциклидина) имеет большую трансляционную ценность, поскольку приводит к восстановлению моторики и мотивации, а также воспроизведению эффектов у обезьян. Оно вызывает нарушения рабочей памяти, внимания и скорости обработки информации (в задаче 5-CSRTT), зрительной памяти (в тесте распознавания объекта) и проблемно-решающего поведения (в лабиринтах, задачах на когнитивную гибкость), т.е. дефицит как минимум в пяти из семи основных доменов когнитивного функционирования [37, 38]. Однако следует отметить, что нарушения преимпульсного торможения быстро купируются после прекращения введения фенциклидина, с чем могут быть связаны его разнящиеся эффекты при разных условиях проведения экспериментов (введение фенциклидина 5 дней подряд, оценка когнитивных функций через 3, а не 7 дней после последней дозы препарата при субхроническом введении необходимы для наблюдения когнитивного дефицита) [7, 39].

В механизмах возникающих когнитивных нарушений задействована регуляция генов, отвечающих за апоптоз, – проявление нейротоксического влияния NMDA-антагонистов преимущественно на лобную кору, а также снижение объема гиппокампа и дисфункция синапсов [40]. На модели с неонатальным введением NMDA-антагониста дизоцилпина (МК-801) было показано, что их когнитивные нарушения связаны с нарушениями синаптической пластичности в гиппокампе, в частности, зоны CA1 [41, 42] и что их можно предотвратить с помощью обогащения среды, которое приводит к восстановлению уровня нейротрофического фактора головного мозга в гиппокампе [43]. Это немаловажные данные, свидетельствующие о применимости этой модели для исследования факторов риска развития шизофрении, т.е. ее конструктной валидности. В исследовании Kozela и соавт. 2020 г. было показано, что нарушения памяти у крыс после повторного введения кетамина сопряжены с измене-

ниями транскрипции ряда генов в клетках астро- и микроглии, связанных с синаптической пластичностью, и могут быть обращены с помощью однократного введения каннабидиола [44]. К сожалению, предсказательная валидность данной модели в отношении терапии когнитивных нарушений оставляет желать лучшего: у животных они могут быть обратимы под влиянием антипсихотиков второго поколения, что противоречит результатам клинических исследований [7]. С целью повышения валидности модели были предложены ее модификации с повторным введением фенциклидина в постнатальном периоде вместо использования взрослых животных [36]. Данные, касающиеся возникающих в результате таких манипуляций долгосрочных когнитивных нарушений, в том числе, и социального распознавания, разнятся.

Метиониновая модель шизофрении была предложена Wang с соавт. [45] на основании ранее полученных данных о том, что длительное введение метионина вызывает поведенческие реакции, которые имитируют определенные симптомы шизофрении, такие как социальный дефицит и предимпульсное торможение [46]. Моделирование заключается в введении аминокислоты L-метионина (750 мг/кг) самцам мышей линии Swiss Webster в возрасте 8–11 недель 2 раза в день в течение 7 дней. Авторы показали, что введение метионина вызывает поведенческие реакции, отражающих все три домена шизофренических симптомов, которые купируются с помощью антипсихотиков галоперидола и клозапина. Когнитивные нарушения у животных наблюдаются в тестах на социальное взаимодействие, предимпульсное торможение, распознавание новых объектов и обучаемость. Следует отметить, что когнитивные нарушения у больных шизофренией, которые принято оценивать на этапе ремиссии, не купируются в результате применения антипсихотиков, т.е. предиктивная валидность данной модели в отношении когнитивных расстройств недостаточна.

МОДЕЛИ НАРУШЕНИЯ РАЗВИТИЯ

Модели шизофрении, связанные с развитием, достигаются с помощью введения митотоксина (МАМ) во время беременности, материнской иммунной активации или разрушения в неонатальном периоде вентральной части гиппокампа. Эпидемиологические исследования указывают на связь инфекций во время беременности и шизофрении, и, соответственно, у грызунов используются такие модели материнских инфекций, как введение липополисахарида для вызова иммунной реакции по типу ответа на бактериальную инфекцию и введение синтетической двуцепочечной РНК – вирусную инфекцию. Среди моделей, связанных с развитием, также есть модели, включающие стресс в раннем возрасте, например, разлучение с матерью или социальная изоляция после периода материнского вскармливания.

Введение МАМ на 17-е сутки беременности. МАМ избирательно нарушает пролиферацию нейробластов центральной нервной системы, при этом не влияя на иные органы, количество крысят в помете или их массу тела [47]. У крыс пик нейрогенеза приходится на 15-е сутки беременности, поэтому введение МАМ в это время приводит к особенно выраженным изменениям головного мозга (микроцефалии, снижению объема коры до 70%). Для моделирования более мягкой патологии, отражающей таковую при шизофрении, используют введение МАМ на 17-е сутки беременности, когда пролиферация нейронов коры снижается. В результате удается получить более ограниченное и избирательное снижение объема неокортекса и частей лимбической системы, включая ПФК, энторинальную, затылочную кору, гиппокамп (снижается количество нейронов в CA2 и изменяется морфология клеток в других его зонах), но не расширение желудочков, свойственное больным шизофренией [48].

Нарушения поведения меняются в соответствии со временем введения МАМ: при применении его на 14-е сутки гестации у потомства усиливается исследовательское поведение, на 15-е – появляется ночная гиперактивность, а на 16–17-е – снижается активность (разрушение холинергических нейронов полосатого тела сменяется гибелью дофаминергических нейронов). У крыс, получивших МАМ на

17-е сутки внутриутробного развития, наблюдаются повышение спонтанной электрической активности дофаминергических нейронов вентральной области покрышки и дополнительное усиление двигательной активности в ответ на введение амфетамина, эти изменения можно обратить с помощью инактивации вентральной части гиппокампа. Повышенная активность последней может быть связана с тем, что введение МАМ приводит к потере ГАМК-ергических парвальбумин-содержащих интернейронов, что характерно для больных шизофренией, это свидетельствует о конструктной валидности модели [49].

Лицевая валидность данной модели в отношении когнитивных симптомов также является достойной. Среди когнитивных нарушений у крыс, получивших МАМ на 17-е сутки внутриутробного развития, наблюдаются нарушения когнитивной гибкости (переучивания в задаче Y-образного лабиринта, теста на пространственную память) [49], непосредственно пространственной памяти во взрослом возрасте [50], а также распознавания нового объекта и социальных когнитивных функций, что связывают, в том числе, со снижением содержания окситоцина и его рецепторов в ПФК; окситоцина, вазопрессина и их рецепторов в гипоталамусе [51]. Удивительно, что на этой модели не были испытаны фармакологические препараты, т.е. ее предиктивная валидность пока что неизвестна.

Модель материнской иммунной активации (МИА). Вторая модель осуществляется путем пренатальной иммунной активации с помощью системного введения побочного продукта репликации вируса, полирибоинозин-полирибоцитидиловой кислоты (поли I:C, 4 мг/кг$^{-1}$ GD15) беременным самкам, вызывающего острое повышение цитокинов, и изучение последствий такой иммунизации для потомства [28]. В результате такого воздействия у потомства развиваются когнитивные нарушения: увеличивается время достижения платформы при тесте с переучиванием в Т-образном и в водном лабиринте [52]. Достаточно большое количество доказательств указывает на то, что у потомков грызунов и приматов, перенесших МИА во время беременности, наблюдаются анатомические, нейрохимические, электрофизиологические и поведенческие изменения, которые отмечаются при шизофрении [54–57], как и другие нарушения развития, включая аутизм [58]. Недавние исследования с использованием этой модели указывают на изменения в парвальбуминовых интернейронах и связанных с ними перинейрональных сетях (структурах внеклеточного матрикса, участвующих в структурной и синаптической пластичности) в префронтальной коре и гиппокампе, сопряженных с когнитивными нарушениями [59–61]. Кроме того, Yim и соавт. [62] показали на мышах, что в основе поведенческих изменений у потомства после МИА лежат нарушения в первичной соматосенсорной коре.

Социальная изоляция после периода материнского вскармливания. Социальная депривация крысят в раннем возрасте приводит к нарушению развития мозга и поведенческим изменениям во взрослом возрасте, включая нарушения фильтрации сенсорной информации и когнитивные нарушения [63, 64]. Среди нейробиологических изменений у данных животных, связанных с когнитивным функционированием и аналогичных наблюдающимся при шизофрении, выявляется уменьшение объема ПФК [65], снижение плотности шипиков дендритов [66], нарушение морфологии цитоскелета, снижение количества ГАМК-ергических интернейронов (клеток-канделябров) гиппокампа и ПФК [67], снижение плотности дофаминовых рецепторов 1-го подтипа [68]. Среди когнитивных нарушений, характерных для данной модели, – снижение памяти в тесте распознавания нового объекта [64] и когнитивной гибкости, что связывают с нарушением связей между ПФК и полосатым телом, но не зрительно-пространственной памяти [69]. При несомненной простоте и доступности данной модели, основным ее недостатком является вероятность обратимости поведенческих эффектов в результате повторного тактильного контакта с людьми и избытка тестов на этапе развития [70], а также сомнительная предиктивная валидность в отношении коррекции когнитивных функций: к

примеру, было показано, что применение клозапина приводит к улучшению показателей когнитивной гибкости у крыс, чего не происходит у людей [71]. В последние годы на этой модели испытывают, к примеру, эффекты агонистов глицинового сайта NMDA-рецепторов, некоторые из которых способны улучшать память крыс без влияния на гиперактивность [72].

Разрушение вентральной части гиппокампа в неонатальном периоде. Разрушение вентральной части гиппокампа крыс, которая соответствует передней части гиппокампа у людей, на 7-й день жизни с помощью двусторонних инъекций иботеновой кислоты в данную область приводит к поведенческим нарушениям в постпубертатном периоде, связанным с нарушениями развития медиальной ПФК и прилежащего ядра, которые в норме получают выраженную иннервацию от вентральной части гиппокампа [73]. Нарушения пространственной и рабочей памяти возникают приблизительно на 25-й день жизни, снижение социальной активности и повышение уровня агрессии – на 35-й день, полный же спектр симптоматики, включающий в себя повышенную локомоторную активность в ответ на стресс, повышенную чувствительность системы подкрепления (которая не соответствует проявлениям шизофрении), а также к агонистам дофаминовых и NMDA-рецепторов и др., появляется примерно на 56-е сутки [74]. Было показано, что дефицит пространственной памяти у данных крыс связан с нарушением функционирования связей между гиппокампом и ПФК, но не гиппокампом и прилежащим ядром [75]. Снижение когнитивной гибкости, внимания и обработки зрительной информации также связаны с дисфункцией ПФК, что отражает клиническую реальность [76]. К недостаткам данного метода стоит отнести смертность, которая достигает 15%, а также наблюдаемое порой в 30–33% случаев достижение лишь одностороннего разрушения гиппокампа [7].

В целом, модели нарушения развития нервной системы позволяют исследовать процессы, приводящие к развитию когнитивных нарушений при шизофрении во время продромальной фазы заболевания, и помогут потенциальной разработке профилактического лечения для предотвращения когнитивных нарушений и прогрессирования психоза. Важным аспектом является лицевая валидность данных моделей в отношении времени развития патологии: долгосрочные нарушения возникают в постпубертатном периоде, как у пациентов с шизофренией.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ

Вклад генетического фактора в патогенез шизофрении долгое время был предметом изучения и стал основой для нескольких моделей на животных. Многочисленные гены-кандидаты были связаны с повышенным риском развития шизофрении, и большинство из этих генов связаны с белками, имеющими отношение к нейрональной пластичности, глутаматергической или дофаминергической передаче и синаптогенезу [77, 78]. Крупнейшее на сегодняшний день исследование ассоциации всего генома, включая данные из 37 000 пациентов и 113 000 контролей, было опубликовано в 2014 г. [79]. Из этого набора данных было идентифицировано 108 локусов, связанных с шизофренией. Многие из этих генов были использованы для создания животных моделей шизофрении, и новые локусы позволят создать еще больше моделей, в первую очередь, на мышах [28].

Учитывая значение генетических факторов в развитии шизофрении, также используются и соответствующие ее модели, преимущественно основанные на нарушении дофаминергической и глутаматергической передачи. К примеру, COMT является ферментом, который отвечает за разрушение дофамина, а полиморфизм его гена (вариант с валином вместо метионина в 158-м кодоне) приводит к повышению его активности и снижению уровня дофамина в ПФК, что проявляется в когнитивных нарушениях у мышей с соответствующей мутацией. Помимо этой модели, были созданы линии мышей с чрезмерной экспрессией D2-рецепторов в

стриатуме и недостатком отдельных субъединиц NMDA-рецепторов (NR1, NR2A или NR2B) [16].

Ген *DISC1* (disrupted-in-schizophrenia 1, нарушенный-при-шизофрении-1). Ген *DISC1*, кодирующий синаптический белок, который необходим для успешного формирования нейронов в пре- и постнатальном периоде и участвует в появлении синапсов, миграции нейронов и синаптической пластичности, был одним из первых генов, которые рассматривались в качестве причин развития шизофрении. Было создано семь линий трансгенных мышей с нарушениями функционирования гена *DISC1* [80], которые характеризуются расширением боковых желудочков, снижением толщины коры головного мозга и его объема, а некоторые из них – нарушениями структуры дендритов в гиппокампе. Данные о поведенческих отклонениях данных мышей разнятся, однако, есть свидетельства их нарушений пространственной рабочей памяти, социальных когнитивных и исполнительных функций при сохранности пространственной памяти и успешном распознавании новых объектов [27].

Ген, кодирующий белок дисбиндин. Дисбиндин – синаптический белок, регулирующий экзоцитоз, в том числе, выброс возбуждающих нейромедиаторов. Его ген рассматривается в качестве одного из генов-кандидатов, связанных с развитием шизофрении, и в дорсолатеральной ПФК и гиппокампе пациентов обнаруживается снижение его экспрессии. Мыши гомо- и гетерозиготные по гену, кодирующему дисбиндин, демонстрируют некоторые проявления, напоминающие симптоматику шизофрении. Среди когнитивной симптоматики – нарушение фильтрации сенсорной информации, рабочей и пространственной памяти, снижение интереса к социальному взаимодействию [7]. Оценка предиктивной валидности данных моделей в плане коррекции когнитивных нарушений пока что не была осуществлена.

Ген, кодирующий белок рилин. Рилин участвует в формировании синапсов и пластичности ЦНС, а его экспрессия снижена в мозжечке, гиппокампе и коре лобных долей больных шизофренией. В то время как гомозиготные по данному гену мыши-нокауты демонстрируют значительные нарушения функционирования, спонтанно-мутировавшие гетерозиготы имеют признаки, позволяющие рассматривать их как модель шизофрении, в том числе, к примеру, снижение плотности дендритных шипиков в коре лобных долей и гиппокампе; неожиданно наблюдать при этом, что у данных животных не нарушены когнитивные функции, связанные с ПФК (когнитивная гибкость, пространственная и рабочая память, внимание) [81].

Мыши-нокауты по гену циклина-D2 (cyclin-D2). Данная модель была предложена для изучения такого эндофенотипа, характерного для шизофрении, как гиперактивность передней части гиппокампа (повышения метаболизма в зоне CA1), которая позволяет предсказать переход от продромальной фазы к манифестации психоза у людей. Данное проявление наблюдается и у животных после пренатального воздействия МАМ. Говоря о патофизиологических основах когнитивных нарушений, животные с нокаутированным геном циклина-D2 характеризуются снижением содержания парвальбумин-содержащих нейронов в гиппокампе, особенно зоне CA1, и части неокортекса, но не в медиальной ПФК. Среди когнитивных нарушений выявляются нарушения когнитивной гибкости и рабочей памяти, но не внимания; сопоставление данных фактов позволяет расширить представления о патофизиологических взаимосвязях от генетических факторов через нейробиологические характеристики до когнитивных проявлений [82].

Линия мышей LgDel+/–. Делеция участка 16-й хромосомы у мышей является аналогом синдрома делеции 22q11.2 у человека. У таких мышей наблюдается сниженное содержание и пластичность парвальбумин-содержащих интернейронов и связанные с ними когнитивные нарушения, включающие дефицит исполнительских функций, а также нарушения социального поведения, которые могут быть обратимы с помощью хемогенетической активации парвальбумин-содержащих нейронов или введения антагонистов дофаминовых рецепторов 2-го подтипа в вентраль-

ной части гиппокампа или медиальной ПФК в период позднего подросткового возраста – критический период развития. Таким образом, данная модель может позволить тестировать методы раннего вмешательства при состояниях высокого риска развития шизофрении, что выделяет ее из ряда остальных методик [83].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, существует множество методов моделирования отдельных когнитивных нарушений, характерных для больных шизофренией, у животных, которые необходимы для дальнейшего развития психофармакологии и изучения патофизиологических механизмов, однако пока что ни один из этих методов не позволяет воспроизвести всю комплексную и неоднородную структуру когнитивного дефицита пациентов. Особое внимание привлекают онтогенетические модели, к примеру, модели с неонатальным введением NMDA-антагонистов или генетические модели LgDel+/–, нокауты по гену циклина-D2, которые могут быть применены для исследования факторов риска развития когнитивных нарушений при шизофрении и ранних вмешательств при состояниях высокого риска развития психоза, среди которых сейчас используют, в том числе, и методы когнитивной ремедиации [84].

Проанализировав представленную информацию, можно придти к выводу, что конструктная валидность большинства рассмотренных моделей далека от идеала, поскольку лишь отрывочно отражает патогенез когнитивных расстройств и шизофрении в целом. В большей степени удовлетворяет лицевая валидность моделей: во всех них обнаруживаются отдельные когнитивные нарушения, однако, одной из проблем может быть недостаток внимания к когнитивному функционированию, применение ограниченного набора тестов при валидации моделей и в доклинических фармакологических исследованиях.

В целом, несмотря на сложную гетерогенную этиологию шизофрении и наблюдающихся при ней когнитивных нарушений, которая включает в себя как влияние факторов окружающей среды, так и генетические факторы, модели на животных расширяют наши знания о патологии головного мозга при шизофрении. С дальнейшим совершенствованием моделей и нашего понимания патофизиологии когнитивных расстройств, характерных для шизофрении, возможна дальнейшая идентификация путей для фармакотерапии, улучшение тестирования потенциальных новых фармакологических агентов и разработка более эффективных методов лечения.

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. *Шмуклер А.Б.* Шизофрения. М. ГЭОТАР-Медиа. [Shmukler A.B. Shizofrenia [Schizophrenia]. Moscow. GEOTAR-Media. 2017. (In Russ)].
2. *Keefe R.S., Harvey P.D.* Cognitive impairment in schizophrenia. Handb. Exp. Pharmacol. 213: 11–37. 2012.
3. *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.
4. *Green M.F., Nuechterlein K.H., Gold J.M., Barch D.M., Cohen J., Essock S., Fenton W.S., Frese F., Goldberg T.E., Heaton R.K., Keefe R.S., Kern R.S., Kraemer H., Stover E., Weinberger D.R., Zalcman S., Marder S.R.* Approaching a consensus cognitive battery for clinical trials in schizophrenia: the NIMH-MATRICS conference to select cognitive domains and test criteria. Biol. Psychiatry. 56(5): 301–307. 2004.
5. *Young J.W., Powell S.B., Risbrough V., Marston H.M., Geyer M.A.* Using the MATRICS to guide development of a preclinical cognitive test battery for research in schizophrenia. Pharmacol. Ther. 122(2): 150–202. 2009.

6. *Moore H., Geyer M.A., Carter C.S., Barch D.M.* Harnessing cognitive neuroscience to develop new treatments for improving cognition in schizophrenia: CNTRICS selected cognitive paradigms for animal models. Neurosci. Biobehav. Rev. 37(9 Pt B): 2087–2091. 2013.
7. *Jones C.A., Watson D.J., Fone K.C.* Animal models of schizophrenia. Br. J. Pharmacol. 164(4): 1162–1194. 2011.
8. *Lipska B.K., Weinberger D.R.* To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. Neuropsychopharmacology. 23: 223–239. 2000.
9. *Lazar N.L., Neufeld R., Cain D.P.* Contribution of non-primate animal models in understanding the etiology of schizophrenia. J. Psychiatry Neurosci. 36(4): 5–29. 2011.
10. *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.
11. *Wong A.H., Josselyn S.A.* Caution When Diagnosing Your Mouse with Schizophrenia: The Use and Misuse of Model Animals for Understanding Psychiatric Disorders. Biol. Psychiatry. 79(1): 32–38. 2016.
12. *Callahan P.M., Terry A.V., Jr.* Attention. Handb. Exp. Pharmacol. 228: 161–189. 2015.
13. *Young J.W., Light G.A., Marston H.M., Sharp R., Geyer M.A.* The 5-choice continuous performance test: evidence for a translational test of vigilance for mice. PLoS One. 4(1): e4227. 2009.
14. *Lustig C., Kozak R., Sarter M., Young J.W., Robbins T.W.* CNTRICS final animal model task selection: control of attention. Neurosci. Biobehav. Rev. 37(9 Pt B): 2099–2110. 2013.
15. *Amitai N., Markou A.* Disruption of performance in the five-choice serial reaction time task induced by administration of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists: relevance to cognitive dysfunction in schizophrenia. Biol. Psychiatry. 68(1): 5–16. 2010.
16. *Nikiforuk A.* Assessment of cognitive functions in animal models of schizophrenia. Pharmacol. Rep. 70(4): 639–649. 2018.
17. *Dudchenko P.A., Talpos J., Young J., Baxter M.G.* Animal models of working memory: a review of tasks that might be used in screening drug treatments for the memory impairments found in schizophrenia. Neurosci. Biobehav. Rev. 37(9 Pt B): 2111–2124. 2013.
18. *Gilmour G., Arguello A., Bari A., Brown V.J., Carter C., Floresco S.B., Jentsch D.J., Tait D.S., Young J.W., Robbins T.W.* Measuring the construct of executive control in schizophrenia: defining and validating translational animal paradigms for discovery research. Neurosci. Biobehav. Rev. 37(9 Pt B): 2125–2140. 2013.
19. *Goetghebeur P.D., Dias R.* The attentional set-shifting test paradigm in rats for the screening of novel pro-cognitive compounds with relevance for cognitive deficits in schizophrenia. Curr. Pharm. Des. 20(31): 5060–5068. 2014.
20. *Tait D.S., Chase E.A., Brown V.J.* Attentional set-shifting in rodents: a review of behavioural methods and pharmacological results. Curr. Pharm. Des. 20(31): 5046–5059. 2014.
21. *Grayson B., Leger M., Piercy C., Adamson L., Harte M., Neill J.C.* Assessment of disease-related cognitive impairments using the novel object recognition (NOR) task in rodents. Behav. Brain. Res. 285: 176–193. 2015.
22. *Ameen-Ali K.E., Easton A., Eacott M.J.* Moving beyond standard procedures to assess spontaneous recognition memory. Neurosci. Biobehav. Rev. 53: 37–51. 2015.
23. *Green M.F., Horan W.P., Lee J.* Social cognition in schizophrenia. Nat. Rev. Neurosci. 16(10): 620–631. 2015.
24. *Wilson C.A., Koenig J.I.* Social interaction and social withdrawal in rodents as readouts for investigating the negative symptoms of schizophrenia. Eur. Neuropsychopharmacol. 24(5): 759–773. 2014.
25. *Wöhr M., Engelhardt K.A., Seffer D., Sungur A.Ö., Schwarting R.K.W.* Acoustic communication in rats: effects of social experiences on ultrasonic vocalizations as socioaffective signals. Curr. Top. Behav. Neurosci. 30: 67–89. 2017.
26. *Moser P.* Evaluating negative-symptom-like behavioural changes in developmental models of schizophrenia. Eur. Neuropsychopharmacol. 24(5): 774–787. 2014.
27. *Kimoto S., Makinodan M., Kishimoto T.* Neurobiology and treatment of social cognition in schizophrenia: Bridging the bed-bench gap. Neurobiol. Dis. 131: 104315. 2019.
28. *Winship I.R., Dursun S.M., Baker G.B., Balista P.A., Kandratavicius L., Maia-de-Oliveira J.P., Hallak J., Howland J.G.* An Overview of Animal Models Related to Schizophrenia. Can. J. Psychiatry. 64(1): 5–17. 2019.
29. *Featherstone R.E., Rizos Z., Kapur S., Fletcher P.J.* A sensitizing regimen of amphetamine that disrupts attentional set-shifting does not disrupt working or long-term memory. Behav. Brain. Res. 189: 170–179. 2008.
30. *Sams-Dodd F.* A test of the predictive validity of animal models of schizophrenia based on phencyclidine and D-amphetamine. Neuropsychopharmacology. 18(4): 293–304. 1998.
31. *Geyer M.A., Ellenbroek B.A.* Animal behaviour models of the mechanisms underlying antipsychotic atypicality. Prog. Neuropsychoph. 27: 1071–1079. 2003.
32. *Wang M., Pei L., Fletcher P.J., Kapur S., Seeman Ph., Liu S.* Schizophrenia, amphetamine-induced sensitized state and acute amphetamine exposure all show a common alteration: increased dopamine D2 receptor dimerization. Mol. Brain. 3: 25. 2010.
33. *Кучер Е.О., Егоров А.Ю., Черникова Н.А., Филатова Е.В.* Моделирование экспериментальной шизофрении при помощи Леводопы + Карбидопы. Журн. эволюционной био-

химии и физиологии. 49(5): 352–356. 2013. [*Kutcher E.O., Egorov A.Yu., Chernikova N.A., Filatova E.V.* Modeling experimental schizophrenia using Levodopa + Carbidopa. J. Evol. Biochem. Physiol. 49(5): 352–356. 2013. (In Russ)].

34. *Кучер Е.О., Егоров А.Ю., Филатова Е.В.* Влияние этанола на социальное поведение, исследовательскую и двигательную активность крыс при экспериментальном моделировании шизофрении. Психическое здоровье. 7: 16–23. 2019. [*Kucher E.O., Egorov A.Yu., Filatova E.V.* Influence of ethanol on social behavior, exploratory and motor activity of rats in experimental model of schizophrenia. Mental Health. 7: 16–23. 2019. (In Russ)].
35. *Javitt D.C., Zukin S.R.* Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. Am. J. Psychiatry. 148(10): 1301–1308. 1991.
36. *Mouri A., Noda Y., Enomoto T., Nabeshima T.* Phencyclidine animal models of schizophrenia: Approaches from abnormality of glutamatergic neurotransmission and neurodevelopment. Neurochem. Int. 51: 173–184. 2007.
37. *Amitai N., Semenova S., Markou A.* Cognitive–disruptive effects of the psychotomimetic phencyclidine and attenuation by atypical antipsychotic medications in rats. Psychopharmacology. (Berl.). 193: 521–537. 2007.
38. *Neill J.C., Barnes S., Cook S., Grayson B., Idris N.F., McLean S.L., Snigdha S., Rajagopal L., Harte M.K.* Animal models of cognitive dysfunction and negative symptoms of schizophrenia: focus on NMDA receptor antagonism. Pharmacol. Ther. 128(3): 419–432. 2010.
39. *Tenn C.C., Kapur S., Fletcher P.J.* Sensitization to amphetamine, but not phencyclidine, disrupts prepulse inhibition and latent inhibition. Psychopharmacology. (Berl.). 180(2): 366–376. 2005.
40. *Takahashi M., Kakita A., Futamura T., Watanabe Y., Mizuno M., Sakimura K., Castren E., Nabeshima T., Someya T., Nawa H.* Sustained brain-derived neurotrophic factor up-regulation and sensorimotor gating abnormality induced by postnatal exposure to phencyclidine: comparison with adult treatment. J. Neurochem. 99: 770–780. 2006.
41. *Bartsch J.C., Schott B.H., Behr J.* Hippocampal dysfunction in schizophrenia and aberrant hippocampal synaptic plasticity in rodent model psychosis: a selective review. Pharmacopsychiatry. https://doi.org/10.1055/a-0960-9846
42. *Hernández-Frausto M., López-Rubalcava C., Galván E.J.* Progressive Alterations in Synaptic Transmission and Plasticity of Area CA1 Precede the Cognitive Impairment Associated with Neonatal Administration of MK-801. Neuroscience. 404: 205–217. 2019.
43. *Faatehi M., Basiri M., Nezhadi A., Shabani M., Masoumi-Ardakani Y., Soltani Z., Nozari M.* Early enriched environment prevents cognitive impairment in an animal model of schizophrenia induced by MK-801: Role of hippocampal BDNF. Brain. Res. 1711: 115–119. 2019.
44. *Kozela E., Krawczyk M., Kos T., Juknat A., Vogel Z., Popik P.* Cannabidiol improves cognitive impairment and reverses cortical transcriptional changes induced by ketamine, in schizophrenia-like model in rats. Mol. Neurobiol. 57(3): 1733–1747. 2020.
45. *Wang L., Alachkar A., Sanathara N., Belluzzi J.D., Wang Z., Civelli O.* A methionine-induced animal model of schizophrenia: face and predictive validity. Int. J. Neuropsychopharmacol. 18(12): pyv054. 2015.
46. *Tremolizzo L., Carboni G., Ruzicka W.B., Mitchell C.P., Sugaya I., Tueting P., Sharma R., Grayson D.R., Costa E., Guidotti A.* An epigenetic mouse model for molecular and behavioral neuropathologies related to schizophrenia vulnerability. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99: 17095–17100. 2002.
47. *Cattabeni F., DiLuca M.* Developmental models of brain dysfunctions induced by targeted cellular ablations with methylazoxymethanol. Physiol. Rev. 77: 199–215. 1997.
48. *Matricon J., Bellon A., Frieling H., Kebir O., Le Pen G., Beuvon F., Daumas-Duport C., Jay T.M., Krebs M.-O.* Neuropathological and reelin deficiencies in the hippocampal formation of rats exposed to MAM; differences and similarities with schizophrenia. PLoS ONE. 5: e10291. 2010.
49. *Moore H., Jentsch J.D., Ghajarnia M., Geyer M.A., Grace A.A.* A neurobehavioral systems analysis of adult rats exposed to methylazoxymethanol acetate on E17: implications for the neuropathology of schizophrenia. Biol. Psychiatry. 60: 253–264. 2006.
50. *Hazane F., Krebs M.O., Jay T.M., Le Pen G.* Behavioral perturbations after prenatal neurogenesis disturbance in female rat. Neurotox. Res. 15(4): 311–320. 2009.
51. *Potasiewicz A., Holuj M., Litwa E., Gzielo K., Socha L., Popik P., Nikiforuk A.* Social dysfunction in the neurodevelopmental model of schizophrenia in male and female rats: Behavioural and biochemical studies. Neuropharmacology. 170: 108040. 2020.
52. *Zuckerman L., Rehavi M., Nachman R., Weiner I.* Immune activation during pregnancy in rats leads to a postpubertal emergence of disrupted latent inhibition, dopaminergic hyperfunction, and altered limbic morphology in the offspring: a novel neurodevelopmental model of schizophrenia. Neuropsychopharmacology. 28(10): 1778–1789. 2003.
53. *Zuckerman L., Weiner I.* Maternal immune activation leads to behavioral and pharmacological changes in the adult offspring. J. Psychiatr. Res. 39(3): 311–323. 2005.
54. *Howland J.G., Cazakoff B.N., Zhang Y.* Altered object-in-place recognition memory, prepulse inhibition, and locomotor activity in the offspring of rats exposed to a viral mimetic during pregnancy. Neuroscience. 201: 184–198. 2012.

55. *Machado C.J., Whitaker A.M., Smith S.E., Patterson P.H., Bauman M.D.* Maternal immune activation in nonhuman primates alters social attention in juvenile offspring. Biol. Psychiatry. 77(9): 823–832. 2015.
56. *Meyer U.* Prenatal poly (I: C) exposure and other developmental immune activation models in rodent systems. Biol. Psychiatry. 75: 307–315. 2014.
57. *Zhang Y., Cazakoff B.N., Thai C.A., Howland J.G.* Prenatal exposure to a viral mimetic alters behavioural flexibility in male, but not female, rats. Neuropharmacology. 62(3): 1299–1307. 2012.
58. *Careaga M., Murai T., Bauman M.D.* Maternal immune activation and autism spectrum disorder: from rodents to nonhuman and human primates. Biol. Psychiatry. 81(5): 391–401. 2017.
59. *Giovanoli S., Weber L., Meyer U.* Single and combined effects of prenatal immune activation and peripubertal stress on parvalbumin and reelin expression in the hippocampal formation. Brain. Behav. Immun. 40: 48–54. 2014.
60. *Paylor J.W., Lins B.R., Greba Q., Moen N., de Moraes R.S., Howland J.G., Winship I.R.* Developmental disruption of perineuronal nets in the medial prefrontal cortex after maternal immune activation. Sci. Rep. 6: 375–380. 2016.
61. *Steullet P., Cabungcal J.H., Coyle J., Didriksen M., Gill K., Grace A.A., Hensch T.K., LaMantia A.S., Lindemann L., Maynard T.M., Meyer U., Morishita H., O'Donnell P., Puhl M., Cuenod M., Do K.Q.* Oxidative stress-driven parvalbumin interneuron impairment as a common mechanism in models of schizophrenia. Mol. Psychiatry. 22(7): 936–943. 2017.
62. *Shin Yim Y., Park A., Berrios J., Lafourcade M., Pascual L.M., Soares N., Yeon Kim J., Kim S., Kim H., Waisman A., Littman D.R., Wickersham I.R., Harnett M.T., Huh J.R., Choi G.B.* Reversing behavioural abnormalities in mice exposed to maternal inflammation. Nature. 549(7673): 482–487. 2017.
63. *Fone K.C., Porkess M.V.* Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. Neurosci. Biobehav. Rev. 32(6): 1087–1102. 2008.
64. *Marsden C.A., King M.V., Fone K.C.* Influence of social isolation in the rat on serotonergic function and memory–relevance to models of schizophrenia and the role of 5-HT_6 receptors. Neuropharmacology. 61(3): 400–407. 2011.
65. *Schubert M.I., Porkess M.V., Dashdorj N., Fone K.C., Auer D.P.* Effects of social isolation rearing on the limbic brain: a combined behavioral and magnetic resonance imaging volumetry study in rats. Neuroscience. 159(1): 21–30. 2009.
66. *Silva-Gómez A.B., Rojas D., Juárez I., Flores G.* Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical and hippocampal pyramidal neurons in postweaning social isolation rats. Brain Res. 983(1–2): 128–136. 2003.
67. *Bloomfield C., French S.J., Jones D.N., Reavill C., Southam E., Cilia J., Totterdell S.* Chandelier cartridges in the prefrontal cortex are reduced in isolation reared rats. Synapse. 62(8): 628–631. 2008.
68. *Toua C., Brand L., Möller M., Emsley R.A., Harvey B.H.* The effects of sub-chronic clozapine and haloperidol administration on isolation rearing induced changes in frontal cortical N-methyl-D-aspartate and D1 receptor binding in rats. Neuroscience. 165(2): 492–499. 2010.
69. *Quan M.N., Tian Y.T., Xu K.H., Zhang T., Yang Z.* Post weaning social isolation influences spatial cognition, prefrontal cortical synaptic plasticity and hippocampal potassium ion channels in Wistar rats. Neuroscience. 169(1): 214–222. 2010.
70. *Weiss I.C., Feldon J., Domeney A.M.* Isolation rearing-induced disruption of prepulse inhibition: further evidence for fragility of the response. Behav. Pharmacol. 10(2): 139–149. 1999.
71. *Li N., Wu X., Li L.* Chronic administration of clozapine alleviates reversal-learning impairment in isolation-reared rats. Behav. Pharmacol. 18(2): 135–145. 2007.
72. *Fone K.C.F., Watson D.J.G., Billiras R.I., Sicard D.I., Dekeyne A., Rivet J.M., Gobert A., Millan M.J.* Comparative pro-cognitive and neurochemical profiles of glycine modulatory site agonists and glycine reuptake inhibitors in the rat: potential relevance to cognitive dysfunction and its management. Mol. Neurobiol.
https://doi.org/10.1007/s12035-020-01875-9
73. *Tseng K.Y., Chambers R.A., Lipska B.K.* The neonatal ventral hippocampal lesion as a heuristic neurodevelopmental model of schizophrenia. Behav. Brain Res. 204: 295–305. 2009.
74. *Lipska B.K.* Using animal models to test a neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. Rev. Psychiatry. Neurosci. 29: 282–286. 2004.
75. *Brady A.M., Saul R.D., Wiest M.K.* Selective deficits in spatial working memory in the neonatal ventral hippocampal lesion rat model of schizophrenia. Neuropharmacology. 59: 605–611. 2010.
76. *Marquis J.P., Goulet S., Dore F.Y.* Neonatal ventral hippocampus lesions disrupt extra-dimensional shift and alter dendritic spine density in the medial prefrontal cortex of juvenile rats. Neurobiol. Learn. Mem. 90: 339–346. 2008.
77. *Tse M.T., Piantadosi P.T., Floresco S.B.* Prefrontal cortical gamma-aminobutyric acid transmission and cognitive function: drawing links to schizophrenia from preclinical research. Biol. Psychiatry. 77(11): 929–939. 2015.
78. *Farrell M.S., Werge T., Sklar P., Owen M.J., Ophoff R.A., O'Donovan M.C., Corvin A., Cichon S., Sullivan P.F.* Evaluating historical candidate genes for schizophrenia. Mol. Psychiatry. 20(5): 555–562. 2015.

79. *Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium*. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. Nature. 511(7510): 421–427. 2014.
80. *Jaaro-Peled H*. Gene models of schizophrenia: DISC1 mouse models. Prog. Brain Res. 179: 75–86. 2009.
81. *Krueger D., Howell J., Hebert B., Olausson P., Taylor J., Nairn A*. Assessment of cognitive function in the heterozygous reeler mouse. Psychopharmacology. (Berl.). 189: 95–104. 2006.
82. *Grimm C.M., Aksamaz S., Schulz S., Teutsch J., Sicinski P., Liss B., Kätzel D*. Schizophrenia-related cognitive dysfunction in the Cyclin-D2 knockout mouse model of ventral hippocampal hyperactivity. Transl. Psychiatry. 8(1): 212. 2018.
83. *Mukherjee A., Carvalho F., Eliez S., Caroni P.* Long-lasting rescue of network and cognitive dysfunction in a genetic schizophrenia model. Cell. 178(6): 1387–1402.e14. 2019.
84. *Glenthøj L.B., Hjorthøj C., Kristensen T.D., Davidson C.A., Nordentoft M*. The effect of cognitive remediation in individuals at ultra-high risk for psychosis: a systematic review. NPJ Schizophr. 3: 1–7. 2017.

Animal Models of Cognitive Impairment in Schizophrenia

M. V. Dorofeikova[a, *], E. O. Kutcher[a, b], N. N. Petrova[b], and A. Yu. Egorov[a, b, c]

[a] *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Saint Petersburg, Russia*

[b] *Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia*

[c] *Mechnikov Northwestern State Medical University, Saint Petersburg, Russia*

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

Cognitive impairment in schizophrenia is currently seen as the third core group of symptoms along with negative and positive symptoms. Cognitive impairment is found in the vast majority of patients and determines the functional outcome of the disease. The article offers a review of literature on animal models of cognitive impairment in schizophrenia. Pharmacological, developmental, genetic models, their mechanisms and typical manifestations, as well as methods for assessing cognitive functions in rodents are covered. At present, there are many animal models of schizophrenia-related individual cognitive dysfunctions which are necessary for the further development of psychopharmacology and the study of pathophysiological mechanisms, but so far none of them can reproduce the entire complex and heterogeneous structure of the cognitive deficits of patients. Ontogenetic models that can be used to study risk factors for schizophrenia and early interventions in high-risk states for psychosis seem particularly interesting.

Keywords: animal modeling, schizophrenia, cognitive functioning, cognitive impairment, preclinical research

ЦИТИРОВАТЬ:

Дорофейкова М.В., Кучер Е.О., Петрова Н.Н., Егоров А.Ю. Экспериментальные модели когнитивных нарушений при шизофрении. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(11): 1325–1339.

DOI:10.31857/S0869813920110059

TO CITE THIS ARTICLE:

Dorofeikova M.V., Kutcher E.O., Petrova N.N., Egorov A.Yu. Animal Models of Cognitive Impairment in Schizophrenia. Russian Journal of Physiology. 106(11): 1325–1339.

DOI:10.31857/S0869813920110059

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 11, с. 1340–1349

ОБЗОРЫ

ПРЕЭКЛАМПСИЯ, ФИБРОЗ И МАРИНОБУФАГЕНИН

© 2020 г. Н. И. Агалакова[1], В. А. Резник[2], Н. И. Колодкин[3], Н. И. Тапильская[4], А. Я. Багров[1, *]

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

[2]Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

[3]Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург, Россия

[4]НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

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

Поступила в редакцию 19.04.2020 г.
После доработки 12.07.2020 г.
Принята к публикации 05.09.2020 г.

Преэклампсия – это возникающее во время беременности и затрагивающее несколько систем органов потенциально опасное для жизни заболевание, которое характеризуется повышенным артериальным давлением матери и появлением белка в моче. Частота преэклампсии (3–7%) не снижается, и это заболевание попрежнему занимает ведущее положение среди осложнений беременности. В этой статье мы представляем “фиброзную концепцию” патогенеза преэклампсии, которая включает в себя систему “Na/K-АТФаза-эндогенные ингибиторы” и, в том числе, маринобуфагенин-зависимое угнетение фактора транскрипции Fli1. Новый подход к лечению преэклампсии включает в себя иммунонейтрализацию эндогенного маринобуфагенина.

Ключевые слова: преэклампсия, Na/K-АТФаза, маринобуфагенин, Fli1, коллаген-1, фиброз сосудов

DOI: 10.31857/S0869813920110023

Нарушение способности почек выводить ионы натрия является одной из причин развития солечувствительной артериальной гипертензии [1]. Повышение артериального давления в ответ на увеличение потребления хлорида натрия может опосредоваться различными регуляторными системами, в частности, за счет угнетения Na/K-АТФазы в гладкомышечных клетках сосудов эндогенным ингибитором дигиталис-подобной природы [2]. deWardener и соавт., основываясь на многочисленных экспериментальных данных, пришли к заключению, что этим гуморальным медиатором солечувствительной гипертонии является эндогенное вещество с натрийуретической и вазопрессорной активностью [3]. Кардиотонические стероиды (КС), способные подавлять активность Na/K-АТФазы, являются эндогенными физиологическими регуляторами натрийуреза, играющими основную роль в регуляции натриевого насоса в проксимальных почечных канальцах и восходящем сегменте петли Генле [4]. Действительно, у больных и у эксперимен-

Bufo marinus

Marinobufagenin

3.5-dihydroxy-14,
15-epoxy-bufadienolide

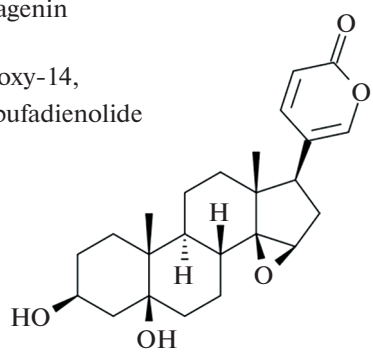


Рис. 1. Структура маринобуфагенина.
Fig. 1. Structure of marinobufagenin.

тальных животных с различными формами артериальной гипертензии концентрация КС в плазме крови коррелирует с показателями артериального давления [3, 5].

Одними из претендентов на роль натрийуретического гормона среди КС являются буфадиенолиды. КС буфадиенолидной природы отличаются от карденолидов, к которым относится оуабаин, наличием дважды ненасыщенного шестичленного лактонного кольца (рис. 1). На протяжении нескольких десятилетий было известно, что некоторые представители класса земноводных, в частности, жабы *Bufo marinus* могут производить стероиды группы буфадиенолидов [5]. Эндогенный уровень буфадиенолидов у жаб возрастает при миграции из засушливых мест обитания в районы с повышенной влажностью [6]. Принимая во внимание тот факт, что кожа земноводных является важнейшим органом, участвующим в регуляции водно-солевого баланса, было выдвинуто предположение о том, что “натриевый насос” и буфадиенолиды являются регуляторным механизмом транспорта натрия через кожу [7]. Было показано, что уровень буфадиенолидов в мозге и коже жаб *Bufo marinus* увеличивается при увеличении содержания натрия в окружающей среде [7] и что у земноводных буфадиенолиды представляют собой натрий-экскреторный гормон – эндогенный дигиталисподобный ингибитор Na/K-АТФазы [6]. Было предположено существование эндогенных буфадиенолидов у млекопитающих. Первыми продемонстрировали присутствие буфалин-иммуннореактивных веществ у человека Kieval и соавт. [8] и Goto и соавт. [9]. Вскоре из мочи больных инфарктом миокарда был выделен гормон, по своим масс-спектральным характеристикам неотличимый от маринобуфагенина (МБГ) амфибий [10], а моноклональные антитела к МБГ взаимодействовали с эндогенным ингибитором Na/K-АТФазы *in vitro* и *in vivo* [11]. Несколько позже было показано, что МБГ синтезируется клетками коры надпочечников и плаценты путем трансформации желчных кислот цитохромом P450, CYP27A1 [12]. МБГ селективно взаимодействует с α-1 изоформой Na/K-АТФазы, основной изоформой фермента в почках и сосудах, вследствие чего этот стероид является вазоконстриктором и обладает натрийуретической активностью [13, 14]. Содержание МБГ в плазме крови возрастает при задержке натрия и увеличении объема циркулирующей крови, например, у больных артериальной гипертензией и хронической почечной недостаточностью, а также при застойной сердечной недостаточности [15–17].

КАРДИОТОНИЧЕСКИЕ СТЕРОИДЫ, БЕРЕМЕННОСТЬ И ПРЕЭКЛАМПСИЯ

Артериальная гипертензия является одним из наиболее распространенных осложнений (примерно 6–8%) беременности [18]. Диагноз преэклампсии (ПЭ) ставят по сочетанию артериальной гипертензии [19] (артериальное давление ≥140/90 мм рт. ст., выявленное в двух измерениях, проведенных с интервалом ≥6 ч [18]), протеинурии (наличие белка в моче ≥0.3 г/л в суточной пробе или в двух пробах, взятых с интервалом 6 ч), и генерализованных отеков [20]. Патофизиологические механизмы ПЭ многочисленны и включают в себя окислительный стресс, образование КС в плаценте и инсулинорезистентность [21, 22]. Во время ПЭ спиральные артерии плаценты теряют свои эластические свойства, что в конечном итоге приводит к снижению перфузии плаценты [23].

Поскольку нормально протекающая беременность сопровождается задержкой жидкости и позитивным балансом натрия в организме [24, 25], интерес к КС при беременности возник вскоре после их открытия. Graves и соавт. показали, что уровень дигоксиноподобной иммунореактивности умеренно повышается при здоровой беременности и существенно увеличивается при гестационной гипертензии [26, 27]. На основании этих наблюдений авторами было высказано предположение о том, что избыточный синтез КС может являться одним из факторов патогенеза ПЭ [26, 27]. В течение нескольких последующих лет данные Graves и соавт. нашли свое подтверждение в работах других клиницистов [28, 29].

Убедительные данные, свидетельствующие о вкладе КС в патогенез ПЭ, были получены в экспериментальных и клинических исследованиях, проведенных с использованием препарата Digibind, который представляет собой лиофилизированные Fab фрагменты аффинно-очищенных овечьих анти-дигоксиновых антител [31, 32]. Digibind обладает перекрестной иммунореактивностью с несколькими КС [33], и его введение вызывает снижение артериального давления у крыс с объем-зависимой гипертензией и повышением концентрации КС в плазме крови [34]. При беременности местом синтеза КС является плацента [35]. Di Grande и соавт. показали, что Digibind в концентрации 130 мкг/мл вызывает достоверное снижение тонуса сосудов в перфузируемых плацентах, полученных от беременных женщин с ПЭ [36]. Armler и соавт. обнаружили, что развитие ПЭ сопровождается существенным увеличением чувствительности плацентарной Na/K-АТФазы к препаратам дигиталиса [37]. Примечательно, что именно в плацентарных клетках JEG-3 МБГ синтезируется с помощью фермента CYP27A1 из желчных кислот [12].

Данные клинических исследований свидетельствуют в пользу того, что одним из механизмов патогенеза ПЭ является избыточная продукция МБГ [38]. Так, Lopatin и соавт. показали, что у беременных пациенток с тяжелой ПЭ (артериальное давление 161 ± 5/104 ± 3 мм рт. ст.) концентрация МБГ в плазме крови была повышена в 5 раз по сравнению с таковой у женщин с неосложненной беременностью [39]. Позже было показано, что развитие ПЭ средней тяжести (артериальное давление 149 ± 3/93 ± 3 мм рт. ст.) сопровождалось двукратным увеличением уровня МБГ в плазме крови [40]. Повышение концентрации МБГ при ПЭ средней тяжести сопровождалось 50%-ным угнетением активности Na/K-АТФазы в эритроцитах, а антитела к МБГ в отличие от антител к оуабаину восстанавливали активность фермента *ex vivo* [40]. Эти наблюдения свидетельствуют о том, что МБГ может являться фактором, ответственным за подавление активности Na/K-АТФазы при ПЭ, а также маркером тяжести этого синдрома. В экспериментах *in vitro* МБГ в патофизиологически значимом диапазоне концентраций (1–3 нмоль/л) вызывал 25%-ное ингибирование Na/K-АТФазы и запускал сокращения изолированных колец брыжеечных артерий человека [39]. Таким образом, уровни МБГ *in vivo*, наблюдаемые у

пациентов с ПЭ, способны повышать сосудистый тонус и существенно ингибировать Na/K-АТФазу [39].

ПРЕЭКЛАМПСИЯ И ФИБРОЗ

В 1935–1936 гг. было предположено, что фиброз является результатом снижения кровотока ворсин плода; такое снижение может быть связано с изменениями в стволовых артериях плода или с сужением артериол ворсин [41]. В более поздних работах было показано, что женщины, которые перенесли ПЭ, чаще страдают гипертонией, ишемической болезнью сердца и инсультами в дальнейшей жизни [41, 42]. Таким образом, ПЭ является не только осложнением беременности, но может свидетельствовать о предрасположенности к развитию сердечно-сосудистых заболеваний на протяжении всей жизни [43]. Эти явления, влияющие друг на друга, связаны с ремоделированием миокарда и сосудов, приводящим наряду с другими процессами к отложению коллагена и потере способности сосудов к расслаблению [43, 44].

Недавно было показано, что наномолярные концентрации МБГ стимулируют синтез коллагена и индуцируют фиброз в тканях сердечно-сосудистой системы и в почках [45]. Одним из механизмов, лежащих в основе профибротического эффекта МБГ, является изменение активности Fli1, ядерного фактора транскрипции и негативного регулятора синтеза коллагена-1 (рис. 2) [45, 46]. EGFR-Src-зависимое и обусловленное PKC-δ фосфорилированием снижение концентрации Fli1 приводит к стимуляции синтеза проколлагена и коллагена-1 в тканях [45]. В ходе экспериментов было показано, что КС повышают синтез коллагена в культуре фибробластов вследствие активации сигнальной функции комплекса МБГ-Na/K-АТФаза, отличной от классической насосной функции натриевого насоса [45, 47]. Введение МБГ *in vivo* крысам в концентрации, наблюдаемой в плазме крови при почечной недостаточности, вызывало развитие фиброза миокарда [45]. Развитие фиброза сопровождалось активацией сигнального пути, опосредованного Na/K-АТФазой, что подтверждалось увеличением Src и фосфорилированием митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK) в миокарде [45].

Недавние исследования показали, что Na/K-АТФаза может генерировать внутриклеточную сигнализацию, которая приводит к потере эластичности и фиброзу сосудов [45, 48,]. Низкие концентрации КС, действуя на одну из изоформ PKC – PKCδ, индуцируют ингибирование Fli1 и вызывают увеличение экспрессии коллагена-1, который является ключевым фактором фиброза в кровеносных сосудах, миокарде и почках [45, 49]. Схема развития МБГ-индуцированного фиброза представлена на рис. 2. Необходимо помнить, что помимо описанного механизма профиброзного действия МБГ также способен стимулировать синтез коллагена путем активации факторов TGFβ – SMAD2/3 [50] Кроме того, предполагается, что кровеносные сосуды, подвергшиеся негативному воздействию факторов ПЭ, впоследствии проявляют большую чувствительность к повреждениям, несмотря на исчезновение симптомов ПЭ после родоразрешения [51].

ЛЕЧЕНИЕ ПРЕЭКЛАМПСИИ АНТИТЕЛАМИ К КАРДИОТОНИЧЕСКИМ СТЕРОИДАМ

Идея иммунонейтрализации КС у больных с ПЭ не нова. Сходство структуры карденолидов (дигоксин, оубаин) и буфадиенолидов позволило клинически использовать поликлональные антитела против дигоксина (Digibind) при лечении ПЭ [52, 53]. Digibind и Digifab уже много лет используются для лечения интоксикации дигоксином [54]. В течение последних 20 лет дигоксин-специфичные Fab-фрагменты (Digibind) успешно применялись при отравлении буфадиенолидами

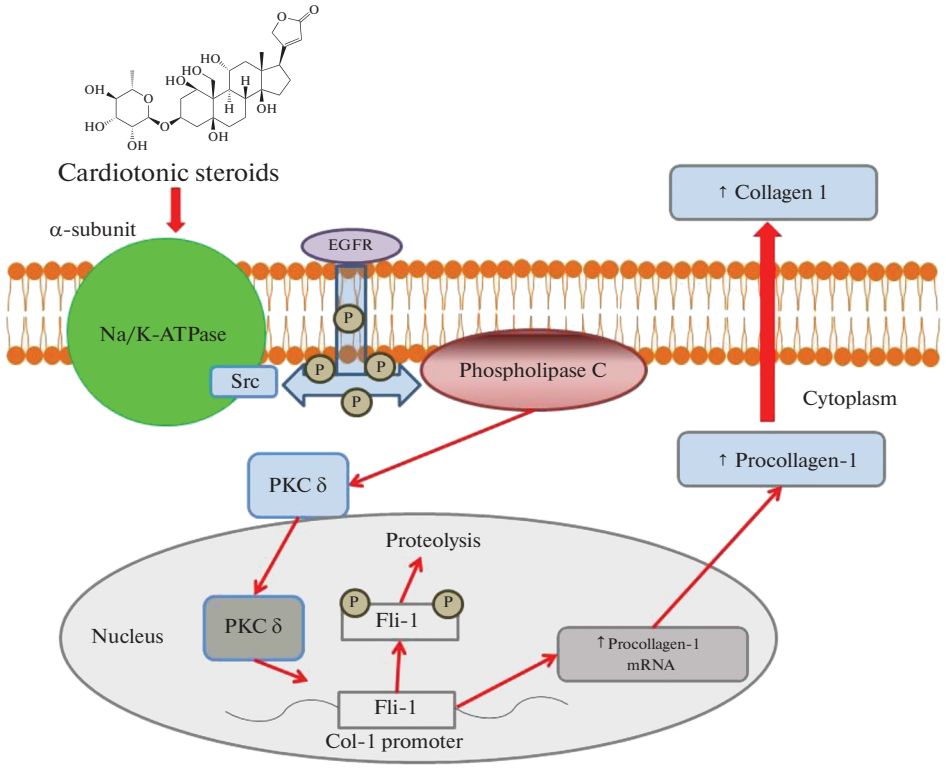


Рис. 2. Схема Fli1-зависимой сигнализации.

MBG–PKCδ – Fli1-проколлаген-коллаген-1 основной путь стимуляции фиброгенеза при ПЭ в отличие от TGFβ–SMAD2/3 пути, который играет роль при гипертензии и сахарном диабете.

Fig. 2. Scheme of Fli1-dependent signaling.

MBG, acting via stimulation of PKCδ and phosphorylation of Fli1, causes liberation of procollagen from promoter and formation of collagen-1. Unlike MBG signaling in hypertension and diabetes TGFβ-SMAD2/3 is not involved.

жаб и показали свою эффективность у лабораторных животных [55] и человека [56]. Было показано, что Digibind вызывает снижение артериального давления у животных с гипертензией и повышенным уровнем эндогенного дигоксиноподобного фактора [57]. Digibind демонстрирует перекрестную реактивность с буфадиенолидами и карденолидами [58]. В модели ПЭ у крыс лечение Digibind приводило к снижению артериального давления и протеинурии [59]. В клиническом исследовании было показано, что терапия антителами Digibind предотвращает снижение функции почек при тяжелой ПЭ путем нейтрализации КС [52]. В 1988 г. Goodlin сообщил о стойком снижении артериального давления у беременной с ПЭ, развившейся на 26-й неделе беременности, после двукратного внутривенного введения Digibind в дозе 0.087 мг/кг [30]. Adair и соавт. в 1996 г. добились снижения артериального давления у пациентки с ПЭ на фоне комбинации однократного внутривенного введения 5 мг Digibind и 24-часовой инфузии препарата (1 мг в час) [60]. Несколько позже эффективность Digibind была подтверждена в двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании на 13 больных с ПЭ, развившейся *post partum* [61]. Примечательно, что в вышеперечисленных исследованиях Digibind не вызывал у пациентов никаких побочных эффектов. В 2007 г. было завершено многоцентровое

двойное слепое плацебо-контролируемое исследование эффективности Digibind у больных с тяжелой ПЭ, которое показало, что Digibind приводит к существенному повышению клиренса креатинина и снижению риска отека легких по сравнению с нелеченными больными [62]. Однако в 2011 г. производство Digibind было прекращено, и единственным препаратом антител к дигоксину, зарегистрированным Администрацией по контролю качества лекарственных препаратов и продуктов питания США (Food and Drug Administration), является Digifab (BTG International Ltd., Великобритания). Сравнительное исследование Digifab и Digibind показало, что они имеют сравнимую кросс-реактивность с КС, а у пациенток с ПЭ увеличение содержания иммунореактивности к МБГ было идентичным как для Digifab, так и для Digibind, и оба препарата антител восстанавливали активность Na/K-АТФазы [63].

Недавно было показано, что ткани пупочных артерий, полученных от беременных женщин, страдающих ПЭ, содержали большее количество коллагена, экспрессировали меньше Fli1 и обладали более низкой чувствительностью к релаксирующему действию нитропруссида натрия [64, 65]. Ранее было показано, что уровень МБГ повышается в плазме пациенток с ПЭ, параллельно развивалось угнетение Na/K-АТФазы в эритроцитах [11, 58]. Антитела к МБГ *ex vivo* полностью устраняли ингибирование Na/K-АТФазы [11, 58]. У беременных крыс с экспериментальной ПЭ, индуцированной потреблением воды с избыточным содержанием NaCl, увеличение содержания МБГ сопровождалось развитием типичных симптомов ПЭ, включая повышение артериального давления, протеинурию, уменьшение массы и размера плодов [11]. На этой модели иммунонейтрализация МБГ *in vivo* с помощью поли- и моноклональных антител оказывала антигипертензивный эффект, связанный с восстановлением активности Na/K-АТФазы в сосудах [11]. В недавнем исследовании было показано, что как в плаценте, так и в пупочных артериях пациенток с ПЭ уровень Fli-1 в плаценте был значительно ниже, а содержание коллагена-1 повышалось по сравнению с таковыми в тканях, полученных от женщин с неосложненной беременностью [66, 67]. Последующая инкубация эксплантов таких пупочных артерий с антителами против МБГ приводила к значительному снижению содержания коллагена-1 [67]. Когда здоровые человеческие артерии пуповины были в течение 24 ч инкубированы в присутствии низких концентраций МБГ, экспрессия Fli1 снижалась, уровень PKC-δ нарастал, а содержание проколлагена-1 увеличивалось в шесть раз [64, 67]. В недавнем исследовании было показано, что введение гуманизированных моноклональных антител к МБГ активирует фосфорилирование белка p38 в клетках цитотрофобласта, что указывает на возможное терапевтическое действие этих антител [68]. Таким образом, при ПЭ повышенный уровень МБГ через Fli1-зависимый механизм стимулирует синтез коллагена в артериях пуповины, что приводит к нарушению вазорелаксации и является причиной сосудистой жесткости при этом синдроме.

Иммунонейтрализация МБГ может стать новым и эффективным направлением в лечении ПЭ и дальнейшей профилактике ее осложнений. В то же время остается открытым вопрос, почему лечение ПЭ нейтрализующими КС антителами не является широко распространенным методом и до настоящего времени ни Digibind, ни Digifab не включены в перечень средств, показанных к применению при ПЭ. Дело в том, что оба препарата представляют собой Fab фрагменты аффинно-очищенных антител к дигоксину, и они никогда не проходили серьезную оценку как антитела, обладающие способностью к связыванию буфадиенолидов. Например, аффинность антител Digibind к дигоксину варьировала в пределах 0.1–50 нмоль/л [69–72], что, на наш взгляд, отражало их поликлональную природу. МБГ является веществом, выделенным из тканей млекопитающих [38], его биосинтетический путь достаточно подробно охарактеризован [12], и к нему были произведены специфические моноклональные антитела 4G4 и 3E9 [11]. Наборы, основанные на поликлональных ан-

тителах к МБГ, измеряли уровень этого стероида в норме у крыс и человека в очень широком диапазоне концентраций – 0.5–100 нмоль/л – в 200 раз [10, 15, 69, 70], в то время как моноклональные антитела 4G4 – в диапазоне 0.2–0.4 нмоль/л, то есть в допустимых пределах [11]. Таким образом, есть все основания полагать, что иммунонейтрализация МБГ моноклональными антителами станет общепринятым подходом к терапии ПЭ, а Fli1-зависимый механизм синтеза коллагена в артериях пуповины является механизмом патогенеза ПЭ.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа была поддержана грантом РНФ № 18-15-00222 “Проведение фундаментальных научных исследований и поисковых научных исследований отдельными научными группами”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Blaustein M.P.* Sodium ions, calcium ions, blood pressure regulation and hypertension: a reassessment and a hypothesis. Am. J. Physiol. 232: C167–C173. 1977.
2. *Buckalew V.M. Jr., Nelson D.B.* Natriuretic and sodium transport inhibitory activity in plasma of volume-expanded dogs. Kidney Int. 5: 12–22. 1974.
3. *De Wardener H.E., Clarkson E.N.* A concept of natriuretic hormone. Physiol. Rev. 65: 658–759. 1985.
4. *Bailly C.* Effect of luminal atrial natriuretic peptide on chloride reabsorption in mouse cortical thick ascending limb: inhibition by endothelin. J. Am. Soc. Nephrol. 11: 1791–1797. 2000.
5. *Bagrov A.Y., Shapiro J.I.* Endogenous digitalis: pathophysiologic roles and therapeutic applications. Nature Clin. Pract. Nephrol. 4: 378–392. 2008.
6. *Flier J., Edwards M.W., Daly J.W., Myers C.W.* Widespread occurrence in frogs and toads of skin compounds interacting with the ouabain site of Na+,K+-ATPase. Science. 208(4443): 503-505. 1980.
7. *Morris J.F., Ismail-Beigi F., Butler V.P. Jr., Gati I., Lichtstein D.* Ouabain-sensitive Na+,K(+)-ATPase activity in toad brain. Comp. Biochem. Physiol. A Physiol. 18: 599–606. 1997.
8. *Kieval R.S., Butler V.P. Jr., Derguini F., Bruening R.C., Rosen M.R.* Cellular electrophysiologic effects of vertebrate digitalis-like substances. J. Am. Coll. Cardiol. 11: 637–643. 1988.
9. *Goto A., Yamada K., Ishii M., Sugimoto T., Yoshioka M.* Immunoreactivity of endogenous digitalis-like factors. Biochem. Pharmacol. 41: 1261–1263. 1991.
10. *Bagrov A.Y., Fedorova O.V., Dmitrieva R.I., Howald W.N., Hunter A.P., Kuznetsova E.A., Shpen V.M.* Bufodienolide nature of endogenous inhibitor of Na/K ATPase in the urine from patients with acute myocardial infarction. Hypertension. 31: 1097–1103. 1998.
11. *Fedorova O.V., Simbirtsev A.S., Kolodkin N.I., Kotov A.Y., Agalakova N.I., Kashkin V.A., Tapilskaya N.I., Bzhelyansky A., Reznik V.A., Frolova E.V., Nikitina E.R., Budny G.V, Longo D.L., Lakatta E.G., Bagrov A.Y.* Monoclonal antibody to an endogenous bufadienolide, marinobufagenin, reverses preeclampsia-induced Na/K-ATPase inhibition and lowers blood pressure in NaCl-sensitive hypertension. J. Hypertens. 26: 2414–2425. 2008.
12. *Fedorova O.V., Zernetkina V.I., Shilova V.Y., Grigorova Y.N., Juhasz O., Wei W., Marshall C.A., Lakatta E.G., Bagrov A.Y.* Synthesis of an endogenous steroidal Na pump inhibitor marinobufagenin, implicated in human cardiovascular diseases, is initiated by CYP27A1 via bile acid pathway. Circulation: Cardiovasc. Genetics. 8: 736–745. 2015.
13. *Fedorova O.V., Bagrov A.Y.* Inhibition of Na/K ATPase from rat aorta by two endogenous Na/K pump inhibitors, ouabain and marinobufagenin. Evidence of interaction with different alpha-subinit isoforms. Am. J. Hypertens. 10: 929–935. 1997.
14. *Bagrov A.Y., Fedorova O.V.* Effects of two putative endogenous digitalis-like factors, marinobufagenin and ouabain, on the Na/K pump in human mesenteric arteries. J. Hypertens. 16: 1953–1958. 1998.
15. *Fridman A.I., Matveev S.A., Agalakova N.I., Fedorova O.V., Lakatta E.G., Bagrov A.Y.* Marinobufagenin, an endogenous ligand of alfa-1 Na/K-ATPase, is a marker of congestive heart failure severity. J. Hypertens. 20: 1189–1194. 2002.
16. *Kolmakova E.V., Haller S.T., Kennedy D.J., Isachkina A.N., Budny G.V., Frolova E.V., Nikitina E.R., Piecha G., Malhotra D., Fedorova O.V., Shapiro J.I., Bagrov A.Y.* Endogenous cardiotonic steroids in chronic renal failure. Nephrol. Dial. Transplantat. 26: 2912-2919. 2011.
17. *Bagrov A.Y., Shapiro J.I., Fedorova O.V.* Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology and novel therapeutic targets. Pharmacol. Rev. 61: 9–38. 2009.
18. *MacKay A.P., Berg C.J., Atrash H.K.* Pregnancy-related mortality from preeclampsia and eclampsia. Obstet. Gynecol. 97: 533–538. 2001.

19. *Sibai B., Dekker G., Kupferminc M.* Pre-eclampsia. Lancet. 365: 785–799. 2005.
20. *Thangaratinam S., Coomarasamy A., O'Mahony F., Sharp S., Zamora J., Khan K.S., Ismail K.M.K.* Estimation of proteinuria as a predictor of complications of pre-eclampsia: a systematic review. BMC Med. 7: 10. 2009.
21. *Wagner S.J., Craici I.M., Grande J.P., Garovic V.D.* From placenta to podocyte: vascular and podocyte pathophysiology in preeclampsia. Clin. Nephrol. 78: 241–249. 2012.
22. *Herse F., LaMarca B.* Angiotensin II type 1 receptor autoantibody (AT1-AA)-mediated pregnancy hypertension. Am. J. Reprod. Immunol. 69: 413–418. 2013.
23. *Meekins J.W., Pijnenborg R., Hanssens M., McFadyen I.R., van Asshe A.* A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies. Br. J. Obstet. Gynaecol. 101: 669–674. 1994.
24. *Gallery E.D.M., Hunyor S.M., Gyory A.Z.* Plasma volume concentration: a significant factor in both pregnancy-associated hypertension (pre-eclampsia) and chronic hypertension in pregnancy. Q J Med. 192: 593–602. 1979.
25. *Masilamani S., Baylis C.* Pregnant rats are refractory to the natriuretic actions of ANP. Am. J. Physiol. 267: R1611–R1616. 1994.
26. *Graves S.W.* The possible role of digitalislike factors in pregnancy-induced hypertension. Hypertension. 10: 184–186. 1987.
27. *Graves S.W., Valdes R. Jr., Brown B.A., Knight A.B., Craig H.R.* Endogenous digoxin-immunoreactive substance in human pregnancies. J. Clin. Endocrinol. Metab. 58: 748–751. 1984.
28. *Poston L., Morris J.F., Wolfe C.D., Hilton P.J.* Serum digoxin-like substances in pregnancy-induced hypertension. Clin. Sci. (Lond). 77: 189–194. 1989.
29. *Gilson G.J., Graves S.W., Qualls C.R., Curet L.B.* Digoxin-like immunoreactive substance and sodium-potassium-adenosine triphosphatase inhibition in normal pregnancy: a longitudinal study. Obstet. Gynecol. 89: 743–746. 1997.
30. *Goodlin R.C.* Antidigoxin antibodies in eclampsia. New Engl. J. Med. 318: 518–519. 1988.
31. *Kaminski K., Rechberger T.* Concentration of digoxin-like immunoreactive substance in patients with preeclampsia and its relation to severity of pregnancy-induced hypertension. Am. J. Obstet. Gynecol. 165: 733–736, 1991.
32. *Ujhelyi M.R., Robert S., Cummings D.M., Colucci R.D., Green P.J., Sailstad J., Vlasses P.H., Zarowitz B.J.* Influence of digoxin immune Fab therapy and renal dysfunction on the disposition of total and free digoxin. Ann. Intern. Med. 119: 273–277. 1993.
33. *Yamada K., Goto A., Hui C., Yagi N., Sugimoto T.* Effects of the Fab fragment of digoxin antibody on the natriuresis and increase in blood pressure induced by intracerebroventricular infusion of hypertonic saline solution in rats. Clin. Sci. (Lond). 82: 625–630. 1992.
34. *Krep H., Price D.A., Soszynski P., Tao Q.F., Graves S.W., Hollenberg N.K.* Volume sensitive hypertension and the digoxin-like factor. Reversal by a Fab directed against digoxin in DOCA-salt hypertensive rats. Am. J. Hypertens. 8: 921–927. 1995.
35. *Morris J.F., Poston L., Wolfe C.D., Hilton P.J.* A comparison of endogenous digoxin-like immunoreactivity and sodium transport inhibitory activity in umbilical arterial and venous serum. Clin. Sci. (Lond). 75: 577–579. 1988.
36. *Di Grande A., Boura A.L., Read M.A., Malatino L.S., Walters W.A.* Release of a substance from the human placenta having digoxin-like immunoreactivity. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 20: 603–607. 1993.
37. *Armler E., Cester N., Salvolini E., Staffolani R., Burkhard M., Mazzanti L., Kotyk A., Romanini C.* Human hypertensive placenta contains an increased amount of Na,K-ATPase with higher affinity for cardiac glycosides. Cell Biol. Int. 18: 723–727. 1994.
38. *Bagrov A.Y., Shapiro J.I., Fedorova O.V.* Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. Pharmacol. Rev. 61: 9–38. 2009.
39. *Lopatin D.A., Ailamazian E.K., Dmitrieva R.I., Shpen V.M., Fedorova O.V., Doris P.A., Bagrov A.Y.* Circulating bufodienolide and cardenolide sodium pump inhibitors in preeclampsia. J. Hypertens. 17: 1179–1187. 1999.
40. *Averina I.V., Tapilskaya N.I., Reznik V.A., Frolova E.V., Fedorova O.V., Lakatta E.G., Bagrov A.Y.* Endogenous Na/K-ATPase inhibitors in patients with preeclampsia. Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand) 52: 19–23. 2006.
41. *Fox H.* Fibrosis of placental villi. J. Pathol. Bacteriol. 95: 573–579. 1968.
42. *Hausvater A., Giannone T., Sandoval Y.H., Doonan R.J., Antonopoulos C.N., Matsoukis I.L., Petridou E.T., Daskalopoulou S.S.* The association between preeclampsia and arterial stiffness. J. Hypertens. 30: 17–33. 2012.
43. *Orabona R., Sciatti E., Vizzardi E., Bonadei I., Valcamonico A., Metra M., Frusca T.* Endothelial dysfunction and vascular stiffness in women with previous pregnancy complicated by early or late pre-eclampsia. Ultrasound Obstet. Gynecol. 49: 116–123. 2017.
44. *Trojanowska M.* Cellular and molecular aspects of vascular dysfunction in systemic sclerosis. Nat. Rev. Rheumatol. 6: 453–460. 2010.

45. *Elkareh J., Kennedy D.J., Yashaswi B., Vetteth S., Shidyak A., Kim E.G., Smaili S., Periyasamy S.M., Hariri I.M., Fedorova L., Liu J., Wu L., Kahaleh M.B., Xie Z., Malhotra D., Fedorova O.V., Kashkin V.A., Bagrov A.Y., Shapiro J.I.* Marinobufagenin stimulates fibroblast collagen production and causes fibrosis in experimental uremic cardiomyopathy. Hypertension. 49: 215–224. 2007.
46. *Elkareh J., Periyasamy S.M., Shidyak A., Vetteth S., Schroeder J., Raju V., Hariri I.M., El-Okdi N., Gupta S., Fedorova L., Liu J., Fedorova O.V., Kahaleh M.B., Xie Z., Malhotra D., Watson D.K, Bagrov A.Y., Shapiro J.I.* Marinobufagenin induces increases in procollagen expression in a process involving protein kinase C and Fli-1: implications for uremic cardiomyopathy. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 296: F1219–F1226. 2009.
47. *Nikitina E.R., Mikhailov A.V., Nikandrova E.S., Frolova E.V., Fadeev A.V., Shman V.V., Shilova V.Y., Tapilskaya N.I., Shapiro J.I, Fedorova O.V., Bagrov A.Y.* In preeclampsia endogenous cardiotonic steroids induce vascular fibrosis and impair relaxation of umbilical arteries. J. Hypertens. 29: 769–776. 2011.
48. *Orabona R., Sciatti E., Vizzardi E., Bonadei I., Prefumo F., Valcamonico A., Metra M., Frusca T.* Ultrasound evaluation of left ventricular and aortic fibrosis after pre-eclampsia. Ultrasound Obstet. Gynecol. 52: 648-653. 2018.
49. *Fedorova O.V., Emelianov I.V., Bagrov K.A., Grigorova Y.N., Wei W., Juhasz O., Frolova E.V., Marshall C.A., Lakatta E.G., Konradi A.O., Bagrov A.Y.* Marinobufagenin-induced vascular fibrosis is a likely target for mineralocorticoid antagonists. J. Hypertens. 33: 1602-1610. 2015.
50. *Zhang Y., Wei W., Shilova V., Petrashevskaya N.N., Zernetkina V.I., Grigorova Y.N., Marshall C.A., Fenner R.C., Lehrmann E., Wood W.H. 3rd, Becker K.G., Lakatta E.G., Bagrov A.Y., Fedorova O.V.* Monoclonal antibody to marinobufagenin downregulates TGFβ profibrotic signaling in left ventricle and kidney and reduces tissue remodeling in salt-sensitive hypertension. J. Am. Heart Assoc. 8: e012138. 2019.
51. *Pruthi D., Khankin E.V., Blanton R.M., Aronovitz M., Burke S.D., McCurley A., Karumanchi S.A., Jaffe I.Z.* Exposure to experimental preeclampsia in mice enhances the vascular response to future injury. Hypertension. 65: 863–870. 2015.
52. *Adair C.D., Buckalew V.M., Graves S.W., Lam G.K., Johnson D.D., Saade G., Lewis D.F., Robinson C., Danoff T.M., Chauhan N., Hopoate-Sitake M., Porter K.B., Humphrey R.G, Trofatter K.F., Amon E., Ward S., Kennedy L., Mason L., Johnston J.A.* Digoxin immune Fab treatment for severe preeclampsia. Am. J. Perinatol. 27: 655–662. 2010.
53. *Adair C.D., Buckalew V., Taylor K., Ernest J.M., Frye A.H., Evans C., Veille J.C.* Elevated endoxin-like factor complicating a multifetal second trimester pregnancy: treatment with digoxin-binding immunoglobulin. Am. J. Nephrol. 16: 529–531. 1996.
54. *Krep H., Price D.A., Soszynski P., Tao Q-F., Graves S.W., Hollenberg N.K.* Volume sensitive hypertension and the digoxin-like factor reversal by a fab directed against digoxin in DOCA-salt hypertensive rats. Am. J. Hypertens. 8: 921–927. 1995.
55. *Chen K.K., Kovarikova A.* Pharmacology and toxicology of toad venom. J. Pharm. Sci. 56: 1535–1541. 1967.
56. *Hitt M., Ettinger D.D.* Toad toxicity. New Eng. J. Med. 314: 1517–1518. 1986.
57. *Brubacher J.R., Lachmanen D., Ravikumar P.R., Hoffman R.S.* Efficacy of digoxin specific Fab fragments (Digibind) in the treatment of toad venom poisoning. Toxicology. 37: 931–942. 1999.
58. *Agunanne E., Horvat D., Uddin M.N., Puschett J.* The Treatment of Preeclampsia in a Rat Model Employing Digibind. Am. J. Perinatol. 27: 299–305. 2010.
59. *Ma J., Esplin M.S., Adair C.D., Mason L.A., Graves S.W.* Increasing evidence for and regulation of a human placental endogenous digitalis-like factor. Reprod. Sci. 19: 437–448. 2012.
60. *Adair D., Hinshaw A., Russell G., Rose J., Veille J., Buckalew V.* Effects of Fab digoxin-specific antibodies on mean arterial pressure in severe preeclampsia. Am. J. Hypertens. 10: 11A. 1997.
61. *Hopoate-Sitake M., Adair C.D., Buckalew V.M., Johnson D.D., Lewis D.F., Robinson C.J., Saade G.R., Graves S.W.* Digoxin antibody fragment, antigen binding (Fab), treatment of preeclampsia in women with endogenous digitalis-like factor: a secondary analysis of the DEEP Trial. Am. J. Obstet. Gynecol. 209: 119.e1-6. 2013.
62. *Ishkaraeva-Yakovleva V.V., Fedorova O.V., Solodovnikova N.G., Frolova E.V., Bzhelyansky A.M., Emelyanov I.V., Adair C.D., Zazerskaya I.E., Bagrov A.Y.* DigiFab interacts with endogenous cardiotonic steroids and reverses preeclampsia-induced Na/K-ATPase inhibition. Reprod. Sci. 19: 1260–1267. 2012.
63. *Агалакова Н.И., Резник В.А., Надей О.В., Ершов И.А., Рассоха О.С., Васютина М.Л., Тапильская Н.И., Рухляда Н.Н., Галагудза М.М., Багров А.Я.* Эндогенные кардиотонические стероиды и фиброз сосудов при преэклампсии. Артериальная гипертензия. 24: 684-692. 2018. [*Agalakova N.I., Reznik V.A., Nadei O.V., Ershov I.A., Rassokha O.S., Vasyutina M.L., Tapilskaya N.I., Rukhliada N.N., Galagudza M.M., Bagrov A.Y.* Endogenous cardiotonic steroids and vascular fibrosis in preeclampsia. Arterial Hypertension 24: 684–692. 2018. (In Russ)].
64. *Fedorova O.V., Ishkaraeva V.V., Grigorova Y.N., Reznik V.A., Kolodkin N.I., Zazerskaya I.E., Zernetkina V., Agalakova N.I., Tapilskaya N.I., Adair C.D., Lakatta E.G., Bagrov A.Y.* Antibody to

Marinobufagenin Reverses Placenta-Induced Fibrosis of Umbilical Arteries in Preeclampsia. Int. J. Mol. Sci. 19: 2377. 2018.

65. *Tihtonen K.M., Kööbi T.T., Uotila J.T.* Arterial stiffness in preeclamptic and chronic hypertensive pregnancies. Eur. J. Obst. Gynecol. Reprod. Biol. 128: 180–186. 2006.
66. *Agalakova N.I., Reznik V.A., Nadei O.V., Ershov I.A., Rassokha O.S., Vasyutina M.L., Ivanov D.O., Adair E.D., Galagudza M.M., Bagrov A.Y.* Antibody against Na/K-ATPase inhibitor lowers blood pressure and increases vascular Fli1 in experimental preeclampsia. Am. J. Hypertens. 33: 514–519. 2020.
67. *Uddin M.N., Wages J.M., Pantho A.F., Larrick J.W., Drever N., Allen S.R., Kuehl. TJ.* Novel anti-MBG antibodies protect cytotrophoblast cells from a marinobufagenin-induced preeclampsia phenotype. Am. J. Obstet. Gynecol. 218: S199. 2018.
68. *Pullen M.A., Harpel M.R, Danoff T.M., Brooks D.P.* Comparison of non-digitalis binding properties of digoxin-specific Fabs using direct binding methods. J. Immunol. Methods. 31: 235–241. 2008.
69. *Pullen M.A., Brooks D.P., Edwards R.M.* Characterization of the neutralizing activity of digoxin-specific Fab toward ouabain-like steroids. J. Pharmacol. Exp. Ther. 310: 319–325. 2004.
70. *Fedorova O.V., Tapilskaya N.I., Bzhelyansky A.M., Frolova E.V., Nikitina E.R., Reznik V.A., Kashkin V.A., Bagrov A.Y.* Interaction of Digibind with endogenous cardiotonic steroids from preeclamptic placentae. J. Hypertens. 28: 361–366. 2010.

Preeclampsia, Fibrosis and Marinobufagenin

N. I. Agalakova[a], V. A. Reznik[b], N. I. Kolodkin[c], N. I. Tapilskaya[d], and A. Y. Bagrov[a,*]

[a] *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, St. Petersburg, Russia*
[b] *School of Pediatric Medicine, St. Petersburg, Russia*
[c] *State Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russia*
[d] *Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductology, St. Petersburg, Russia*
**e-mail:aybagrov@gmail.com*

Preeclampsia is a life-threatening syndrome developing in pregnancy, the main features of which are hypertension and proteinuria. Frequency of preeclampsia has no tendency to decrease (3–7%), and it still takes the leading position in the structure of maternal mortality and morbidity worldwide. In this review, we present the "fibrotic concept" of the etiology and pathogenesis of preeclampsia, which involves system consisting of Na/K-ATPase and its endogenous ligands including marinobufagenin induced Fli1 inhibition. New therapy of preeclampsia includes modulation of the Na/K-ATPase system by immunoneutralization of marinobufagenin.

Keywords: preeclampsia, Na/K-ATPase, marinobufagenin, Fli1, collagen-1, vascular fibrosis

ЦИТИРОВАТЬ:

Агалакова Н.И., Резник В.А., Колодкин Н.И., Тапильская Н.И., Багров А.Я. Преэклампсия, фиброз и маринобуфагенин. Рос. Физиол. журн. им. И.М. Сеченова 106(11): 1340–1349.
DOI:10.31857/S0869813920110023

TO CITE THIS ARTICLE:

Agalakova N.I., Reznik V.A., Kolodkin N.I., Tapilskaya N.I., Bagrov A.Y. Preeclampsia, Fibrosis and Marinobufagenin. Russian Journal of Physiology. 106(11): 1340–1349.
DOI:10.31857/S0869813920110023

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 11, с. 1350–1369

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ИММУННОЛОГИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРЫС В МОДЕЛИ ПРИНУДИТЕЛЬНОГО ПЛАВАНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ АДАПТОГЕНОВ

© 2020 г. Н. В. Гончаров[1, 2, *], Е. А. Корф[1], И. В. Кудрявцев[3, 4], М. К. Серебрякова[3], И. А. Добрылко[1], А. В. Новожилов[1], И. В. Миндукшев[1]

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

[2]НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека, Ленинградская обл., пос. Кузьмоловский, Россия

[3]Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

[4]Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

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

Поступила в редакцию 30.07.2020 г.
После доработки 07.09.2020 г.
Принята к публикации 22.09.2020 г.

Цель работы состояла в исследовании влияния разных доз двух соединений аммония, хлорида (ХА) и карбоната (КА), а также их сочетания с декофеинизированным экстрактом зеленого чая (ЭЗЧ) на иммунологические показатели периферической крови крыс при физической нагрузке высокой интенсивности. С использованием гематологического анализатора и проточного цитофлуориметра установлены изменения абсолютного и относительного количества гранулоцитов, лимфоцитов, естественных киллеров, наивных и зрелых эффекторных клеток, а также некоторых минорных фракций лимфоцитов через сутки после окончания цикла принудительного плавания. Иммунологические показатели сопоставлены с продолжительностью плавания в последний день нагрузки и со средней продолжительностью плавания за 4 дня предельной нагрузки. Выявленные изменения свидетельствуют о высокой адаптогенной эффективности ХА в дозе 20 мг/кг, поскольку животные этой группы показали высокие функциональные результаты и у них не найдено признаков дезадаптации и перенапряжения иммунитета. КА в дозе 10 мг/кг приводит к аналогичному повышению функциональных результатов, но это сопряжено с мобилизацией клеточного иммунитета крыс. Повышение дозы КА в два раза ведет к срыву адаптации. ЭЗЧ не способствует повышению физической работоспособности, однако оказывает позитивное влияние на состояние иммунной системы животных. Сочетание ЭЗЧ с солями аммония не приводит к существенному улучшению функциональных показателей и в целом негативно влияет на клеточный иммунитет животных группы ЭЗЧ + КА10, в меньшей степени – группы ЭЗЧ + ХА20.

Ключевые слова: физическая нагрузка, адаптация, крысы, нутрицевтики, экстракт зеленого чая, аммоний, иммунитет

DOI: 10.31857/S0869813920110060

Известно, что умеренные физические нагрузки положительно влияют на иммунитет, обеспечивая лучшую устойчивость к инфекциям и общий иммунологический надзор [1]. Однако физическая нагрузка высокой интенсивности оказывает

негативное влияние на иммунные функции [2, 3]. Количество и функциональная активность циркулирующих клеток врожденного и приобретенного иммунитета могут существенно изменяться в зависимости от продолжительности и интенсивности тренировок, тогда как применение некоторых нутрицевтиков и растительных экстрактов способствует улучшению иммунных функций и повышению физических кондиций [4]. Экспериментальные исследования эффективности различных препаратов проводят чаще всего с использованием грызунов в моделях беговой и плавательной нагрузки [5]. Ранее мы показали, что применение декофеинизированного экстракта зеленого чая (ЭЗЧ) в модели принудительного плавания повышает выносливость крыс за счет дополнительного участия в работе медленных мышц, адаптация которых к нагрузке сопряжена с повышением экспрессии генов, ответственных за регуляцию баланса ионов Ca^{2+} [6]. Сравнение ЭЗЧ и одного из эндогенных продуктов метаболизма аминокислот – аммиака, который в виде раствора хлорида аммония (ХА) был апробирован в самостоятельном виде и в сочетании с ЭЗЧ, позволило установить стимулирующий эффект ХА, превышающий действие ЭЗЧ [7]. Исследования ультраструктуры мышечных волокон m. soleus (SOL) и m. extensor digitorum longus (EDL) крыс после цикла принудительного плавания на фоне действия ЭЗЧ и двух разных солей аммония, хлорида или карбоната (КА) в дозе 10 мг/кг показали, что эффективность препаратов зависит, прежде всего, от адаптационных изменений Т-трубочек и митохондрий быстрых мышц, но она повышается при участии медленных мышечных волокон в структурно-функциональной адаптации к предельной физической нагрузке [8]. Сравнение разных доз (10 и 20 мг/кг) ХА и КА на продолжительность плавания и максимальный уровень лактата позволило установить более высокую эффективность ХА в дозе 20 мг/кг по сравнению с 10 мг/кг, тогда как эффективность КА в дозе 10 мг/кг примерно соответствовала эффективности ХА в дозе 20 мг/кг [9]. Из 16 измеренных биохимических показателей эритроцитов наибольшее количество достоверных отклонений от контрольных значений было выявлено у крыс, получавших ХА в дозах 20 и 10 мг/кг, наименьшее количество – у крыс, получавших КА в этих же дозах [10]. Сравнительный анализ уровней восстановленного глутатиона и 2,3-бисфосфоглицерата, активностей 5'-нуклеотидазы, Ca- и Na/K-АТФаз свидетельствует о более строгом контроле механизма доставки кислорода в ткани крыс, получавших ХА в дозе 20 мг/кг [10]. По совокупности функциональных и биохимических показателей ХА в дозе 20 мг/кг обладал некоторым преимуществом перед КА в дозе 10 мг/кг, однако никакие выводы об эффективности и безопасности того или иного препарата без учета его влияния на состояние иммунной системы не могут считаться обоснованными. Кроме того, представляет интерес исследование сочетанного воздействия ЭЗЧ и солей аммония на адаптационные возможности организма и роль иммунной системы в механизмах адаптации к экстремальной физической нагрузке.

Цель данной работы – провести сравнительный анализ эффективности двух доз разных солей аммония, хлорида и карбоната, а также их сочетанного действия с ЭЗЧ на функциональные, гематологические и иммунологические показатели крыс через сутки после окончания цикла принудительного плавания.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены в соответствии с Правилами проведения работ с животными, утвержденными комиссией по этике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН. Подробно методика плавательной нагрузки была представлена ранее [7]. Коротко, крыс-самцов массой 200 ± 10 г предварительно адаптировали к воде в течение 5 дней. На 6-е сутки проводили тестирование с грузом, составлявшего 7% от массы тела. По результатам тестиро-

вания было сформировано 9 групп: 1-я – интактные животные (отрицательный контроль, $n = 17$); 2-я – положительный контроль: плавание и пероральное введение NaCl (физиологический раствор) в дозе 10 мг/кг ($n = 12$) за 5 мин до начала нагрузки; 3-я и 4-я группы –введение ХА в дозе 10 ($n = 7$) и 20 мг/кг ($n = 19$) соответственно за 5 мин до начала нагрузки; 5-я и 6-я группы –введение КА в дозе 10 ($n = 20$) и 20 мг/кг ($n = 8$) соответственно за 5 мин до начала нагрузки; 7-я группа (ЭЗЧ, $n = 9$) – введение перорально водного раствора препарата ЭЗЧ в дозе 12 мг/кг в пересчете на катехины за 2 ч до нагрузки и через 2 ч после окончания нагрузки (суточная доза катехинов 24 мг/кг); 8-я группа (ЭЗЧ + ХА, $n = 8$) – плавание на фоне введенного ЭЗЧ (доза и режим введения, как в 7-й группе) в сочетании с ХА (20 мг/кг за 5 мин до начала нагрузки); 9-я группа (ЭЗЧ + КА, $n = 8$) – плавание на фоне ЭЗЧ (доза и режим введения, как в 7-й группе) в сочетании с КА (10 мг/кг за 5 мин до начала нагрузки). Все препараты вводили, начиная со 2-й недели эксперимента. В течение пяти суток 2-й недели и шести суток 3-й недели эксперимента крыс подвергали нормированной нагрузке: общая продолжительность плавания составляла 50–60% от показателей тестирования. На шестые сутки 2-й недели эксперимента проводили промежуточное тестирование. В течение четырех дней 4-й недели эксперимента крыс ежедневно подвергали предельной нагрузке. Через сутки после последней нагрузки животных умерщвляли посредством декапитации, смешанную кровь собирали в гепаринизированные пробирки. Гематологический анализ выполняли на анализаторе Medonic M20 (Boule Medical AB, Швеция), подсчитывали лейкоциты (WBC), абсолютное и процентное содержание лимфоцитов (LYM), нейтрофилов (GRAN) и моноцитов (MON). Для выявления основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови в пробирки 10 × 75 мм (Beckman Coulter, США) вносили по 50 мкл цельной крови, после чего образцы окрашивали препаратами антител, конъюгированных с различными флуорохромами (все антитела производства Biolegend, США). Для выявления основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови использовали следующий набор антител: CD45-APC/Cy7, CD3-APC, CD4-PE/Cy7, CD8a-PerCP, CD161a-PE и CD45RA-FITC. Данная комбинация антител применялась для выделения общей популяции Т-лимфоцитов – клеток, экспрессирующих CD3 на своей поверхности, а также популяций Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток, несущих на своей поверхности, помимо CD3, еще и CD4 или CD8a соответственно. В-клетки периферической крови определялись как CD3–CD45RA+, тогда как натуральные киллерные клетки (NK-клетки) обладали фенотипом CD3–CD161a+. Кроме того, определяли содержание NKT-клеток – Т-лимфоцитов, коэкспрессировавших CD161a на своей поверхности (фенотип CD3+CD161a+). С использованием антител против CD44H, конъюгированных с FITC, и против CD62L, конъюгированных с PE, Т-хелперы и цитотоксические Т-клетки были разделены на следующие субпопуляции: “наивные” клетки с фенотипом CD44–CD62L+, клетки центральной памяти (CD44+CD62L+), клетки эффекторной памяти (CD44+CD62L–) и зрелые эффекторные клетки (CD44–CD62L–). Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США), оснащенном двумя диодными лазерами 488 и 638 нм. Для каждого из образцов анализировали не менее 20000 лимфоцитов. Математическую обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программ Navios Software v.1.2 и Kaluza™ v.1.3 (Beckman Coulter, США).

Статистический анализ. Рассчитывали средние значения, медианы, квартили Q1–Q3. Для оценки значимости различий между группами использовали критерий Краскела–Уоллиса. Уровень корреляции рассчитывали по Спирмену (значение rho, 2-сторонняя). Различия считали значимыми при уровне достоверности более 95% ($p < 0.05$). Расчеты проводили в двух совместимых средах Excel 2016 и Past 3.24, использовали лицензионные программы.

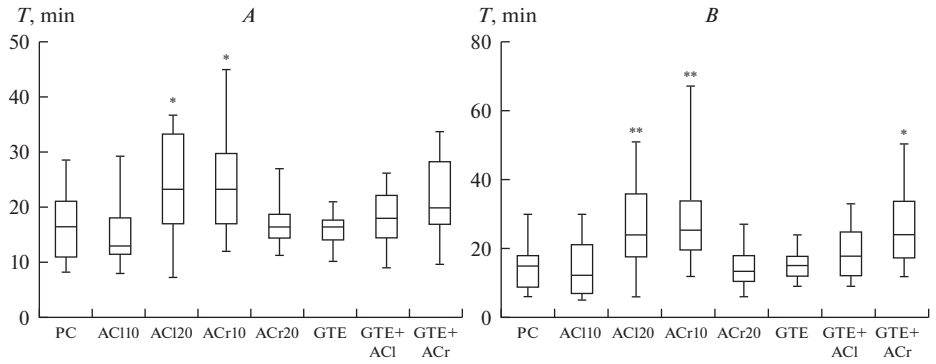


Рис. 1. Средняя продолжительность плавания крыс в течение 4 дней предельной нагрузки (*A*) и продолжительность плавания в последний день (*B*), медианы (min; max). *, ** – отличия от группы положительного контроля (PC) статистически значимы ($p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно).

Расшифровка аббревиатур: PC – положительный контроль (введение раствора NaCl за 5 мин до нагрузки); ACl10 – введение хлорида аммония в дозе 10 мг/кг; ACl20 – введение хлорида аммония в дозе 20 мг/кг; ACr10 – введение карбоната аммония в дозе 10 мг/кг; ACr20 – введение карбоната аммония в дозе 20 мг/кг; GTE – введение водного раствора ЭЗЧ в дозе 12 мг/кг в пересчете на катехины за 2 ч до нагрузки и через 2 ч после окончания нагрузки (суточная доза катехинов 24 мг/кг); GTE + ACl – введение ЭЗЧ дважды в день и ХА (20 мг/кг) за 5 мин до начала нагрузки; GTE + ACr – введение ЭЗЧ дважды в день и КА (10 мг/кг) за 5 мин до начала нагрузки.

Fig. 1. Average swimming time of rats during 4 days of maximum load (*A*) and swimming time on the last day (*B*), median (min; max). *, ** – differences from the positive control (PC) group are statistically significant ($p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively).

The meaning of abbreviations: PC – positive control (introduction of NaCl solution 5 min before the load); ACl10 – administration of ammonium chloride at a dose of 10 mg/kg; ACl20 – administration of ammonium chloride at a dose of 20 mg/kg; ACr10 – introduction of ammonium carbonate at a dose of 10 mg/kg; ACr20 – introduction of ammonium carbonate at a dose of 20 mg/kg; GTE – the introduction of an aqueous solution of GTE at a dose of 12 mg/kg in terms of catechins 2 h before the load and 2 h after the end of the load (daily dose of catechins 24 mg/kg); GTE + ACl20 – administration of GTE twice a day and ACl (20 mg/kg) 5 min before the start of the load; GTE + ACr10 – administration of GTE twice a day and ACr (10 mg/kg) 5 min before the start of the load.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У крыс контрольной группы продолжительность плавания в последние сутки эксперимента, как и средняя продолжительность плавания за 4 суток предельной нагрузки, значимо не изменилась по отношению к исходному уровню. Крысы, получавшие ХА в дозе 10 мг/кг (группа ХА10), также не демонстрировали статистически значимого повышения выносливости. В группе ХА20 средняя продолжительность плавания увеличилась на 35%, а продолжительность плавания в последний день нагрузки – в полтора раза по сравнению с контролем (рис. 1*A*, *B*). Однако в группах, получавших КА, увеличение дозы не привело к повышению продолжительности плавания крыс: если у крыс группы КА10 показатели продолжительности плавания практически совпадали с показателями группы ХА20, то у крыс группы КА20 не наблюдалось даже тенденции к повышению этого показателя. Применение ЭЗЧ, а также сочетание ЭЗЧ с хлоридом и карбонатом аммония в дозах 20 и 10 мг/кг соответственно не привело к повышению средней продолжительности

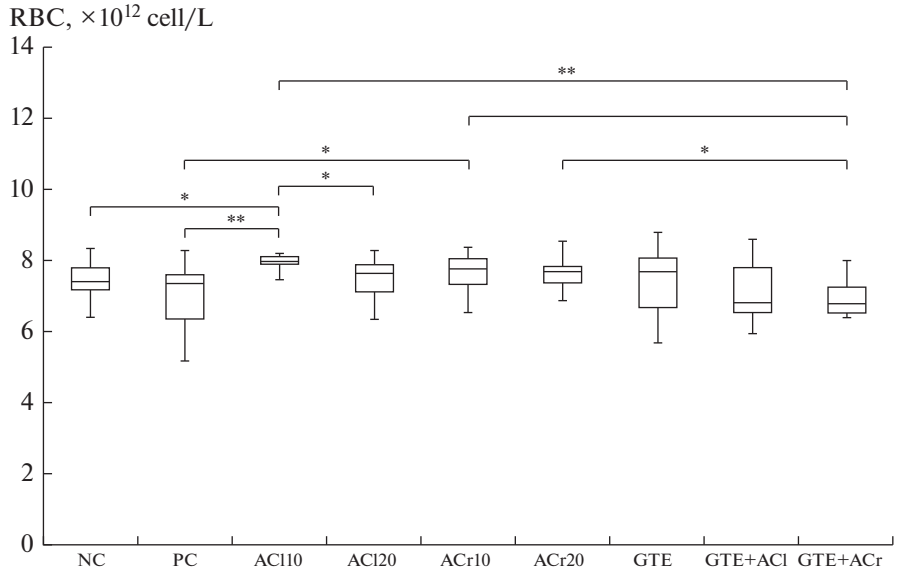


Рис. 2. Количество эритроцитов в разных группах крыс через сутки после окончания цикла принудительного плавания. *, ** – отличия между группами статистически значимы ($p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно). NC – отрицательный контроль (интактные животные); остальные обозначения те же, что на рис. 1.

Fig. 2. The number of erythrocytes in different groups of rats one day after the end of the forced swimming cycle. *, ** – differences between the groups are statistically significant ($p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively). NC – negative control (intact animals); other designations are the same as in fig. 1.

плавания, однако, показатели 4-го дня у животных группы ЭЗЧ + КА10 близки к показателям групп ХА20 и КА10 (рис. 1*Б*).

Гематологический анализ. По данным гематологического анализа, у крыс группы ХА10 выявлен максимальный уровень эритроцитов, который статистически значимо в среднем на 10% превышал соответствующий уровень у крыс отрицательного и положительного контроля, на 6% – уровень группы ХА20 и на 20% – уровень группы ЭЗЧ + КА10 (рис. 2).

Достоверное снижение уровня тромбоцитов на 40% ($p < 0.05$) выявлено лишь у крыс группы ЭЗЧ + КА10 относительно отрицательного контроля, хотя следует отметить тенденцию ($p < 0.1$) к уменьшению количества тромбоцитов в этой же группе относительно групп ХА20 и КА10, представители которых показали лучшие результаты продолжительности плавания (рис. 3).

Физиологические реакции при интенсивной физической нагрузке обычно сопровождаются ускоренной инфильтрацией лейкоцитов, дифференцировкой лимфоцитов и продукцией провоспалительных цитокинов [11]. Нейтрофилы, как известно, являются полностью дифференцированными короткоживущими клетками. Время их циркуляции в крови составляет около 10 ч, затем они мигрируют в ткани, где подвергаются спонтанному апоптозу в течение 1–2 дней и фагоцитируются тканевыми макрофагами [12]. Количественный характер перераспределения лимфоцитов и гранулоцитов в разных группах необходимо трактовать, памятуя о преобладании лимфоцитов в лейкоцитарном профиле грызунов, в отличие от преобладания нейтрофилов в аналогичном профиле человека.

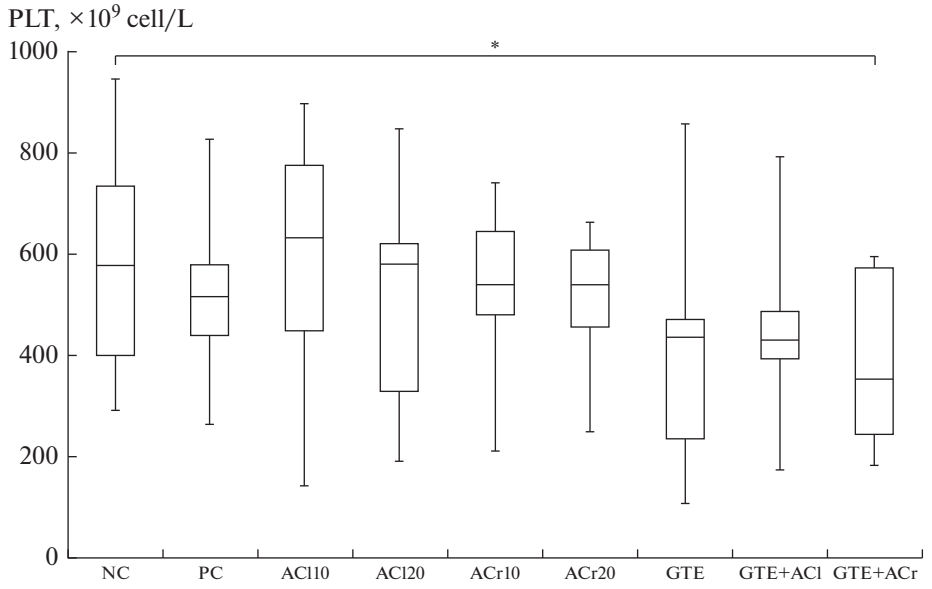


Рис. 3. Количество тромбоцитов в разных группах крыс через сутки после окончания цикла принудительного плавания. Обозначения те же, что на рис. 1 и 2.
Fig. 3. The number of platelets in different groups of rats one day after the end of the forced swimming cycle. Designations are the same as in fig.1 and 2.

Интенсивная физическая нагрузка в нашем эксперименте не вызвала каких-либо изменений уровня лейкоцитов, который был примерно одинаков во всех группах животных; незначительные отличия между группами не попадали даже под определение “тенденции” ($0.05 < p < 0.1$). Абсолютные количества лимфоцитов, гранулоцитов и моноцитов также не имели достоверных отличий между группами, однако, выявлены статистически значимые *относительные* изменения уровня лимфоцитов у крыс группы КА10 (повышение на 4–10% по отношению к группам ХА20, КА20 и ЭЗЧ + ХА20) и уровня гранулоцитов у крыс этой же группы (понижение на 10–30% по отношению к группам ХА10, ХА20 и КА20) (рис. 4*A*, *B*). Эти изменения могут свидетельствовать об адаптивном дисбалансе клеточного иммунитета у крыс группы КА10, что связано с демонстрацией относительно высоких функциональных результатов и, вероятно, сопутствующим повреждением мышечных волокон. Поскольку мы не выявили изменений относительного и абсолютного количества В-лимфоцитов в разных группах животных по отношению к интактному (отрицательному) контролю (здесь не показано), наблюдаемые изменения лимфоцитарного профиля должны быть обусловлены субпопуляциями клеточного иммунитета.

Показатели в группах животных, которым вводили ХА, оставались на уровне интактного контроля, тогда как более значительная разница с группой КА20 обусловлена отклонением показателей этой группы от показателей контроля, что может свидетельствовать о перенапряжении или даже срыве адаптации животных при повышении дозировки карбонатной соли аммония в два раза. Следует также отметить, что, согласно полученным медианам, применение ЭЗЧ в сочетании с КА10 оказывает аддитивный эффект на изменение доли лимфоцитов и эффект потенцирования на изменение доли гранулоцитов, хотя сравнительно малая выборка групп

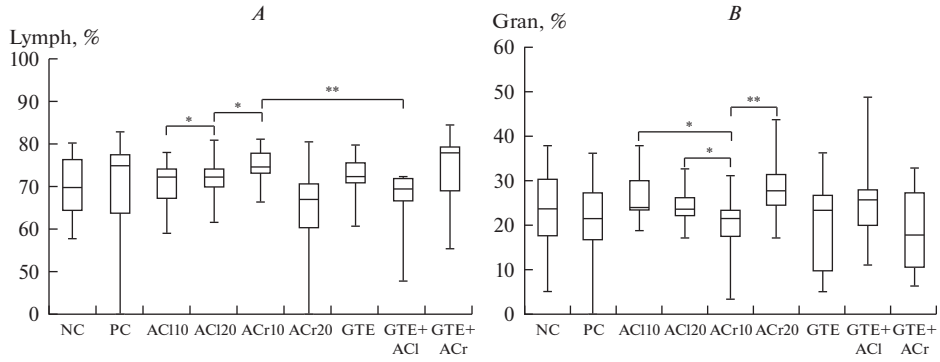


Рис. 4. Доля (%) лимфоцитов (*A*) и гранулоцитов (*B*) в разных группах крыс через сутки после цикла принудительного плавания. Обозначения те же, что на рис. 1 и 2.

Fig. 4. The proportion (%) of lymphocytes (*A*) and granulocytes (*B*) in different groups of rats one day after the forced swimming cycle. Designations are the same as in fig. 1 and 2.

ЭЗЧ и ЭЗЧ + КА10 не позволила получить статистически значимые отличия. Однако эти предположения частично подтверждаются изменениями относительного и абсолютного количества NK-клеток: достоверные отличия в 2 и 1.5 раза соответственно выявлены между группами ЭЗЧ + КА10 и ХА20, в первой из которых уровень NK-клеток повышен, а во второй понижен относительно контроля (рис. 5*A*, *B*). Повышение уровня и/или активности NK-клеток происходит не только при инфицировании клеток вирусами или злокачественном перерождении, как это считалось не так давно. Например, активация NK-клеток отмечена при иктогенезе в пилокарпиновой модели судорог у грызунов [13]. Более того, по данным работы [14], наибольшее увеличение (в среднем в 5.6 раза) NK-клеток наблюдается сразу после максимальной нагрузки, затем происходит их перераспределение в тканях, в том числе, из-за миграции NK-клеток в места повреждения мышц [15]. Уровень NK-клеток может значимо изменяться в зависимости от интенсивности физической нагрузки, что также определяет уровень содержания NK-лимфоцитов в восстановительный период [16]. Таким образом, у животных группы ЭЗЧ + КА10, вероятно, происходит повреждение миоцитов и развитие воспалительного процесса, острая фаза которого, связанная с распознаванием антигена, либо недавно миновала, либо подходит к концу, и процесс переходит в эффекторную фазу иммунного ответа. Можно предположить, что фаза распознавания антигена слабо выражена у крыс, т.к. предельную нагрузку они ранее не испытывали и соответствующие антигены не были экспрессированы миоцитами. Возможно, по этой причине активация лимфоцитов на следующей стадии иммунного ответа обеспечивается, главным образом, NK-клетками.

Минорные субпопуляции Т-лимфоцитов. На самой ранней стадии дифференцировки Т-лимфоциты (тимоциты) не экспрессируют корецепторы CD4 и CD8 и определяются как двойные негативные, CD4–CD8– или DN (double negative). На следующей стадии созревания тимоциты экспрессируют оба маркера, CD4+CD8+ или DP (double positive). В циркулирующей крови DN и DP встречаются в малых количествах, динамика этих клеток при экстремальных состояниях и заболеваниях даже у человека очень слабо изучена, а при физических нагрузках не изучена вовсе, так что наши данные, полученные на крысах, являются во многих отношениях пионерскими. Анализ минорных субпопуляций Т-лимфоцитов не выявил существенных отличий между группами по относительному и абсолютному уровню DP лимфо-

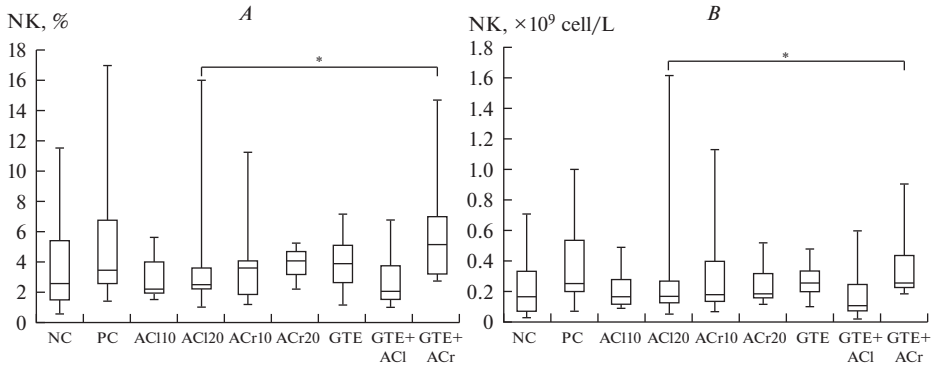


Рис. 5. Относительное (%, *A*) или абсолютное количество ($\times 10^9$ кл./л, *B*) NK-клеток в разных группах крыс через сутки после окончания цикла принудительного плавания. Обозначения те же, что на рис. 1 и 2.

Fig. 5. Relative (%, *A*) or absolute number ($\times 10^9$ cells/L, *B*) of NK cells in different groups of rats one day after the end of the forced swimming cycle. Designations are the same as in fig. 1 and 2.

цитов. Повышенный уровень этой субпопуляции выявлен при некоторых онкологических и инфекционных заболеваниях и может быть обусловлен преждевременным выходом DP-клеток из тимуса [17–19]. В то же время, у крыс группы ЭЗЧ отмечено повышение уровня абсолютного количества DN-клеток по отношению к группам отрицательного и положительного контроля ($p < 0.05$), а у крыс группы ЭЗЧ + КА10 – повышение относительного количества DN-клеток по отношению к группам положительного контроля, ХА10 и ХА20 (рис. 6*A*, *B*). Здесь следует сказать о двух дополнительных особенностях DN-клеток. Первая особенность состоит в том, что в их плазматической мембране экспрессированы рецепторы интерлейкина 2, IL-2Rα и IL-2Rβ, которые также являются специфическими маркерами регуляторных Т-клеток [20]. Вторая особенность – экспрессия рецептора Notch1, активация которого – необходимое условие дифференцировки DN-клеток в Т-лимфоциты, в отсутствие которой дифференцировка DN-клеток происходит по другим путям с образованием NK-лимфоцитов, В-лимфоцитов или миелоидных клеток [21]. Уровень экспрессии и степень активации этих рецепторов заслуживает отдельного исследования, однако, принимая во внимание отсутствие изменений количества В-лимфоцитов, наряду с повышенным уровнем абсолютного и относительного количества NK-клеток в группах ЭЗЧ и ЭЗЧ+КА10 соответственно, можно предположить нарушение экспрессии и/или активации рецептора Notch1 в этих группах, и, как следствие, – нарушение дифференцировки DN-клеток.

Субпопуляция Т-лимфоцитов, получившая название NKT-клеток, экспрессирует как маркеры NK-клеток (у человека это CD16 и CD56, у крыс CD161a+), так и Т-клеточные дифференцировочные антигены (в первую очередь CD3+) и относятся к клеткам врожденного иммунитета. Они представляют собой минорную популяцию Т-клеток, которая благодаря своей аутореактивности и способности быстро продуцировать различные цитокины, обеспечивает связь между врожденным и адаптивным звеньями иммунитета [22]. Анализ содержания NKT-клеток в периферической крови крыс через сутки после окончания цикла принудительного плавания выявил редкое совпадение (в нашем эксперименте – единственное) статистически значимых изменений относительного и абсолютного количества клеток, характер которых при этом был во многом похож на относительные изменения DN-клеток: максимальное увеличение по отношению к отрицательному контролю – в группе

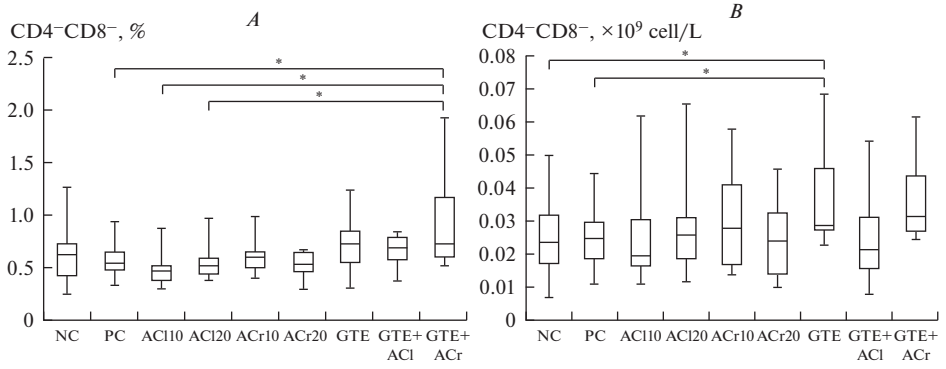


Рис. 6. Относительное (%, *A*) или абсолютное количество ($\times 10^9$ кл./л, *B*) DN-клеток в разных группах крыс через сутки после окончания цикла принудительного плавания. Обозначения те же, что на рис. 1 и 2.

Fig. 6. Relative (%, *A*) or absolute number ($\times 10^9$ cells/L, *B*) DN-cells in different groups of rats one day after the end of the forced swimming cycle. Designations are the same as in fig. 1 and 2.

ЭЗЧ+КА10, максимальное уменьшение – в группе ХА20, достоверные отличия относительных и абсолютных показателей группы ЭЗЧ+КА10 по отношению к показателям групп положительного контроля, ХА10 и ХА20, а также показателей группы ЭЗЧ по отношению к группе ХА20 (рис. 7*A*, *B*). В отличие от NK-клеток, где изменения могут быть зарегистрированы сразу после физической нагрузки, в другой модели длительной физической нагрузки (бег на тредмилле с нарастающей интенсивностью) значимые изменения уровня NKT-клеток в крови крыс были выявлены лишь через 7 суток после окончания цикла продолжительностью 9 нед. [23, 24]. Снижение количества NKT-клеток сопровождалось уменьшением соотношения хелперов 1-го и 2-го типа, что свидетельствует об усилении гуморальной и ослаблении клеточной составляющей иммунитета и в целом расценивается авторами исследования как отрицательный эффект перенагрузки, связанный с ослаблением иммунитета. К сожалению, в этой модели не была предусмотрена оценка функциональной эффективности, акцент был сделан на получении эффекта физической перенагрузки как таковой и ее связи с уровнем напряжения иммунитета, в отличие от нашей модели принудительного плавания, где главная задача состояла в поиске корреляций и причинно-следственных связей между функциональной эффективностью препаратов и физиолого-биохимическими (в том числе иммунологическими) показателями. В нашей модели изменения уровня NKT-клеток выявлены гораздо раньше, через сутки после окончания цикла плавательной нагрузки, причем у животных, показавших максимальную функциональную эффективность (группа ХА20), уровень NKT-клеток уменьшается, тогда как повышение уровня этих клеток выявлено в группе крыс, показавших минимальную эффективность (группа ЭЗЧ+КА10). Однако мы не склонны связывать полученные изменения исключительно с негативной модуляцией иммунитета, поскольку именно функциональный критерий является определяющим в оценке качества адаптации, физиологического и иммунологического статуса животных. Для уточнения механизмов адаптации иммунной системы к предельным нагрузкам необходимо рассмотреть изменение соотношения основных субпопуляций Т-лимфоцитов (цитотоксических и хелперов), а также выявить корреляционную зависимость индивидуальных иммунологических показателей крыс с индивидуальной продолжительностью плавания.

Анализ субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов (Тс). Известно, что по мере дифференцировки Т-клетки изменяют поверхностный фенотип и свои функцио-

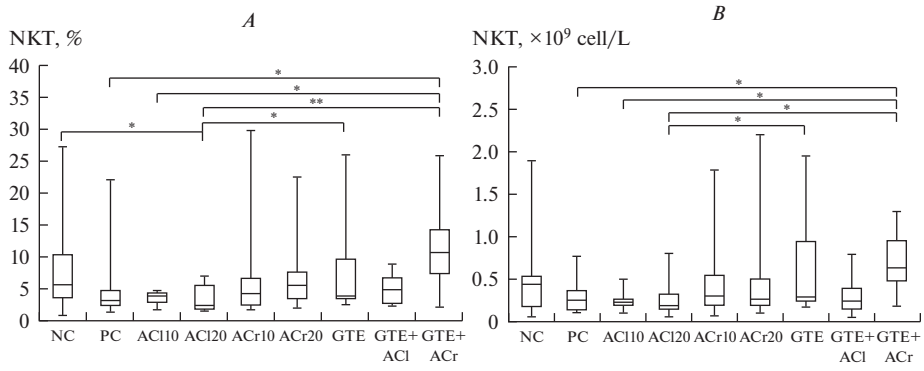


Рис. 7. Относительное (%, *A*) или абсолютное количество ($\times 10^9$ кл./л, *B*) NKT-клеток в разных группах крыс через сутки после окончания цикла принудительного плавания. Обозначения те же, что на рис. 1 и 2.

Fig. 7. Relative (%, *A*) or absolute number ($\times 10^9$ cells/L, *B*) of NKT cells in different groups of rats one day after the end of the forced swimming cycle. Designations are the same as in fig. 1 and 2.

нальные особенности. На основании экспрессии CD44 (определяет способность к миграции в не-лимфоидные ткани) и CD62L (способность к миграции через высокий эндотелий лимфатического русла) каждая из основных популяций Т-клеток может быть разделена на субпопуляции. Так, “наивные” цитотоксические Т-клетки (CD44–62L+) обладают высоким пролиферативным потенциалом, продуцируют IL-2, способны к миграции в ткани и не имеют эффекторных функций. Клетки центральной памяти (CD44+62L+) способны к пролиферации при непосредственном контакте с антигеном без этапа его презентации дендритными клетками и макрофагами, продуцируют IL-2 и интерферон-γ (IFN-γ), но не имеют киллерной активности. Клетки эффекторной памяти (CD44+62L–) и зрелые эффекторы (CD44–62L–) продуцируют в основном IFN-γ и TNF-α, обладают цитотоксической активностью [3].

Согласно данным нашего эксперимента, повышение доли наивных цитотоксических Т-клеток имеет характер тенденции ($p < 0.1$) в группах ХА10 и ХА20 (рис. 8*A*), однако, определение абсолютного количества этих клеток позволило выявить статистически значимое повышение количества клеток этой субпопуляции в этих же группах экспериментальных животных (рис. 8*B*). В группах ЭЗЧ+ХА20 и особенно ЭЗЧ+КА10, наоборот, выявлены статистически значимые изменения доли наивных цитотоксических Т-клеток по сравнению с группой ХА10 (для обеих сравниваемых групп), а также по сравнению с группами NaCl, ХА20 и КА10 (только для группы ЭЗЧ+КА10) (рис. 8*A*). Абсолютное количество этих клеток в группах с ЭЗЧ не имеет статистически значимых отличий от показателей других групп (рис. 8*B*).

Что касается клеток эффекторной памяти и зрелых эффекторов (3-я и 4-я стадии дифференцировки Т-клеток соответственно), то их относительное уменьшение статистически значимы в группах ХА10 и ХА20 соответственно (рис. 8*B*, *E*). В то же время в группах ЭЗЧ, ЭЗЧ+ХА20 и ЭЗЧ+КА10 выявлено достоверное увеличение относительного количества этих субпопуляций клеток по сравнению с группами положительного контроля (NaCl), ХА10, ХА20 и КА10. Более того, в группе ЭЗЧ+КА10 выявлено достоверное увеличение абсолютного количества клеток эффекторной памяти и зрелых эффекторов по отношению к группам NaCl, ХА10, ХА20 и КА10, это отличие достигало почти 600% (например, зрелые эффекторы в группе ЭЗЧ+КА10 по сравнению с группой ХА20, рис. 8*D*, *F*). Известно, что

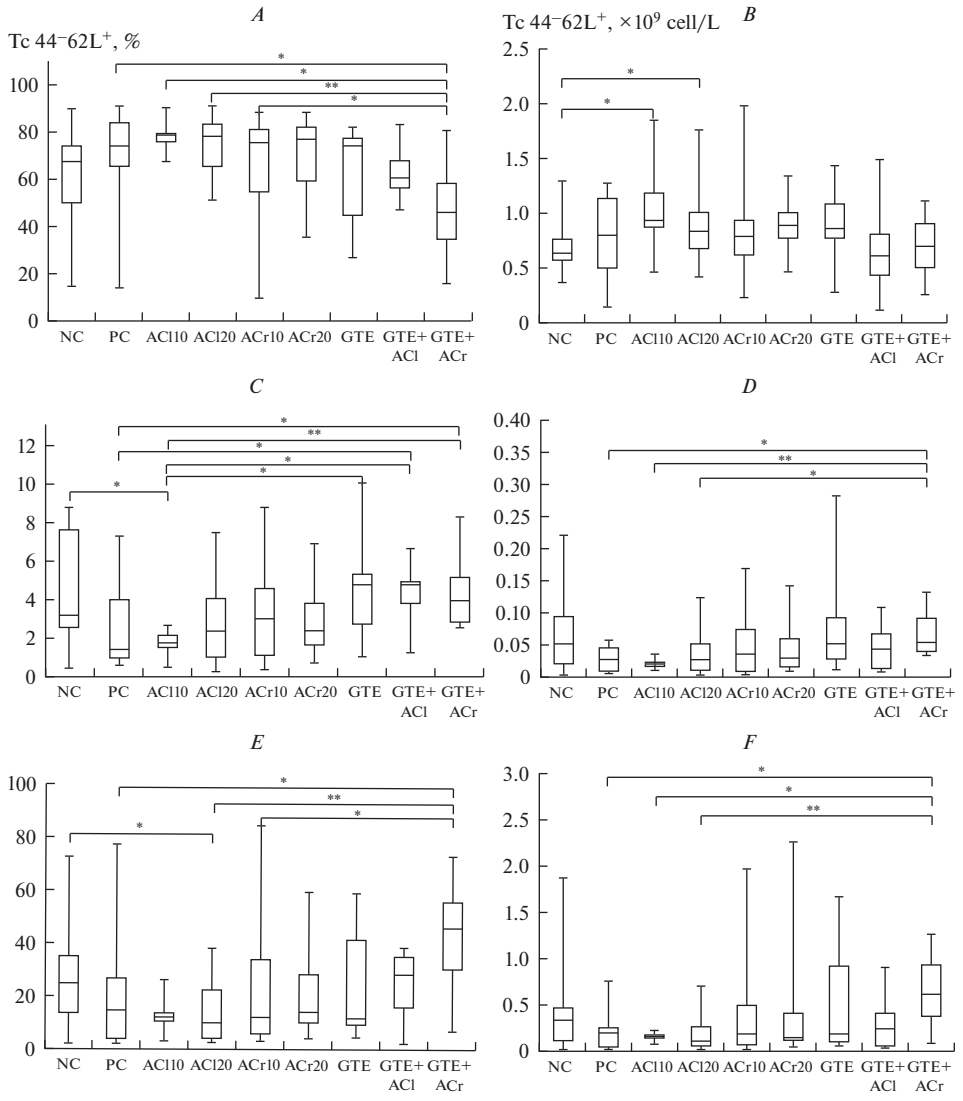


Рис. 8. Относительное (%) или абсолютное количество ($\times 10^9$ кл./л) цитотоксических лимфоцитов в разных группах крыс через сутки после окончания цикла принудительного плавания: “наивные” клетки (*A*, *B*), клетки эффекторной памяти (*C*, *D*), зрелые эффекторные клетки (*E*, *F*). Обозначения те же, что на рис. 1 и 2.

Fig. 8. Relative (%) or absolute number ($\times 10^9$ cells/L) of cytotoxic lymphocytes in different groups of rats one day after the end of the forced swimming cycle: “naive” cells (*A*, *B*), effector memory cells (*C*, *D*), mature effector cells (*E*, *F*). Designations are the same as in fig. 1 and 2.

оптимальная, неизнурительная физическая нагрузка приводит к повышению уровня наивных Т-клеток, это является признаком стимуляции/укрепления иммунной системы спортсменов. Однако перетренировка обусловливает изменение баланса – уменьшение доли наивных и увеличение доли зрелых эффекторов, что свиде-

тельствует об ослаблении иммунитета и восприимчивости к заболеваниям, в частности, к вирусным инфекциям [3].

Анализ субпопуляций Т-хелперов (Th). Максимальное увеличение доли наивных Th выявлено у крыс группы ХА10, максимальное уменьшение – у крыс группы ЭЗЧ+ХА20, разница между медианами этих групп составила 14% ($p < 0.01$). Снижение доли наивных Th в группе ЭЗЧ+ХА20 имеет статистически значимый характер по отношению не только к группе ХА10, но также к группам отрицательного и положительного контроля, ХА20, КА10 и КА20. Несколько меньшее снижение доли Th выявлено у крыс группы ЭЗЧ+КА10, достоверность изменений установлена для всех перечисленных групп за исключением группы КА10, по отношению к которой изменения имеют характер тенденции ($p < 0.1$). Также следует отметить достоверность отличий между группой ХА10, с одной стороны, и группами КА10 и ЭЗЧ, с другой стороны (рис. 9*A*). Профиль абсолютного количества наивных Th по группам выглядел несколько по-другому: если минимальное количество также было выявлено у крыс группы ЭЗЧ+ХА20, то максимальное количество оказалось, как ни странно, у крыс группы ЭЗЧ (рис. 9*B*), разница между ними составила 65% ($p < 0.05$). Далее, в порядке убывания, расположились группы положительного контроля, ХА20 и ХА10, у представителей которых отклонения от показателей группы ЭЗЧ+ХА20 также имело статистически значимый характер, тогда как отклонения от отрицательного контроля имело характер тенденции ($p < 0.1$).

На следующей стадии дифференцировки распределение относительного количества хелперов центральной памяти выглядит следующим образом: минимум – у представителей группы ХА10, достоверность отличий выявлена по отношение ко всем другим группам за исключением группы КА20 (рис. 9*C*); максимум – у представителей групп ЭЗЧ+ХА20 и ЭЗЧ+КА10, превышение минимального уровня более чем радикальное – в 2.5 раза, достоверность отличий выявлена по отношению к группам положительного контроля, ХА10, ХА20, КА10 и КА20. Распределение медиан абсолютного количества Т-хелперов достаточно хорошо соответствует распределению относительного количества этих клеток: минимум у крыс групп ХА10 и КА20, хотя по количеству достоверных отличий по отношению к другим группам группа КА20 опережает группу ХА10; максимум с разницей в 2 раза – у крыс групп ЭЗЧ и ЭЗЧ+КА10, но и здесь, если судить по количеству достоверных отличий, группа ЭЗЧ впереди (рис. 9*D*).

Относительное количество Т-хелперов эффекторной памяти повышено во всех экспериментальных группах, но максимальное их количество и статистически значимые отличия в 1.5–2 раза от групп отрицательного контроля, ХА10 и ХА20 выявлены в группах ЭЗЧ+ХА20 и ЭЗЧ+КА10 (рис. 9*E*). Абсолютное количество этой субпопуляции хелперов максимально в группах КА10 и ЭЗЧ + ХА20 (достоверные отличия в 2 раза от группы отрицательного контроля, несколько меньше – у крыс положительного контроля и ЭЗЧ+КА10 ($p < 0.1$ по отношению к отрицательному контролю) (рис. 9*F*).

Среди зрелых эффекторов, клеток последней стадии дифференцировки, не выявлено достоверных отличий между группами по относительному количеству клеток, тем не менее, отметим максимальное значение медианы группы КА20 ($p < 0.1$ по отношению к отрицательному контролю и ЭЗЧ). Что касается абсолютного количества зрелых эффекторов, мы не выявили отличий между группами даже на уровне тенденции (здесь не показано).

Корреляционный анализ функциональных (продолжительность плавания) и иммунологических показателей не выявил статистически значимых корреляций в пяти группах экспериментальных животных: ХА10, ХА20, ЭЗЧ, ЭЗЧ+ХА20, ЭЗЧ+КА10. В их число вошли животные, которым вводили хлорид аммония (обе дозы) и ЭЗЧ в разных вариантах – самостоятельно и в сочетании с обеими солями аммония. До-

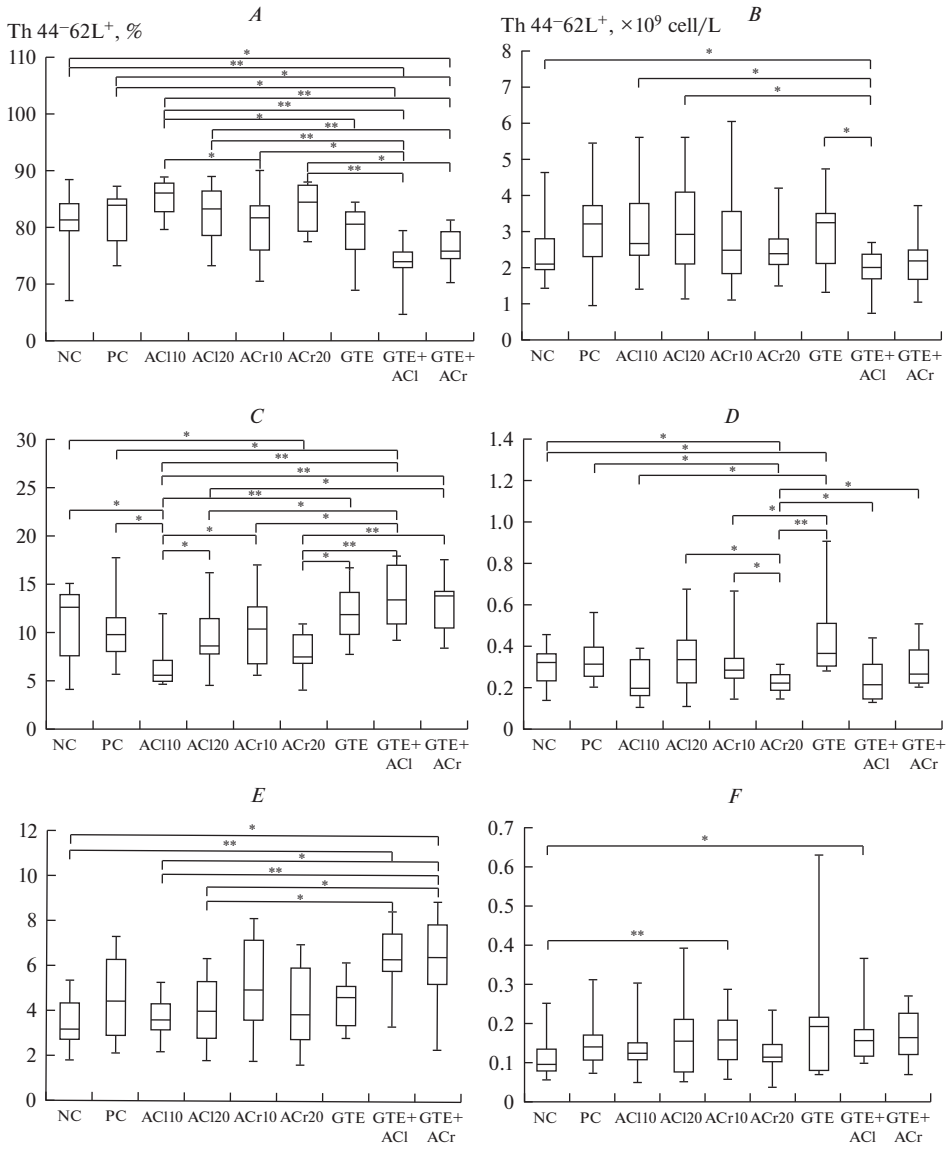


Рис. 9. Относительное (%) или абсолютное количество ($\times 10^9$ кл./л) Т-хелперов в разных группах крыс через сутки после окончания цикла принудительного плавания: “наивные” клетки (*A*, *B*), клетки центральной памяти (*C*, *D*), клетки эффекторной памяти (*E*, *F*). Обозначения те же, что на рис. 1 и 2.

Fig. 9. Relative (%) or absolute number ($\times 10^9$ cells/L) of T-helpers in different groups of rats one day after the end of the forced swimming cycle: “naive” cells (*A*, *B*), central memory cells (*C*, *D*), effector memory cells (*E*, *F*). Designations are the same as in fig. 1 and 2.

стоверность корреляций выявлена в группе положительного контроля и группах животных, которым вводили карбонат аммония (обе дозы). Наибольшее их количество выявлено в группе положительного контроля (9 и 13 при сравнении с продолжительностью плавания в 4-й день и средней продолжительностью за 4 дня соответ-

ственно), на втором месте с большим отрывом следует группа КА10 (2 и 1 соответственно) и на третьем месте – группа КА20 (2 и 0 соответственно) (табл. 1). Уже из этих данных со всей очевидностью следует, что выполнение предельной физической нагрузки контрольными животными сопряжено с усиленной мобилизацией системы клеточного иммунитета. Количество достоверных корреляций со средней продолжительностью плавания за 4 дня нагрузки почти в 1.5 раза (13 против 9) превышает количество корреляций с продолжительностью плавания в последний, 4-й день нагрузки, что свидетельствует об отсутствии особого "прогресса" в продолжительности плавания в течение четырех дней нагрузки и формировании иммунного ответа в организме условных "рекордсменов" с первого же дня выполнения серии предельных нагрузок. Спектр показателей, по которым выявлены статистически значимые корреляции группы положительного контроля, указывает не только на структуру иммунного ответа, но и дополнительно свидетельствует о негативных сдвигах в системе клеточного иммунитета: это *отрицательные* корреляции по абсолютному количеству лимфоцитов, соотношению абсолютного количества Th и Tc, относительному и абсолютному количеству "наивных" Th и Tc-клеток, относительному и абсолютному количеству DP-клеток; с другой стороны, это *положительные* корреляции по относительному количеству цитотоксических зрелых эффекторов, хелперов центральной и эффекторной памяти, DN-клеток, NK- и NKT-клеток. Структура иммунного ответа контрольных животных свидетельствует о высокой "цене", которую приходится "платить" организму за физическое перенапряжение, связанное с демонстрацией высоких результатов.

Две из трех достоверных корреляций иммунологических показателей крыс группы КА10 с продолжительностью выполнения ими предельной плавательной нагрузки совпадают по знаку и почти совпадают по величине с достоверными корреляциями группы положительного контроля по одному показателю – *относительное* количество двойных негативных клеток; этот показатель имеет положительную корреляцию с продолжительностью плавания в 4-й день и со средним значением за 4 дня. Третья достоверная корреляция группы КА10 выявлена по *абсолютному* количеству двойных негативных клеток, но только применительно к функциональному результату последнего, 4-го дня предельной нагрузки. Таким образом, относительное количество двойных негативных клеток является наиболее чувствительным, но наименее специфичным иммунологическим биомаркером, свидетельствующим о степени физического напряжения животных. Необходимо отметить, что в группе крыс ХА20 не выявлено корреляции с продолжительностью плавания по этому показателю (как и по многим другим) даже на уровне тенденции, в группах КА20, ХА10 и ЭЗЧ+ХА20 корреляции положительные на уровне тенденции, тогда как на противоположном "полюсе" по данному показателю (наиболее выраженные отрицательные значения) находится группа ЭЗЧ, что свидетельствует о позитивном влиянии этого нутрицевтика на состояние клеточного иммунитета животных, выполняющих максимальную для данной группы нагрузку. Наиболее специфичным иммунологическим показателем группы положительного контроля можно считать абсолютное количество двойных позитивных клеток, поскольку этот показатель имеет максимально выраженную отрицательную корреляцию как по результату 4-го дня, так и по среднему значению за 4 дня, притом что в других группах либо нет корреляции этого показателя с продолжительностью плавания, либо имеется тенденция к положительной корреляции (группы ХА20 и ЭЗЧ+КА10). Для группы КА20 наиболее специфичным показателем является абсолютное количество зрелых цитотоксических эффекторов, имеющим положительную корреляцию с функциональным результатом 4-го дня, т.к. в других группах нет достоверных корреляций этого показателя с продолжительностью выполнения физической нагрузки. Относительное количество этих клеток также достоверно коррелирует с показателем продол-

Таблица 1. Корреляция иммунологических показателей с продолжительностью плавания крыс
Table 1. Correlation of immunological parameters with the duration of swimming of rats

Иммунологические показатели Immunological parameters →	Lym, абс. abs.		CD4/CD8		NK, отн. rel.		NKT, отн. rel.		CD4–CD8–, отн. rel.		CD4–CD8–, абс. abs.		CD4+CD8+, отн. rel.		CD4+CD8+, абс. abs.	
Группа Group ↓	4-й 4th	Сред. Av.	4-й 4th	Сред. Av.	4-й 4th	Сред. Av.	4-й 4th	Сред. Av.	4-й 4th	Сред. Av.	4-й 4th	Сред. Av.	4-й 4th	Сред. Av.	4-й 4th	Сред. Av.
(+)контроль (PC)	−0.59*	−0.60*	−0.44	−0.62*	0.33	0.53*	0.34	0.65*	0.78*	0.52*	0.01	−0.13	−0.67*	−0.65*	−0.82*	−0.84*
XA20 (ACl20)	0.31	0.34	0.05	−0.02	−0.08	−0.10	−0.01	0.02	−0.04	−0.18	0.28	0.23	0.27	0.31	0.30	0.36
KA10 (ACr10)	0.37	0.17	−0.16	0.07	0.07	0.04	0.18	0.02	0.60*	0.42*	0.60*	0.35	−0.22	0.04	0.08	0.07
KA20 (ACr20)	0.24	0.16	−0.24	−0.11	0.12	0.18	0.53	0.35	0.46	0.26	0.52	0.43	−0.26	0.07	0.17	0.48
XA10 (ACl10)	0.25	0.32	0.07	−0.04	−0.46	−0.39	−0.29	−0.18	0.43	0.51	0.33	0.43	−0.32	−0.18	0.04	0.21
ЭЗЧ (GTE)	0.07	−0.27	−0.37	0.00	−0.12	−0.39	0.20	−0.09	−0.25	−0.55	0.03	−0.39	0.10	0.14	0.28	0.07
ЭЗЧ + KA10 (GTE+ACr10)	0.41	0.47	0.06	0.00	−0.64	−0.57	−0.08	−0.10	−0.24	−0.19	0.12	0.21	0.26	0.14	0.43	0.36
ЭЗЧ + XA20 (GTE + ACl20)	0.00	−0.02	−0.42	−0.29	0.16	0.05	−0.14	−0.24	0.52	0.66	0.22	0.26	−0.20	−0.13	−0.12	−0.12
Иммунологические показатели Immunological parameters →	Th44–62L+, отн. rel.		Th44–62L+, абс. abs.		Th44+62L+, отн. rel.		Th44+62L–, отн. rel.		Tc44–62L+, отн. rel.		Tc44–62L+, абс. abs.		Tc44–62L–, отн. rel.		Tc44–62L–, абс abs.	
Группа Group ↓	4-й 4th	Сред. Av.	4-й 4th	Сред. Av.	4-й 4th	Сред. Av.	4-й 4th	Сред. Av.	4-й 4th	Сред. Av.	4-й 4th	Сред. Av.	4-й 4th	Сред. Av.	4-й 4th	Сред. Av.
(+)контроль (PC)	−0.78*	−0.66*	−0.70*	−0.74*	0.53	0.70*	0.79*	0.52	−0.60*	−0.70*	−0.50	−0.56*	0.58*	0.60*	0.35	0.40
XA20 (ACl20)	−0.20	−0.16	0.35	0.33	0.17	0.22	0.30	0.29	0.01	−0.04	0.28	0.36	−0.19	−0.17	−0.07	−0.03
KA10 (ACr10)	−0.07	0.02	0.22	0.14	0.09	0.02	−0.04	−0.05	−0.30	−0.14	0.25	0.05	0.20	0.02	0.33	0.08
KA20 (ACr20)	0.07	0.10	0.06	0.14	0.22	0.08	−0.13	−0.18	−0.66	−0.44	0.23	0.25	0.76*	0.58	0.78*	0.59
XA10 (ACl10)	−0.07	−0.21	0.39	0.43	−0.18	0.00	0.18	0.36	0.00	0.14	−0.11	0.00	−0.04	−0.14	0.04	−0.07
ЭЗЧ (GTE)	0.01	0.40	−0.08	−0.07	−0.14	−0.32	−0.11	−0.56	0.05	0.42	0.09	0.05	−0.01	−0.44	−0.08	−0.45
ЭЗЧ + KA10 (GTE + ACr10)	0.32	0.24	0.36	0.33	0.18	0.14	−0.38	−0.33	0.06	0.05	0.32	0.43	−0.12	−0.14	0.29	0.33
ЭЗЧ + XA20 (GTE + ACl20)	−0.30	−0.29	−0.11	−0.14	0.64	0.62	−0.58	−0.57	0.30	0.31	0.14	0.05	−0.30	−0.33	−0.06	−0.14

Приведены данные по тем показателям, у которых имеется достоверная корреляция хотя бы в одной из групп. 4-й: корреляция с продолжительностью плавания в 4-й день предельной нагрузки. Сред.: корреляция со средней продолжительностью плавания за 4 дня предельной нагрузки. * $p < 0.05$. Обозначения групп приведены в тексте.

The data are given for those indicators that have a significant correlation in at least one of the groups. 4th: Correlation with swimming time on day 4 of maximum exercise. Avg.: Correlation with the average swim duration over 4 days of maximum load. * $p < 0.05$. The group designations are given in the text.

жительности плавания 4-го дня, но достоверная корреляция имеется и в группе контроля. Положительная корреляция относительного и абсолютного количества цитотоксических клеток последней стадии дифференцировки, наряду с тенденцией по другим иммунологическим показателям (Tc44–62L+, отн.; CD4–CD8–, отн. и абс.; NKT, отн.), позволяет предположить, что карбонат аммония в дозе 20 мг/кг в наименьшей степени из всех исследованных адаптогенов способствует адаптации к предельной нагрузке в разработанной нами модели принудительного плавания.

Отрицательная корреляция с продолжительностью плавания абсолютного количества лимфоцитов у крыс группы положительного контроля означает, что условные "рекордсмены" этой группы даже через сутки имеют пониженный иммунологический статус. У спортсменов высокой квалификации снижение уровня лимфоцитов наблюдается через 2 ч после предельной физической нагрузки ("окно" восприимчивости к инфекции [25]), восстановление обычно происходит уже через 4 ч, так что пониженный их уровень через сутки свидетельствует о срыве адаптации. Для сравнения – положительная корреляционная зависимость по этому показателю (на уровне статистической тенденции, $p < 0.1$) в группах ХА20, КА10 и ЭЗЧ+КА10. Соотношение Th и Tc (CD4+/CD8+) также понижено у "рекордсменов" группы контроля, однако максимально отрицательная корреляция, как уже было сказано, отмечена по абсолютному количеству DP-клеток, что может свидетельствовать о нарушении созревания Т-клеток в тимусе, но с учетом особенностей экспериментальной модели разумным представляется предположение о дополнительном участии этой минорной фракции в цитотоксических процессах за пределами сосудистого русла [19].

Снижение уровня лимфоцитов, соотношения CD4+/CD8+ и уровня DP-клеток у "рекордсменов" группы контроля компенсируется повышением доли NK-клеток, предназначение которых состоит не только в быстрой атаке на инфицированные клетки, но также в генерации значительного количества INF-γ, который служит стимулом для активации макрофагов и созревания "наивных" хелперов [26], последние, в свою очередь, активируют и/или способствуют дифференцировке Т-киллеров, В-лимфоцитов и моноцитов. Вероятно, результатом этой активации является снижение относительного и абсолютного количества "наивных" Tc-клеток, что сопряжено с повышением относительного и абсолютного количества цитотоксических зрелых эффекторов в группе контроля при попытке "установить рекорд". Важно отметить, что близкая корреляционная зависимость количества этих субпопуляций Tc-клеток с продолжительностью плавания наблюдается у крыс группы КА20 (табл. 1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В разработанной нами модели принудительного плавания максимальное повышение выносливости в течение 4 дней предельной нагрузки демонстрируют крысы групп ХА20 и КА10. Применение ЭЗЧ в самостоятельном виде и в сочетании с эффективными дозами солей аммония не приводит к достоверному повышению средней за 4 дня продолжительности плавания, однако животные группы ЭЗЧ+КА10 в последний день нагрузки показали достоверное повышение продолжительности плавания. Гематологический анализ выявил максимальный уровень эритроцитов у крыс группы ХА10, тогда как минимальный уровень не только эритроцитов, но и тромбоцитов выявлен у крыс группы ЭЗЧ+КА10.

Интенсивная физическая нагрузка не вызвала изменений уровня лейкоцитов, абсолютного количества лимфоцитов, гранулоцитов и моноцитов, относительного и абсолютного количества В-лимфоцитов во всех группах экспериментальных животных относительно интактного (отрицательного) контроля, однако, выявлено

статистически значимое повышение *относительного* количества лимфоцитов у крыс группы КА10 по отношению к группам ХА20, КА20 и ЭЗЧ+ХА20 и понижение *относительного* количества гранулоцитов у крыс этой же группы по отношению к группам ХА10, ХА20 и КА20. Эти изменения свидетельствуют о негативных сдвигах в системе клеточного иммунитета крыс группы КА10, однако, без срыва адаптации.

Статистически значимые отличия выявлены между группами ЭЗЧ+КА10 и ХА20 по относительному и абсолютному количеству NK-клеток, в 2 и 1.5 раза соответственно, в результате повышения относительно контроля уровня NK-клеток в группе ЭЗЧ+КА10 и понижения в группе ХА20. У крыс группы ЭЗЧ + КА10 также повышено относительное количество DN-клеток по отношению к группам положительного контроля, ХА10 и ХА20. Кроме того, в периферической крови крыс группы ЭЗЧ+КА10 выявлено максимальное увеличение по отношению к отрицательному контролю относительного и абсолютного количества NKT-клеток, тогда как в группе ХА20 – максимальное уменьшение их количества. В группах ЭЗЧ+КА10 и ХА20 выявлены разнонаправленные изменения доли "наивных" цитотоксических Т-клеток (уменьшение и увеличение соответственно), а также Тс-клеток эффекторной памяти и зрелых эффекторов (здесь наоборот, увеличение и уменьшение соответственно).

Максимальное увеличение доли "наивных" Т-хелперов выявлено у крыс группы ХА10, максимальное уменьшение их относительного количества – у крыс группы ЭЗЧ+ХА20, хотя у крыс группы ЭЗЧ+КА10 также наблюдается уменьшение, а у крыс группы ХА20 – увеличение, разница между показателями групп статистически значима. Наиболее выраженные отличия найдены по относительному количеству Т-хелперов центральной памяти между группами ЭЗЧ+ХА20 и ЭЗЧ+КА10, с одной стороны (повышенный уровень), и группами положительного контроля, ХА10, ХА20, КА10 и КА20, с другой стороны (пониженный уровень).

Максимальное относительное количество Т-хелперов эффекторной памяти выявлено в группах ЭЗЧ+ХА20 и ЭЗЧ+КА10, минимальное – в группах отрицательного контроля, ХА10 и ХА20, хотя следует особо отметить увеличение абсолютного количества клеток этой субпопуляции хелперов в группе КА10 (достоверные отличия в 2 раза от группы отрицательного контроля, превышающее этот показатель у крыс групп положительного контроля и ЭЗЧ+КА10. В отличие от цитотоксических Т-клеток по количеству Т-хелперов последней стадии дифференцировки (зрелые эффекторы) не выявлено статистически значимой разницы между группами.

Корреляционный анализ функциональных (продолжительность плавания) и иммунологических показателей выявил наибольшее количество статистически значимых корреляций в группе положительного контроля. Наряду с количеством, перечень положительных и отрицательных корреляций свидетельствует о дисбалансе системы клеточного иммунитета контрольных животных при выполнении ими предельной физической нагрузки: это *отрицательные* корреляции по абсолютному количеству лимфоцитов, соотношению CD4+/CD8+, относительному и абсолютному количеству "наивных" хелперов и цитотоксических клеток, относительному и абсолютному количеству двойных позитивных клеток; с другой стороны, это *положительные* корреляции по относительному количеству цитотоксических зрелых эффекторов, хелперов центральной и эффекторной памяти, двойных негативных, естественных киллеров и NKT-клеток. Три статистически значимые корреляции иммунологических показателей крыс группы КА10 совпадают по знаку и почти совпадают по величине с корреляциями группы положительного контроля по относительному и абсолютному количеству двойных негативных клеток, тогда как в группе крыс ХА20 по большинству иммунологических показателей не выявлено корреляций с продолжительностью плавания даже на уровне тенденции.

Наиболее специфичным иммунологическим показателем группы положительного контроля является абсолютное количество двойных позитивных клеток. Данные корреляционного анализа свидетельствуют о том, что ЭЗЧ оказывает позитивное влияние на состояние клеточного иммунитета животных, выполняющих предельную нагрузку, тогда как карбонат аммония в дозе 20 мг/кг в наименьшей степени способствует адаптации к предельной нагрузке.

Полученные нами данные свидетельствует о максимально высокой адаптогенной эффективности хлорида аммония в дозе 20 мг/кг, так как, наряду с высокими функциональными результатами, у животных этой группы не выявлено признаков дезадаптации и дисбаланса иммунитета. Показатели животных группы КА10 свидетельствуют о максимальной мобилизации у них клеточного иммунитета при физической нагрузке, тогда как повышение дозы карбоната аммония в два раза ведет к срыву адаптации. Экстракт зеленого чая не способствует повышению физической работоспособности, однако оказывает в целом позитивное влияние на состояние иммунной системы животных. Наши данные также свидетельствуют о перенапряжении животных группы ЭЗЧ+КА10, в меньшей степени – группы ЭЗЧ+ХА20. Такие сочетания нутрицевтиков не обладают адаптогенными свойствами, т.к. не только не способствуют повышению физической работоспособности крыс, но вызывают активацию у них неспецифического звена клеточного иммунитета, нарушение дифференцировки DN-клеток.

Наши данные подтверждают имеющиеся предположения о том, что нельзя считать любую форму предельной физической нагрузки иммуносупрессивной, при определенных условиях иммунная компетентность может быть повышена [1]. Важно подчеркнуть, что позитивный эффект можно получить без применения допинговых препаратов, но с помощью нутрицевтиков, к которым относятся некоторые конечные продукты метаболизма, считавшиеся еще совсем недавно токсичными.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке госпрограммы № АААА-А18-118012290142-9.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Campbell J.P., Turner J.E.* Debunking the Myth of Exercise-Induced Immune Suppression: Redefining the Impact of Exercise on Immunological Health Across the Lifespan. Front. Immunology. 9: 648. 2018.
2. *Maggini S., Pierre A., Calder P.C.* Immune Function and Micronutrient Requirements Change over the Life Course. Nutrients. 10(10). 2018. pii: E1531.
3. *Teixeira A.M., Rama L., Carvalho H.M., Borges G., Carvalheiro T., Gleeson M., Alves F., Trindade H., Paiva A.* Changes in naïve and memory T-cells in elite swimmers during a winter training season. Brain Behav. Immun. 39: 186–193. 2014.
4. *Goncharov N., Maevsky E., Voitenko N., Novozhilov A., Kubasov I., Jenkins R., Avdonin P.* Nutraceuticals in sports activities and fatigue. In: Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity. *Gupta R.C.* (Ed.). Amsterdam. Acad. Press/Elsevier. 177–188. 2016.
5. *Novozhilov A.V., Tavrovskaya T.V., Voitenko N.G., Maslova M.N., Goncharov N.V., Morozov V.I.* Efficacy of green tea extract in two exercise models. Bull. Exp. Biol. Med. 158(3): 42–345. 2015.
6. *Korf E.A., Kubasov I.V., Novozhilov A.V., Matrosova E.V., Tavrovskaya T.V., Goncharov N.V., Vonsky M.S., Runov A.L., Kurchakova E.V.* Green tea extract increases the expression of genes responsible for regulation of calcium balance in rat slow-twitch muscles under conditions of exhausting exercise. Bull. Exp. Biol. Med. 164(1): 6–9. 2017.
7. *Гончаров Н.В., Миндукшев И.В., Новожилов А.В., Корф Е.А., Тавровская Т.В., Терпиловский М.А., Хмелевской Д.А., Скверчинская Е.А., Кривченко А.И.* Адаптивные биохимические изменения эритроцитов крысы после цикла принудительного плавания с применением экстракта зеленого чая и аммонийного прекондиционирования. Рос. физиол. журн. 104(12): 1428–1441. 2018. [*Goncharov N.V., Mindukshev I.V., Novozhilov A.V., Korf E.A., Tavrovskaya T.V., Terpilovsky M.A., Khmelevskoy D.A., Skverchinskaya E.A., Krivchenko A.I.* Adaptive biochemical changes of rat erythrocytes after the cycle of forced swimming with the use of green tea extract and ammonium preconditioning. Russ. J. Physiol. 104(12): 1428–1441. 2018. (In Russ)].

8. *Baidyuk E.V., Sobolev V.E., Korf E.A., Mindukshev I.V., Krivchenko A.I., Goncharov N.V.* Ultrastructural Characteristics of Slow and Fast Twitch Muscle Fibers of Rats after a Forced Swimming Cycle against a Background of Introduction of Green Tea Extract and Ammonium Salts. Cell and Tissue Biol. 14(1): 65–73. 2020.

9. *Korf E.A., Mindukshev I.V., Novozhilov A.V., Krivchenko A.I., Goncharov N.V.* Ammonium Salts Increase Physical Performance and Reduce Blood Lactate Level in Rats in a Model of Forced Swimming. Bull. Exp. Biol. Med. 168(5): 610–613. 2020.

10. *Novozhilov A.V., Mindukshev I.V., Korf E.A., Krivchenko A.I., Goncharov N.V.* Ammonium salts promote the functional adaptation of rat erythrocytes in the model of forced swimming. Bull. Exp. Biol. Med. 168(4): 444–448. 2020.

11. *Greenham G., Buckley J.D., Garrett J., Eston R., Norton K.* Biomarkers of Physiological Responses to Periods of Intensified, Non-Resistance-Based Exercise Training in Well-Trained Male Athletes: A Systematic Review and Meta-Analysis. Sports Med. 48(11): 2517–2548. 2018. https://doi.org/10.1007/s40279-018-0969-2

12. *Squier M.K., Sehnert A.J., Cohen J.J.* Apoptosis in leukocytes. J. Leukoc. Biol. 57(1): 2–10. 1995.

13. *Marchi N., Johnson A.J., Puvenna V., Johnson H.L., Tierney W., Ghosh C., Cucullo L., Fabene P.F., Janigro D.* Modulation of peripheral cytotoxic cells and ictogenesis in a model of seizures. Epilepsia. 52(9): 1627–1634. 2011.

14. *Gustafson M.P., DiCostanzo A.C., Wheatley C.M., Kim C.H., Bornschlegl S., Gastineau D.A., Johnson B.D., Dietz A.B.* A systems biology approach to investigating the influence of exercise and fitness on the composition of leukocytes in peripheral blood. J. Immunother. Cancer. 5: 30. 2017.
https://doi.org/10.1186/s40425-017-0231-8

15. *Timmons B.W., Cieslak T.* Human Natural Killer Cell Subsets and Acute Exercise: A Brief Review. Exerc. Immunol. Rev. 14: 8–23. 2008.

16. *Terra R., Gonçalves da Silva S.A., Pinto V.S., Dutra P.M.L.* Effect of exercise on immune system: response, adaptation and cell signaling. Rev. Bras. Med. Esporte. 18(3): 208–214. 2012.

17. *Nascimbeni M., Pol S., Saunier B.* Distinct CD4+ CD8+ double-positive T cells in the blood and liver of patients during chronic hepatitis B and C. PLoS One. 6(5): e20145. 2011.

18. *de Meis J., Aurélio Farias-de-Oliveira D., Nunes Panzenhagen P.H., Maran N., Villa-Verde D.M., Morrot A., Savino W.* Thymus atrophy and double-positive escape are common features in infectious diseases. J. Parasitol. Res. 2012: 574020. 2012.

19. *Overgaard N.H., Jung J.W., Steptoe R.J., Wells J.W.* CD4+/CD8+ Double-Positive T Cells: More Than Just a Developmental Stage? J. Leukoc. Biol. 97(1): 31–38. 2015.
https://doi.org/10.1189/jlb.1RU0814-3822015

20. *Kim H.P., Imbert J., Leonard W.J.* Both Integrated and Differential Regulation of Components of the IL-2/IL-2 Receptor System. Cytokine Growth. Factor Rev. 17(5): 349–366. 2006.
https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2006.07.003

21. *Barnett J.B.* Consequences of Blocking the Choreography of Double Negative Thymocyte Maturation. In: Signaling Mechanisms Regulating T Cell Diversity and Function. J. Soboloff & D.J. Kappes (Eds.). Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis. Chapter 1. PMID: 30427639 NBK532331 2018.
https://doi.org/10.1201/9781315371689-1

22. *Савченко А.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Мошев А.В.* Роль Т- и В-клеточного иммунитета в патогенезе онкологических заболеваний. Вопр. онкологии. 61(6): 867–875. 2015. [*Savchenko A.A., Borisov A.G., Kudryavtsev I.V., Moshev A.V.* Role of t- and b-cell immunity in the pathogenesis of cancer. Problems in Oncology. 61(6): 867–875. 2015. (In Russ)].

23. *Wang R., Chen P.J.* Modulation of Dendritic Cells and NKT Cells by Excessive Exercise in Rats. J. Med. Biol. Engineering. 29(4): 190–194. 2009.

24. *Wang R., Chen P.* Modulation of NKT Cells and Th1/Th2 Imbalance After alpha-GalCer Treatment in Progressive Load-Trained Rats. Int. J. Biol. Sci. 5(4): 338–343. 2009.
https://doi.org/10.7150/ijbs.5.338

25. *Kakanis M.W., Peake J., Brenu E.W., Simmonds M., Gray B., Hooper S.L., Marshall-Gradisnik S.M.* The Open Window of Susceptibility to Infection After Acute Exercise in Healthy Young Male Elite Athletes. Exerc. Immunol. Rev. 16: 119–137. 2010.

26. *Vivier E., Raulet D. H., Moretta A., Caligiuri M. A., Zitvogel L., Lanier L. L., Yokoyama W. M., Ugolini S.* Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. Science. 331(6013): 44–49.2011.
https://doi.org/10.1126/science.1198682011

Immunological and Functional Indicators of Rats in a Forced Swimming Model with the Application of Potential Adaptogens

N. V. Goncharov[a, b, *], E. A. Korf[a], I. V. Kudryavtsev[c, d], M. K. Serebryakova[c], A. V. Novozhilov[a], and I. V. Mindukshev[a]

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

[b] *Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Leningrad Region, pos. Kuzmolovsky, Russia*

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

[d] *Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia*

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

The aim of the work was to study the effect of different doses of two ammonium compounds, chloride (ClA) and carbonate (CrA), as well as their combination with decaffeinated green tea extract (GTE) on the immunological parameters of the peripheral blood of rats during high-intensity exercise. Changes in the absolute and relative numbers of granulocytes, lymphocytes, natural killer cells, naive and mature effector cells, as well as some minor lymphocyte fractions, were established using a hematological analyzer and a flow cytometer one day after the end of the forced swimming cycle. Immunological parameters were compared with the duration of swimming on the last day of the cycle and with the average duration over 4 days of maximum load. The revealed changes indicate a high adaptogenic effectiveness of ClA at a dose of 20 mg/kg, since the animals of this group showed high functional results and they did not show signs of maladjustment and overstrain of immunity. CrA at a dose of 10 mg/kg led to a similar increase in functional results, but this was accompanied by the mobilization of the cellular immune response in rats. Doubling the dose of CrA led to a failure of adaptation. GTE did not contribute to an increase in physical performance, however, it had a positive effect on the state of the immune system of animals. The combination of GTE with ammonium salts did not lead to a significant improvement of the functional indicators, and, in general, had a negative effect on cellular immunity of animals of the GTE+CrA10 group, and, to a lesser extent, of the GTE+ClA20 group.

Keywords: physical exercise, adaptation, rats, nutraceuticals, green tea extract, ammonium, immunity

ЦИТИРОВАТЬ:

Гончаров Н.В., Корф Е.А., Кудрявцев И.В., Серебрякова М.К., Добрылко И.А., Новожилов А.В., Миндукшев И.В. Иммуннологические и функциональные показатели крыс в модели принудительного плавания с применением потенциальных адаптогенов. Рос. физиол. журн.им. И.М. Сеченова. 106(11): 1350–1369.

DOI:10.31857/S0869813920110060

TO CITE THIS ARTICLE:

Goncharov N.V., Korf E.A., Kudryavtsev I.V., Serebryakova M.K., Novozhilov A.V., Mindukshev I.V. Immunological and Functional Indicators of Rats in a Forced Swimming Model with the Application of Potential Adaptogens. Russian Journal of Physiology. 106(11): 1350–1369.

DOI:10.31857/S0869813920110060

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 11, с. 1370–1384

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ДИНАМИКА ПАРАМЕТРОВ МАЛОАМПЛИТУДНЫХ ДВИЖЕНИЙ РУК ПРИ ПОВТОРЯЮЩЕЙСЯ ДВИГАТЕЛЬНО-КОГНИТИВНОЙ ЗАДАЧЕ

© 2020 г. Н. Д. Бабанов[1, *], Е. А. Бирюкова[2], Э. Р. Джелдубаева[2], С. А. Махин[2], Е. Н. Чуян [2], О. В. Кубряк[1]

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

[2]Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Россия

*****E-mail: n.babanov@nphys.ru*

Поступила в редакцию 11.05.2020 г.
После доработки 20.07.2020 г.
Принята к публикации 08.09.2020 г.

В отличие от развития мышечных адаптаций, связанных с перенапряжением, недостаточным растяжением, перегрузкой и недогрузкой, небольшие по длительности курса и нагрузке двигательно-когнитивные тренировки вызывают адаптации, связываемые с нервными перестройками, исследование которых представляет большой интерес. При этом данное направление остается недостаточно исследованным, на что указывают, например, эмпирический подбор режима двигательной активности при медицинской реабилитации, сложности построения прогноза и оценки реабилитационного потенциала. 25 здоровым предварительно обученным добровольцам предлагалось с помощью усилия руки на неподвижный джойстик управлять меткой на экране с целью исследования степени выполнения инструкции и силовых характеристик малоамплитудных управляющих движений. С помощью закрепленного на силовой платформе джойстика оценивались параметры траектории центра давления на опору, вертикальная сила и внешний результат (степень выполнения инструкции по средней длительности отработки единичного результата) при выполнении стандартной задачи со зрительной обратной связью, выполняемой трехкратно каждой рукой, последовательно в течение 4 дней (краткого курса тренировок). Полученные данные анализировались стандартными математическими методами. Наиболее быстро, уже ко 2-му сеансу, достигался стабильный уровень выполнения инструкции. При этом оптимизация силы вертикального надавливания происходила в течение всего курса, а оптимизация управления в плоскости опоры имела более сложный характер. Условно “оптимизация” моторного контроля (для данного периода наблюдения), адаптивные процессы происходили неравномерно для условно различных аспектов управления: достижения оптимальной результативности, выбора вертикального усилия и манипулирования усилием в плоскости опоры. Быстрое улучшение результатов выполнения инструкции предположительно связано с оптимизацией стратегии. Более сложной представлялась задача оптимизации вертикального усилия на джойстик, а наиболее сложной – управление силой рук в плоскости опоры, что может быть связано с отношением этого к более поздней стадии обучения.

Ключевые слова: моторный контроль, мануальное управление, малоамплитудные движения, обучение, мышечные адаптации, двигательно-когнитивная задача, функциональная система

DOI: 10.31857/S0869813920110035

Актуальная физиологическая проблема – исследование быстрых адаптивных процессов сложной системы моторного контроля (например, [1, 2]). Хорошо известны мышечные адаптации при механической нагрузке, которые базируются на

четырех аспектах: перенапряжение, недостаточное растяжение, перегрузка и недогрузка [3]. Например, на макроуровне – в ответ на перегрузку мышца увеличивает площадь поперечного сечения, чтобы компенсировать величину перегрузки, а в субклеточном масштабе происходит добавление саркомеров, которые образуют дополнительные миофибриллы для увеличения общей площади поперечного сечения мышцы – наиболее выраженно это происходит в течение примерно 10 недель. Или, в контексте постепенного прироста саркомеров в ответ на хроническое растяжение – число саркомеров постепенно увеличивается, чтобы уменьшить растяжение саркомера и перевести мышцу в оптимальный режим работы, примерно в течение 10–15 дней [3]. Иными словами, адаптивные процессы такого рода не мгновенны и обычно предполагают наличие воздействий на мышцу в течение определенного времени, а в реальной практике длительность курса тренировок и сами отдельные занятия могут занимать относительно небольшое время, иметь малую нагрузку и число повторений. Например, общая длительность двигательной реабилитации стационарного этапа постинсультного восстановления сегодня обычно составляет 10–30 ч за весь курс [4]. Число двигательно-когнитивных тренингов, не предполагающих большой нагрузки на мышцы, на стационарном этапе может составлять 8–10 достаточно кратких (несколько минут) занятий [5]. Нагрузка на мышцы здесь обычно относительно невелика, учитывается состояние, возможности пациента. Иными словами, достижение целевой функциональности (моторного контроля) на достаточно кратком отрезке времени, вероятно, достигается не столько за счет обычно исследуемых мышечных адаптаций, сколько за счет нервных перестроек, изменений в системе управления движением, обучения [6].

На наш взгляд, рассмотрение развивающихся адаптаций как проявления активности сложных систем, чья регуляция часто не сводится к мышечным перестройкам, представляет до сих пор недостаточно оцененный исследователями ресурс. Это касается давних системных представлений, получивших большое развитие в отечественной физиологической школе, и также развиваемой нами (в том числе, [6]). Например, по П.К. Анохину (1955), в контексте “общих принципов компенсации” предлагаются следующие принципы: (1) “принцип сигнализации дефекта”; (2) “принцип прогрессивной мобилизации компенсаторных механизмов”; (3) “принцип непрерывного обратного афферентирования компенсаторных приспособлений”; (4) “принцип санкционирующей афферентации”; (5) “принцип относительной устойчивости компенсаторных приспособлений” [7]. Какие тонкие физиологические механизмы лежат в основе принципов “компенсации”, в том числе, вне “дефекта”? На наш взгляд, вопрос и сегодня остается актуальным. Не только для медицинской реабилитации или спорта, но в других сферах при обучении тонким ручным операциям, например, при подготовке врачей-эндоскопистов [8]. Следует отметить, что сам П.К. Анохин указывал, что “...на ряде экспериментальных моделей было показано отсутствие какого-либо принципиального отличия между аппаратами и механизмами, включающимися при любом затруднении функции в нормальных условиях, и аппаратами и механизмами, включающимися при нарушении функций в результате травмы, болезни или оперативного вмешательства. Этим обобщением закрывается пропасть между понятием "пластичности”, очень часто применяемым к изменчивости функций нормального организма, и понятием компенсации, имеющим преимущественное распространение при оценке патологических нарушений функций. Установление принципиального единства между этими областями изменения функций совершенно понятно на физиологическом основании” [7].

В этом ключе сегодня проводятся различные исследования, которые могут быть полезны для изучения системных аспектов. Например, рассматриваются различные нейронные механизмы моторного обучения и переноса функциональности к контрлатеральной конечности [9]. На периферическом уровне (в исследовании динамики активности мышц-сгибателей и разгибателей рук) ранее описана оптими-

зация моторного контроля, отображенная в изменениях соотношений биоэлектрической активности мышц на одной руке и между правой и левой [10]. Исследуются совместные движения верхних и нижних конечностей, которые рассматриваются в качестве эффективного метода активации нейронных сетей, связывающих генераторы ритмики рук и ног, что также может иметь значение в подготовке восстановительных методик и новых способов оценки моторного контроля.

В прикладном плане острой проблемой остается поиск и отбор концептуальных и конкретных методических решений, с помощью которых можно было бы надежно оценить эффективность, дать прогноз и определить необходимую "дозу" двигательной нагрузки, тренинга, например, в медицинской реабилитации [4]. В случае исследования быстрых приспособительных механизмов перспективным направлением является использование "двойных" двигательно-когнитивных задач (например, по типу оригинального варианта с управлением балансом тела, изучения многозадачности [11]). "Двойные" двигательно-когнитивные задачи, как предполагается, могут быть информативным способом для оценки особенностей когнитивной функции [12], в том числе, в рамках известных концепций параллельной обработки информации с конкуренцией за ресурсы, "бутылочного горлышка" и других [11]. И, в этом контексте, моторные компоненты могут отражать особенности управления, а анализ внешнего результата (выполнения инструкции) – когнитивные характеристики. Распространенный подход для исследований такого направления часто предполагает воздействие рукой на управляющую рукоять, требующее приложения определенной силы (варианты процедур по типу "force field learning"). При этом задаются характеристики рукояти – например, ограничения по числу степеней свободы, оценивается степень выполнения инструкции [12]. Перспективной методикой нам представляется использование полностью неподвижной рукояти – силового джойстика, реагирующего на силу надавливания [6]. Интересным аспектом, обусловленным неподвижностью рукояти, здесь представляется использование только изометрических и малоамплитудных движений испытуемого, поскольку в этом случае результат управляющего действия (эфферентация), вероятно, может быть выделен наиболее точно за счет исключения влияний замахов, инерции и других возможных дополнительных факторов. Кроме того, снижение амплитуды движений или физическая возможность только "обозначений" движения характерно для различной патологии, что придает такому аспекту важный практический смысл. Небольшое число повторений (несколько кратких сеансов управления) в задаче несильного надавливания на неподвижную рукоять минимизирует развитие мышечных адаптаций по типу описанных [13].

С учетом вышесказанного, в описываемой работе перед нами стояла цель с помощью неподвижного силового джойстика исследовать степень выполнения инструкции (внешний результат) в двигательной задаче с визуальной обратной связью и силовые характеристики малоамплитудных управляющих движений (надавливаний рукой на джойстик) у группы здоровых добровольцев на протяжении краткого курса, минимизирующего, таким образом, развитие мышечных адаптаций.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Наблюдение выполнялось на базе Центра коллективного пользования "Экспериментальная физиология и биофизика" кафедры физиологии человека и животных и биофизики Таврической академии (СП) ФГАОУ ВО "Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского", с использованием штатного оснащения и оборудования Центра. Соблюдались современные этические нормы согласно требованиям локальной этической комиссии, в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации и ГОСТ Р 56509-2015 "Услуги населению. Надлежащая практика гуманитарных исследований".

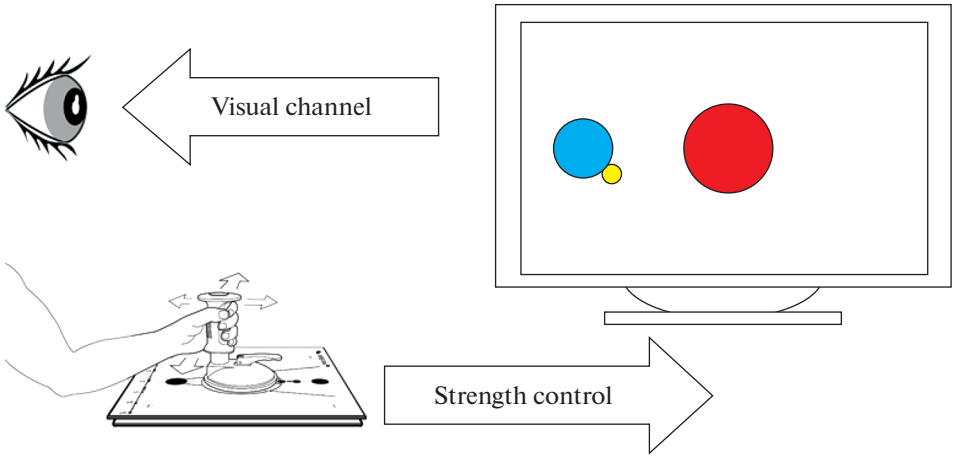


Рис. 1. Условная схема процедуры.

Fig. 1. Conditional scheme of the procedure.

Испытуемые. 25 условно здоровых молодых праворуких мужчин-добровольцев 18–25 лет, студенты университета. Ведущую руку определяли с помощью теста “ведущая рука” [15]. Определение размера выборки – согласно представлениям о достаточности при повторяющихся измерениях.

Оборудование и программное обеспечение. Силовая платформа ST-150 с экраном зрительной обратной связи размером диагонали 24″, под управлением штатной программы STPL, с джойстиком SDB-17 – Мера-ТСП, Россия, N ФСР 2010/07900; RU.C.39.004.A N 41201; GMDN: 43114 Balance/mobility management system platform, 43115 Balance/mobility management system application software.

Процедура. Испытуемый располагался сидя перед экраном зрительной обратной связи, локоть в стандартном положении, кисть обхватывает рукоять неподвижного силового джойстика. Согласно инструкции требовалось надавливать на джойстик, который реагировал на силу надавливания, для перемещения метки центра давления на опору сообразно отображаемой на экране ситуации (рис. 1). Кисть руки располагалась на джойстике стандартным обхватом, задаваемым формой рукояти, стандартизованной для всех позицией тела (стол и стул), а также стандартизованной позицией локтя – по разметке на столе. Цель – захватить как можно больше мишеней во время теста. Для реализации процедуры использовался стандартный тест “Динамическая проба” в штатной программе STPL, соответственно ранее описанному [6]. Контроль времени и начало – по голосовой команде компьютерной программы. На экране перед испытуемым (рис. 1) по периметру центрального круга (исходная позиция метки центра давления) появлялись круглые мишени, на которые необходимо наводить метку, производить кратковременное удержание на мишени до ее исчезновения и возвращаться в центральный круг для продолжения (появления новой мишени). Сила надавливания по заданным условиям наблюдения должна была составлять не менее 10 Н для возможности выполнения теста.

Добровольцам после инструктажа и ознакомительного теста проводилось по 1 сеансу в течение 4 последовательных дней недели, в первой половине дня, в стандартизованных условиях, вне ощущений голода, жажды и тому подобное. Один сеанс состоял из 3 одинаковых последовательных минутных тестов для каждой руки (всего 6 тестов для обеих рук), с минутным отдыхом в промежутках.

Анализируемые показатели. В процессе выполнения задачи испытуемым в программе STPL регистрировались вертикальная сила давления на платформу, полная траектория движения центра давления в плоскости опоры, внешний результат (успешность выполнения инструкции). Сила давления на опору – величина, отображающая усредненную за период вертикальную нагрузку на силовую платформу, создаваемую испытуемым при надавливании на джойстик (P), в Ньютонах (H). Внешний результат – среднее за период время отработки цельного фрагмента задания, перемещения управляемой метки центра давления от начального положения в центре на мишень до ее исчезновения и возврата в исходную позицию, в секундах (Tr, c). По данным от силовой платформы оценивалась общая длина (в миллиметрах, L, мм) траектории центра давления (статокинезиограммы) за период. Также использовался интегральный параметр статокинезиограммы, рассчитываемый в Джоулях, по общей формуле:

$$A = m\sum_{1}^{n}\frac{\left|Vx_{i+1}^{2} - Vx_{i}^{2}\right| + \left|Vy_{i+1}^{2} - Vy_{i}^{2}\right|}{2},$$

где знаком V обозначены соответствующие значения мгновенных скоростей центра давления по обеим осям в плоскости опоры. Данный параметр является исключительно характеристикой статокинезиограммы, рассчитывается с использованием всех измеренных за период дискретных значений координат общего центра давления на плоскость опоры и, в отличие от показателя общей длины статокинезиограммы (L), учитывает еще и ее форму, что повышает чувствительность и точность оценки [17]. В описании использовался интегральный показатель, рассчитываемый как отношение этого параметра к единице времени – миллиджоулей в секунду (Av, мДж/с), рассчитываемый в штатной программе STPL.

Статистический анализ. Статистическое описание исследуемых показателей – робастные характеристики: медиана, квартили. Сравнение значимости различий нескольких выборок – непараметрический аналог ANOVA, критерий Фридмана. Сравнение значимости и направленности различий парных выборок – критерий Вилкоксона. Корреляционный анализ выполнен по методу ранговой корреляции Спирмена. Принятый уровень значимости $\alpha = 0.05$. Расчеты, подготовка таблиц и графиков производились в MS Excel 2010 и SPSS 17.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выполнение инструкции. Усредненная по выборке успешность выполнения инструкции, оцениваемая по среднему времени отработки одной мишени за время теста (Tr, c), была близка при выполнении обеими руками – около 0.7–0.8 с. Для выполнения задания левой рукой мода значений показателя Tr из 300 вариантов (12 выполненных тестов у 25 испытуемых) составила 0.78 с, где Me = 0.81 (0.66; 1.11), максимум – 22.48, минимум – 0.47 с. Для правой руки: мода 0.72; Me = 0.78 (0.48; 1.11); максимум – 26.69; минимум – 0.48 с.

На рис. 2 представлена обобщенная групповая характеристика показателя (Tr, c) в исследуемой выборке для обеих рук.

Применение критерия Фридмана указало на значимое различие при анализе подходов испытуемых на протяжении всех сеансов (12 тестов) для левой ($\chi^2 = 118$, $p < 0.001$) и правой руки ($\chi^2 = 58$, $p < 0.001$).

При применении критерия Фридмана внутри сеансов (по 3 теста) значимое различие было получено: для левой руки в 3-м ($\chi^2 = 33$, $p < 0.001$) и 4-м ($\chi^2 = 34$, $p < 0.001$) сеансах; для правой руки в 4-м ($\chi^2 = 7$, $p = 0.029$) сеансе.

Групповая динамика в течение последовательных сеансов – сравнение с результатом (Tr, c) 1-го теста 1-го сеанса соответствующей руки, взятого за 100%, с при-

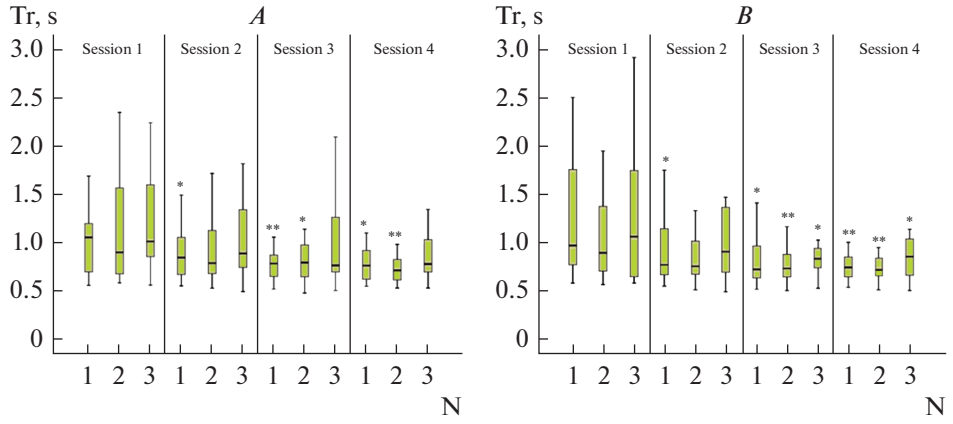


Рис. 2. Обобщенная групповая характеристика выполнения инструкции. “Box Plot” – медиана и квартили (отмечены прямоугольником с меткой), выбросы показателя внешнего результата (Tr, секунды) для левой (*A*) и правой (*B*) рук в группе добровольцев. Звездочками отмечены статистически значимые характеристики, одна звездочка – при $\alpha = 0.05$, две – при $\alpha = 0.001$. Вертикальными линиями отделены последовательные сеансы наблюдения (N), где цифрами на горизонтальной оси обозначены порядковые номера выполнения теста.

Fig. 2. Generalized group characteristic of instruction execution. “Box Plot” – median and quartiles (marked with a rectangle with a label), outliers of the external result parameter (Tr, seconds) indicator for the left (*A*) and right (*B*) hands in the group of volunteers. Asterisks indicate statistically significant characteristics, one asterisk for $\alpha = 0.05$, and two for $\alpha = 0.001$. Vertical lines separate consecutive observation sessions (N), where numbers on the horizontal axis indicate the ordinal numbers of the test execution.

нятым уровнем значимости $\alpha = 0.05$. Левая рука: в 1-м тесте 2-го сеанса уменьшилось на 6%; в 1-м тесте 3-го сеанса уменьшилось на 13%; в 1-м тесте 4-го сеанса уменьшилось на 16%; во 2-м, 3-м и 4-м сеансах для 2-го теста снизилось на 13, 12 и 21% соответственно; в 3-м тесте 2-го сеанса значимых различий нет; в 3-м тесте 3-го сеанса снижение на 25%; в 3-м тесте 4-го сеанса снижение на 23%. Правая рука: в 1-м тесте сеансов 2, 3 и 4 снижение на 21, 26 и 24% соответственно; во 2-м тесте 2-го сеанса значимых различий нет; во 2-м тесте дней 3 и 4 снижение на 19 и 21% соответственно; в 3-м тесте 2-го сеанса значимых различий нет; в 3-м тесте дней 3 и 4 снижение на 22 и 20% соответственно.

Групповая динамика результативности (Tr, с) в течение одного отдельного сеанса, от 1-го теста соответствующей руки, принятого за 100%, с принятым уровнем значимости $\alpha = 0.05$. Для левой руки: в 1-м и во 2-ом сеансах значимых различий нет; в 1-м тесте 3-го сеанса значимых различий нет; в 3-м тесте 3-го сеанса снижение на 3%; в 4-м сеансе значимых различий нет. Для правой руки: в 1-м сеансе значимых различий нет; во 2-м тесте 2-го сеанса значимых различий нет; в 3-м тесте 2-го сеанса уменьшение на 3%; в 4-м сеансе значимых различий нет.

Таким образом, на основании вышесказанного можно отметить, что при управлении обеими руками в целом здесь достигался близкий результат с лучшими показателями для ведущей (правой). Преимущественно в течение первых двух сеансов наблюдалось некоторое улучшение выполнения соответствующего по порядку исполнения теста испытуемыми, в большей степени стабилизируясь к 3-му сеансу, на уровне, близком для обеих рук. При этом в течение одного сеанса различия в успешности выполнения последовательных тестов (в целом по выборке), как правило, были не так заметны.

Таблица 1. Примеры индивидуальных значений прилагаемой силы (Н)
Table 1. Examples of individual values of applied force (N)

Рука Hand	Левая Left			Правая Right		
Сеанс\Тест Session\Test	1	2	3	1	2	3
Испытуемый KU Subject KU						
1	49	42	38	39	41	37
2	40	51	40	39	38	38
3	50	40	38	47	43	41
4	49	41	41	52	45	41
Испытуемый BU Subject BU						
1	63	49	48	48	49	44
2	81	62	68	84	68	57
3	46	46	42	45	46	43
4	46	40	40	42	42	40

Сила вертикального надавливания рукой на джойстик. В целом по выборке усредненные за период значения вертикальной силы надавливания на джойстик в данных условиях групп варьировались вокруг значения около 40 Н, что, таким образом, можно считать здесь условной нормой. Для левой руки мода значений из 300 вариантов (12 выполненных тестов у 25 испытуемых) составила ровно 40 Н, где Me = 41 (39; 45), минимум – 25, максимум – 98 Н. Для правой руки - мода 39 Н, где Me = 41 (39; 45), минимум – 30, максимум – 89 Н. В табл. 1 представлены примеры индивидуальных значений анализируемого показателя.

Применение критерия Фридмана указало на значимое различие при анализе подходов испытуемых на протяжении всех сеансов (12 тестов) для левой ($\chi^2 = 48$, $p < 0.001$) и правой руки ($\chi^2 = 51$, $p < 0.001$).

При применении критерия Фридмана внутри сеансов (по 3 теста) значимое различие было получено: для левой руки в 1-м ($\chi^2 = 7$, $p = 0.030$), во 2-м ($\chi^2 = 10$, $p = 0.008$), в 3-м ($\chi^2 = 8$, $p = 0.020$) и 4-м ($\chi^2 = 13$, $p = 0.002$) сеансах; для правой руки в 1-м ($\chi^2 = 9$, $p = 0.009$), во 2-м ($\chi^2 = 27$, $p < 0.000$), в 3-м ($\chi^2 = 15$, $p = 0.001$) и 4-м ($\chi^2 = 11$, $p = 0.005$) сеансе.

Детальное исследование групповой динамики проводилось аналогично сравнениям для внешнего результата, с принятым уровнем значимости $\alpha = 0.05$. Прослеживалась динамика от 1-го сеанса к последующим, по порядковым номерам тестов. Левая рука: для тестов 1 и 2 значимых различий нет; в 3-м тесте для 2-го и 3-го сеансов значимых различий нет; в 3-м тесте 4-го сеанса снижение на 5%. Для правой руки: в 1-м тесте для 2-го и 3-го сеансов значимых различий нет; в 1-м тесте 4-го сеанса снижение на 5%; во 2-м тесте значимых различий нет; в 3-м тесте для 2-го и 3-го сеансов значимых различий нет; в 3-м тесте 4-го сеанса снижение на 2%.

Внутри одного сеанса, относительно 1-го теста, групповая динамика с принятым уровнем значимости $\alpha = 0.05$. Левая рука: есть значимое различие во 2-м тесте 1-го сеанса; в 3-м тесте 1-го сеанса снижение на 2%; во 2-м тесте 2-го сеанса значимых различий нет; в 3-м тесте 2-го сеанса снижение на 11%; в 3-м сеансе значимых различий нет; во 2-м тесте 4-го сеанса значимых различий нет; в 3-м тесте 4-го сеанса есть значимое различие. Для правой руки: во 2-м тесте 1-го сеанса снижение на 4%; в 3-м тесте 1-го сеанса снижение на 7%; во 2-м тесте 2-го сеанса снижение на 2%; в 3-м тесте 2-го сеанса снижение на 5%; во 2-м тесте 3-го сеанса снижение

на 2%; в 3-м тесте 3-го сеанса снижение на 7%; во 2-м тесте 4-го сеанса значимых различий нет; в 3-м тесте 4-го сеанса снижение на 2%.

Анализ групповой динамики указывает, что сила надавливания, как правило, от сеанса к сеансу немного уменьшалась. Внутри одного сеанса преимущественно наблюдалось небольшое снижение силы надавливания к последнему тесту для ведущей (правой) руки. При этом в целом за все проведенные тесты управление ведущей (правой) рукой подразумевало несколько более тонкое управление, что проявлялось в несколько меньших значениях силы надавливания на джойстик (медианные значения для обеих рук приведены выше).

Отображение усилий рук в плоскости опоры. Поскольку общий рисунок движения и рабочее пространство при выполнении двигательно-когнитивной задачи были исходно заданы (программой), то отличия касались особенностей, которые оценивались отдельно по длине (L, мм) статокинезиограммы и по ее интегральной характеристике (Av, мДж/с). Групповые характеристики показателя L: для левой руки из 300 значений (12 выполненных тестов у 25 испытуемых) Me = 3056 (2784; 3541); минимум – 1429; максимум – 8913 мм. Для правой руки: Me = 3090 (2769; 3577); минимум – 1931; максимум – 17127 мм. Групповые характеристики показателя Av: для левой руки из 300 значений (12 выполненных тестов у 25 испытуемых) Me = = 5960 (4116; 10784); минимум – 1005; максимум – 155056 мДж/с. Для правой руки: Me = 6422 (4188; 11134); минимум – 1284; максимум – 345815 мДж/с.

Применение критерия Фридмана указало на значимое различие при анализе подходов испытуемых на протяжении всех сеансов (12 тестов): для левой руки ($\chi^2 = 31$, $p = 0.001$) и правой ($\chi^2 = 48$, $p < 0.001$).

При применении критерия Фридмана внутри сеансов (по 3 теста) значимое различие было получено для левой руки в 3-м ($\chi^2 = 6$, $p = 0.042$) сеансе; для правой руки в 1-м ($\chi^2 = 8$, $p = 0.022$), во 2-м ($\chi^2 = 17$, $p < 0.001$), в 3-м ($\chi^2 = 10$, $p = 0.008$) и 4-м ($\chi^2 = 10$, $p = 0.007$) сеансе.

Дальнейший анализ представлен здесь по показателю Av, как более контрастному. На рис. 3 представлена обобщенная групповая характеристика показателя в исследуемой выборке для обеих рук.

Описание групповой динамики проводилось аналогично предыдущим, с принятым уровнем значимости $\alpha = 0.05$. Левая рука в 1-м тесте 1-го сеанса – Me = 4660 (3961; 9748) мДж/с; со 2-м тестом 1-го сеанса значимых различий нет; в 3-м тесте 1-го сеанса увеличение на 70%; в 1-м и 2-м тесте 2-го сеанса значимых различий нет; в 3-м тесте 2-го сеанса увеличение на 24%; в 3-м сеансе значимых различий нет; в 1-м и 2-м тесте 4-го сеанса значимых различий нет; в 3-м тесте 4-го сеанса увеличение на 78%. Правая рука в 1-м тесте 1-го сеанса – Me = 5753(3861; 12304) мДж/с; во 2-м и 3-м тесте первого сеанса значимых различий нет; в 1-м тесте 2-го сеанса снижение на 38%, в остальных случаях значимых различий нет.

Внутри одного сеанса, относительно 1-го теста, групповая динамика с принятым уровнем значимости $\alpha = 0.05$. Левая рука: во 2-м тесте 1-го сеанса значимых различий нет; в 3-м тесте 1-го сеанса увеличение на 76% ($p < 0.05$); во 2-м тесте 2-го сеанса увеличение на 14%; в 3-м тесте 2-го сеанса увеличение на 3%; во 2-м тесте 3-го сеанса значимых различий нет; в 3-м тесте 3-го сеанса увеличение на 19% ($p < 0.05$); во 2-м тесте 4-го сеанса значимых различий нет; в 3-м тесте 4-го сеанса увеличение на 56%. Для правой руки: в 1-м сеансе значимых различий нет; во 2-м тесте 2-го сеанса увеличение на 80%; в 3-м тесте 2-го сеанса увеличение на 63%; во 2-м тесте 3-го сеанса увеличение на 16%; в 3-м тесте 3-го сеанса увеличение на 67%; во 2-м тесте 4-го сеанса значимых различий нет; в 3-м тесте 4-го сеанса увеличение на 40%.

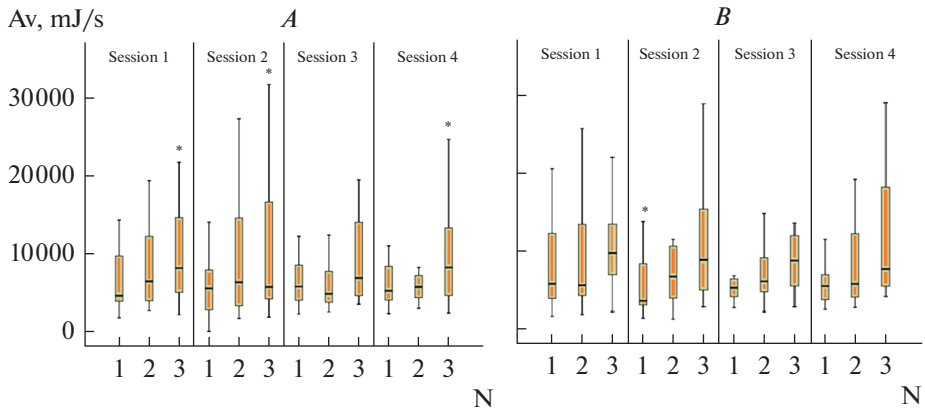


Рис. 3. Обобщенная групповая характеристика управления джойстиком в плоскости силовой платформы. "Box Plot" – медиана и квартили (отмечены прямоугольником с меткой), выбросы интегрального показателя (Av, мДж/с) для левой (*A*) и правой (*B*) рук в группе добровольцев. Звездочкой отмечены статистически значимые характеристики при $\alpha = 0.05$. Вертикальными линиями отделены последовательные сеансы наблюдения, где цифрами на горизонтальной оси обозначены порядковые номера выполнения теста.

Fig. 3. Generalized group characteristic of joystick control in the plane of the force platform. "Box Plot" – median and quartiles (marked with a rectangle with a label), outliers of integral parameter (Av, MJ/s) for the left (*A*) and right (*B*) hands in the group of volunteers. Asterisk indicate statistically significant characteristics, $\alpha = 0.05$. Vertical lines separate consecutive observation sessions, where numbers on the horizontal axis indicate the ordinal numbers of the test execution.

Таким образом, на основании вышесказанного, общую характеристику управления в выборке ведущей (правой) рукой можно охарактеризовать как несколько более энергичную (рис. 3).

Особенности выполнения инструкции. Оценивались взаимосвязи показателей только внутри одного сеанса для одинаковых по порядку тестов, для прямого сопоставления явных, количественно определенных условий (параметров малоамплитудных движений рук).

Значимая (при $\alpha = 0.001$) высокая по шкале Чеддока (>0.7) положительная корреляция между особенностями управляющих движений руки (Av) и внешним результатом (Tr) наблюдалась преимущественно в первых 2-х сеансах для обеих рук. Следует отметить, что здесь это всегда происходило не для 1-го по порядку теста в сеансе, а только для 2-го или 3-го. Для левой руки таких высоких корреляций было 4 из 6 возможных, еще 1 была средней (>0.5) и 1 незначимой. Для правой руки высоких – 3 из 6 возможных, а остальные 3 – средние. Во второй половине наблюдения (в 3-м и 4-м сеансах) для левой руки наблюдались 4 средние положительные корреляции и 2 незначимые, а для правой руки – 1 высокая (для 3-го теста последнего сеанса), 3 средних и 1 слабая положительные.

Сила вертикального надавливания рукой на джойстик в течение всех сеансов, как правило, отрицательно коррелировала с успешностью выполнения инструкции (Tr). В первом сеансе это было характерно для всех подходов. В целом же, для левой руки: 1 высокая, 5 средних, 2 слабых и 3 незначимых. Для правой руки – 2 высоких, 6 средних, 1 слабая и 2 незначимых.

На рис. 4 представлено схематизированное описание наблюдавшихся взаимосвязей.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Экспериментальная схема в данном наблюдении была близка к применяющимся в исследованиях на людях [18] и человекообразных обезьянах [19] вариантам процедуры, представляющей исследование обучения в зрительно-моторной задаче, выполняемой посредством нажатия на рукоять (“force field learning”). В нашем наблюдении применялся полностью неподвижный джойстик, соединенный с силовой платформой, что представляет оригинальную разновидность подобных процедур, отличающуюся возможностью использования для анализа изначально разработанных для стабилометрии (стабилографии, постурографии) способов оценки траектории “невидимых” усилий руки при изометрических и малоамплитудных движениях, а также применения изначально рассчитанных на использование силовых платформ двигательно-когнитивных задач.

Известно, что поведенческая адаптация происходит быстро даже после единичных ошибок. Временные различия между развитием мышечных адаптаций и процессом улучшения двигательного навыка могут быть значительны. Это представляет большой интерес, например, для медицинской реабилитации. Полагаем, что такие различия исследования их параметров, например, могут быть важны для реабилитационной диагностики, для прогнозов, составления оптимальных режимов тренировок. Возможные физиологические механизмы быстрых адаптаций здесь часто связываются, например, с синаптической, и, на более поздней стадии обучения, с кортикальной [20] пластичностью. Важную роль в успехе зрительно-моторной адаптации может играть выбор стратегии [21], модификация внутренней “карты движений”, двигательного стереотипа [22].

В качестве одного из объяснений подобных быстрых адаптаций в исследовании на нейронных популяциях, например, предполагают, что премоторная кора может управлять быстрой сенсомоторной адаптацией, используя некое “пустое” подпространство (по аналогии с “output-null”) для выходного сигнала на нижележащие области в ответ на детекцию ошибки [19]. Здесь рассматривается представление, что, поскольку нейронов намного больше, чем мышечных клеток, то многие паттерны нейронной активности могут вызывать одинаковую мышечную активность. При этом эфферентные потоки условно связываются с “мощными” или “нулевыми” эффектами, производимыми различными нейронными “подпространствами”. В этом случае, “пустое” подпространство, не оказывая непосредственного влияния на результат моторного регулирования, может быть связано с формированием моделей активности. Подобная концепция также может лежать в объяснении изменения моторного контроля добровольцев в ответ на краткий двигательно-когнитивный тренинг [23], или, в описываемом случае, в изменениях параметров управления движениями рук в течение нескольких последовательных подходов одного сеанса. Соответственно простая оценка малоамплитудных движений рук, подобная предлагаемой здесь процедуре, полагаем, может являться ценной в характеристике особенностей моторного контроля, дифференциации различных состояний человека. Подобные трактовки явно отсылают к давним нейрокибернетическим моделям (например, [24]), теории функциональных систем и другим системным представлениям. П.К. Анохин, комментируя вопросы физиологической компенсации, “нейропластичности” и приспособления, писал, что “механизмы компенсации функций представляют собой в значительной степени то, чего добиваются сторонники кибернетики в решении автоматических устройств” [25]. Гипотетическое представление применительно к данному наблюдению представлено на рис. 5.

Быстрая перестройка характера управления – уменьшение до оптимального к данным условиям значения вертикальной силы надавливания на джойстик и вариативность быстроты (энергичности) перемены вектора силы в плоскости опоры, полагаем, происходила по типу автоматизации, где наличие визуальной обратной

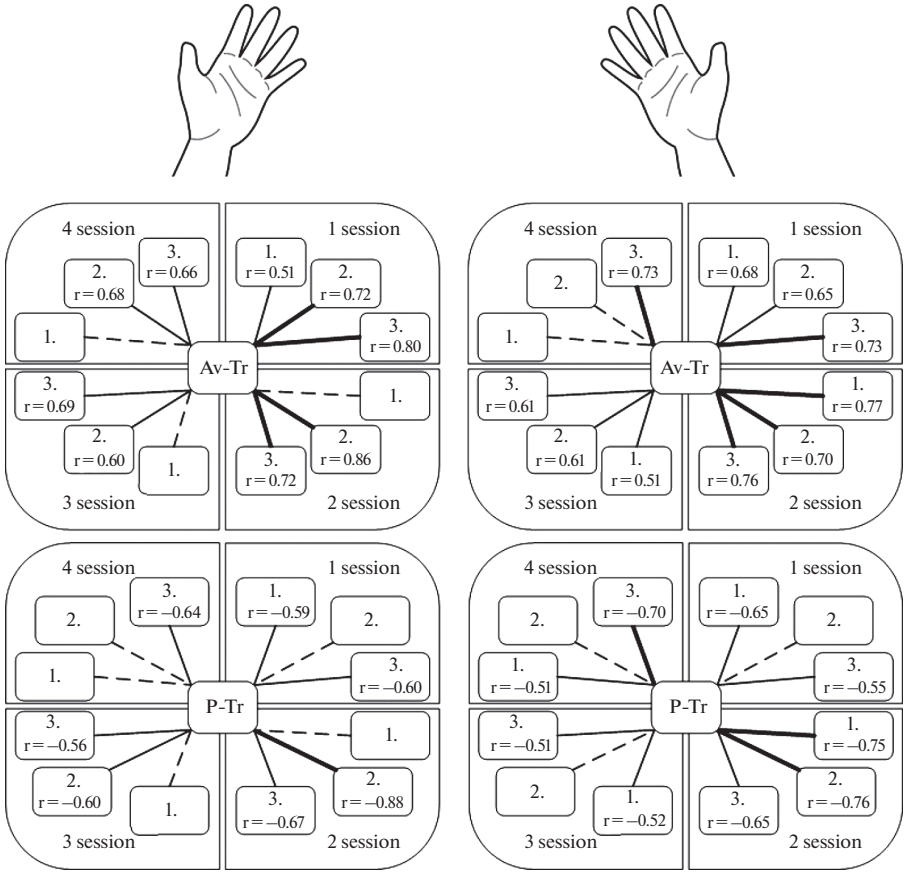


Рис. 4. Схематичное описание взаимосвязей внутри одного теста. Av-Tr – взаимосвязь между особенностями управляющих движений руки и внешним результатом; P-Tr – взаимосвязь между силой вертикального надавливания рукой на джойстик и внешним результатом. Толщина линий соответствует тесноте связи по шкале Чеддока: толстая – высокая сила (>0.7), тонкая – средняя сила (0.5–0.7), пунктирная – слабая сила (<0.5).

Fig. 4. Schematic description of relationships within one test. Av-Tr – the relationship between the features of the control movements of the hand and the external result; P-Tr – the relationship between the force of vertical pressure of the hand on the joystick and the external result. The thickness of the lines corresponds to the tightness of the connection on the Chaddock scale: thick – high strength (>0.7), thin – medium strength (0.5–0.7), dotted - weak strength (<0.5).

связи обеспечивало быструю детекцию ошибок. В этой связи заслуживает внимания представление, что увеличение скорости обучения на втором сеансе могло быть связано также с преодолением “явных знаний” о выполняемой задаче [25], полученных во время инструктажа и пробного теста, и актуализированных на первом сеансе. Планирование действия в условиях “двойной” двигательно-когнитивной задачи, полагаем, не сводится только к “чистому” времени реакции, а требует особого “моторного планирования” [26]. Здесь неосознаваемое, неявное обучение базируется на детекции ошибок сенсорного прогнозирования. Данный контекст также допускает точку зрения, что связанное с мозжечком обучение может играть ограниченную роль для приобретения сложных навыков и касается преимуще-

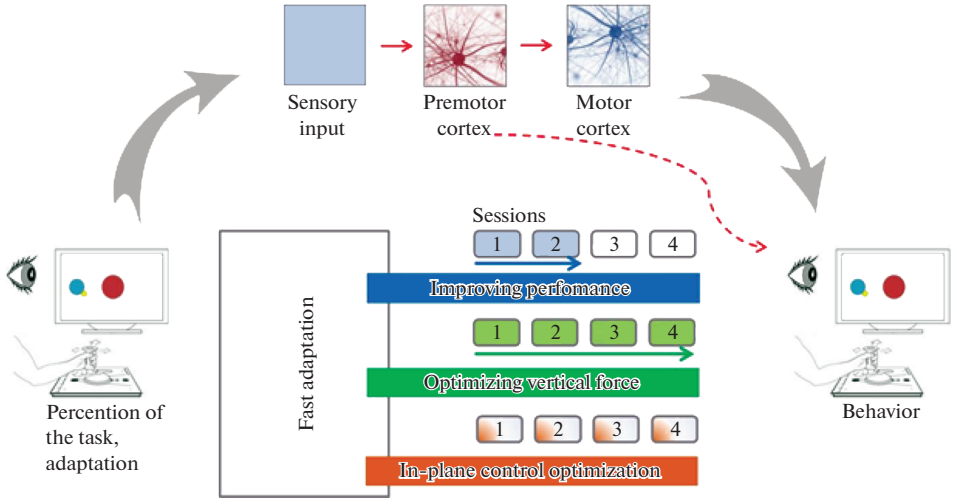


Рис. 5. Схема общих эффектов 4-кратного выполнения двигательно-когнитивной задачи в течение 4 дней с использованием полученных результатов и гипотетического представления о роли премоторной коры [20].

Fig. 5. Diagram of the general effects of performing a 4-time motor-cognitive task for 4 days, including the use of the results obtained and a hypothetical representation of the role of the premotor cortex [20].

ственно “калибровки”, корректировки уже освоенных движений [25]. Иными словами, в развитии подобных предлагаемой экспериментальной модели есть возможность более явно разделить когнитивный и чисто моторный компоненты обучения. На это указывают и полученные в нашем наблюдении сведения о различной динамике результативности (Tr) и характере управляющих воздействий (Av).

На наш взгляд, особенности выполнения инструкции в проведенном наблюдении (рис. 5) также свидетельствуют в пользу высказанных предположений. Следует особо отметить, что более быстрая оптимизация силы надавливания рукой по сравнению с управлением в плоскости силовой платформы, представляет отдельный интересный аспект. Вероятно, что среди возможных причин здесь может быть поза испытуемого, положение руки относительно плоскости управления.

Можно полагать, что оптимизация управления движением рук добровольцев в условиях данного наблюдения происходила неравномерно для условно различных аспектов управления: достижения оптимальной результативности, выбора вертикального усилия и манипулирования усилием в плоскости опоры. Вероятно, быстрое улучшение результатов выполнения инструкции связано с оптимизацией стратегии, наиболее гибкой части управления. Более сложной, вероятно, являлась задача оптимизации вертикального усилия, но это также оказалось достаточно быстрым процессом. Наиболее сложным, полагаем, оказалось управление силой в плоскости опоры, и оптимизация процесса здесь, вероятно, выходит за рамки отмеренного 4-дневного наблюдения – что может быть связано, например, с более поздней стадией обучения [27].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В коротком курсе (4 последовательных сеанса) повторяющихся минутных двигательно-когнитивных тестов у группы здоровых добровольцев наблюдалась отличающаяся динамика для моторных компонентов и успешности выполнения инструкции (внешнего результата). Обеими руками в итоге достигался близкий ре-

зультат, с несколько лучшими показателями для ведущей (правой) руки. Наиболее быстро адаптивные процессы происходили в течение первых 2 сеансов, стабилизируясь в части внешнего результата уже к последующим сеансам. Вертикальная сила надавливания на джойстик, как правило, от сеанса к сеансу чаще немного уменьшалась до оптимального в предлагавшихся условиях уровня (около 40 Н), что обычно сопровождалось более энергичным (вероятно, более уверенным) манипулированием. При этом для ведущей руки наблюдалось опережение процессов оптимизации управления малоамплитудным движением.

ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРОВ

Бабанов Н.Д. – участие в подготовке наблюдения, расчеты и анализ, подготовка рисунков, участие в подготовке текста, оформление рукописи; Бирюкова Е.А. – участие в планировании и подготовке, привлечение добровольцев и получение информированного согласия, проведение наблюдения, подготовка данных для анализа, обсуждение и участие в подготовке рукописи; Джелдубаева Э.Р. – участие в подготовке и проведении наблюдения, подготовке данных для анализа; Махин С.А. – участие в подготовке и проведении наблюдения, обсуждении и трактовке результатов, подготовке рукописи; Чуян Е.Н. – планирование и координация, участие в разработке схемы наблюдения, подготовка проекта, контроль соблюдения этических норм, мониторинг выполнения, участие в анализе и трактовке данных, подготовке текста; Кубряк О.В. – идея, разработка схемы наблюдения, участие в планировании наблюдения, анализ и трактовка данных, подготовка текста.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

В рамках работы ФГАОУ ВО “Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского” и ФГБНУ “НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина”, согласно Соглашению о сотрудничестве № 13-15/5-2869, 14.02.2017. Также поддержано грантом ФГАОУ ВО “Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского” №АААА-А20-120012090164-8.

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодарим за приборное обеспечение директора Центра коллективного пользования “Экспериментальная физиология и биофизика” кафедры физиологии человека и животных и биофизики Таврической академии, к.б.н. К.Н. Туманянц. Выражаем признательность администрациям ФГАОУ ВО “Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского” и ФГБНУ “НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина” за создание творческой атмосферы. Особая благодарность ФГАОУ ВО “Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского” за грантовую поддержку молодых ученых Таврической академии, принявших участие в реализации данного наблюдения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gill J.P., Chiel H.J.* Rapid adaptation to changing mechanical load by ordered recruitment of identified motor neurons. eNeuro. Apr 22. pii: ENEURO.0016-20.2020. https://doi.org/10.1523/ENEURO.0016-20.2020
2. *Takiyama K., Sakurada T., Shinya M., Sato T., Ogihara H., Komatsu T.* Larger, but not better, motor adaptation ability inherent in medicated Parkinson’s disease patients revealed by a smart-device-based study. Sci. Rep. 10 (1): 7113. 2020. https://doi.org/10.1038/s41598-020-63717-x
3. *Wisdom K.M., Delp S.L., Kuhl E.* Use it or lose it: multiscale skeletal muscle adaptation to mechanical stimuli. Biomech. Model Mechanobiol. 14(2): 195–215. 2015. https://doi.org/10.1007/s10237-014-0607-3
4. *Гроховский С.С., Кубряк О.В.* К вопросу о “дозе” двигательной реабилитации после инсульта: обзор. Физиотерапия, бальнеология и реабилитация. 17 (2): 66–71. 2018. [*Grokhovskiy S.S., Kubryak O.V.* To the question of the dose a motor reabilitation after a stroke:a review. Phsiotheray.balneology and reabilitation. 17 (2): 66–71. 2018. (In Russ)]. https://doi.org/10.18821/1681-3456-2018-17-2-66-71
5. *Романова М.В., Кубряк О.В., Исакова Е.В., Гроховский С.С., Котов С.В.* Объективизация нарушений равновесия и устойчивости у пациентов с инсультом в раннем восстанови-

тельном периоде. Анналы клин. и экспер. неврологии. 8(2): 12–15. 2014. [*Romanova M.V., Kubryak O.V., Isakova E.V., Grohovskii S.S., Kotov S.V.* Objectification of balance and stability disorders in patients with stroke in the early recovery period. Ann. Clin. Exp. Neurology. 8(2): 12–15. 2014. (In Russ)].

6. *Dzheldubaeva E.R., Biryukova E.A., Makhin S.A., Babanov N.D., Chuyan E.N., Kubryak O.V.* Electromyogram Maximum Amplitudes in Arm Flexors and Extensors in Healthy Volunteers in a Series of the Power Joystick Control Training Sessions. Neurosci. Behav. Physiol. 106(1): 44–54. 2020. https://doi.org/10.31857/S0869813920010069. 2020
7. *Анохин П.К.* Общие принципы компенсации нарушенных функций и их физиологическое обоснование. Москва. АПН РСФСР. 1955. [*Anohin P.K.* General principles of compensation for impaired functions and their physiological rationale. Moscow. APS RSFSR. 1955. (In Russ)].
8. *Khan R., Plahouras J., Johnston B.C., Scaffidi M.A., Grover S.C., Walsh C.M.* Virtual reality simulation training for health professions trainees in gastrointestinal endoscopy. Cochrane Database Syst. Rev. 8(8): CD008237. Published 2018. Aug. 17. https://doi.org/10.1002/14651858.CD008237.pub3
9. *Stöckel T., Carroll T.J., Summers J.J., Hinder M.R.* Motor learning and cross-limb transfer rely upon distinct neural adaptation processes. J. Neurophysiol. 116 (2): 575–586. 2016.
10. *Селионов В.А., Солопова И.А., Жванский Д.С.* Активация межконечностных связей повышает моторный выход в ногах у здоровых испытуемых: исследование в условиях разгрузки рук и ног. Физиология человека. 42 (1): 52–63. 2016. [*Selionov V.A., Solopova I.A., Jvanskii D.S.* Activation of inter-limb connections increases motor output in the legs in healthy subjects: a study under conditions of unloading the arms and legs. Human Physiology. 42(1): 52–63. 2016. (In Russ)].
11. *Leone C., Feys P., Moumdjian L., D'Amico E., Zappia M., Patti F.* Cognitive-motor dual-task interference: A systematic review of neural correlates. Neurosci. Biobehav. Rev. Apr; 75: 348–360. 2017. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.01.010
12. *Javoronkova L.A., Maksakova O.A., Shevcova T.P., Moraresku S.I., Kupcova S.V., Kushnir E.M., Iksanova E.M.* Dual objectives are an indicator of the characteristics of cognitive deficits in patients after traumatic brain injury. Neurosci. Behav. Physiol. 119 (8): 46–52. 2019. https://doi.org/10.17116/jnevro201911908146
13. *Ohashi H., Valle-Mena R., Gribble P.L., Ostry D.J.* Movements following force-field adaptation are aligned with altered sense of limb position. Exp. Brain Res. 237 (5): 1303–1313. https://doi.org/10.1007/s00221-019-05509-y
14. *Wisdom K.M., Delp S.L., Kuhl E.* Use it or lose it: multiscale skeletal muscle adaptation to mechanical stimuli. Biomech. Model Mechanobiol. 14 (2): 195–215. 2015. https://doi.org/10.1007/s10237-014-0607-3
15. *Мантрова. И.Н.* Методическое руководство по психофизиологической и психологической диагностике. Иваново. Нейрософт. 2007. [*Mantrova. I.N.* [Methodological guide for psychophysiological and psychological diagnostics. Ivanovo. Neirosoft. 2007. (In Russ)].
16. *Baker D.H., Vilidaite G., Lygo F.A., Smith A.K., Flack T.R., Gouws A.D., Andrew T.G.* Power contours: optimising sample size and precision in experimental psychology and human neuroscience. arXiv:1902.06122v5 [q-bio.NC] 4 Feb 2020.
17. *Гроховский С.С., Кубряк О.В.* Метод интегральной оценки эффективности регуляции позы человека. Мед. техника. 2: 49–52. 2018. [*Grokhovskiy S.S., Kubryak O.V.* The method of integral assessment of the effectiveness of regulation of human posture. Biomed. Engineering. 2: 49–52. 2018. (In Russ)].
18. *Crevecoeur F., Mathew J., Bastin M., Lefèvre P.* Feedback Adaptation to Unpredictable Force Fields in 250 ms. eNeuro. 29.7(2). pii: ENEURO.0400-19.2020. https://doi.org/10.1523/ENEURO.0400-19.2020
19. *Perich M.G., Gallego J.A., Miller L.E.* A Neural Population Mechanism for Rapid Learning. Neuron. 100 (4): 964–976. 2018. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.09.030
20. *Kleim J.A., Hogg T.M., VandenBerg P.M., Cooper N.R., Bruneau R., Remple M.* Cortical synaptogenesis and motor map reorganization occur during late, but not early, phase of motor skill learning. J. Neurosci. 24 (3): 628–633. 2004. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3440-03.2004
21. *Schween R., Taylor J.A., Hegele M.* Plan-based generalization shapes local implicit adaptation to opposing visuomotor transformations. J. Neurophysiol. 120 (6): 2775–2787. 2018. https://doi.org/10.1152/jn.00451.2018
22. *Monfils M.H., Plautz E.J., Kleim J.A.* In search of the motor engram: motor map plasticity as a mechanism for encoding motor experience. Neuroscientist. 11 (5): 471–483. 2005. https://doi.org/10.1177/1073858405278015
23. *Kubryak O.V., Gorbacheva A.K., Kovaleva A.V., Panova E.N., Birukova E.A., Grokhovsky S.S.* A putative marker of functional state shift in volunteers after performing a motor task with biofeedback. Human Physiology. 42 (2): 223–227. 2016.
24. *Брайнес С.Н.* Нейрокибернетика. Москва. Медгиз. 1962. [*Braines S.N.* Neurocybernetics. Moscow. Medgiz. 1962. (In Russ)].

25. *Haith A.M., Huberdeau D.M., Krakauer J.W.* The influence of movement preparation time on the expression of visuomotor learning and savings. J. Neurosci. 35 (13): 5109–5117. 2015. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3869-14.2015
26. *Wong A.L., Haith A.M., Krakauer J.W.* Motor Planning. Neuroscientist. 21(4): 385–398. 2015. https://doi.org/10.1177/1073858414541484
27. *Kleim J.A., Hogg T.M., VandenBerg P.M., Cooper N.R., Bruneau R., Remple M.* Cortical synaptogenesis and motor map reorganization occur during late, but not early, phase of motor skill learning. J. Neurosci. 24(3): 628–633. 2004. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3440-03.2004

Dynamics of Parameters of Low-Amplitude Hand Movements in a Repetitive Motor-Cognitive Task

N. D. Babanov[a], *, E. A. Biryukova[b], E. R. Dzheldubaeva[b], S. A. Makhin[b], E. N. Chuyan[b], and O. V. Kubryak[a]

[a]*Anokhin Research Institute of Normal Physiology, Moscow, Russia*
[b]*Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia*
**e-mail: n.babanov@nphys.ru*

In contrast to the development of muscle adaptations associated with overstrain, insufficient stretching, overloading and underloading, low-strain short-term courses of motor-cognitive training lead to adaptations associated with neural rearrangements, which present a great scientific interest. However, this field remains understudied, as indicated by the empirical selection of the mode of motor activity in medical rehabilitation, and the difficulties with forecasting and assessment of the rehabilitation potential. In order to study their ability to follow the instructions, and the power characteristics of low-amplitude control movements, 25 healthy pre-trained volunteers were asked to to control the label on the screen by applying pressure to the stationary joystick with their hands. Using a joystick attached to the power platform, the parameters of the trajectory of the center of pressure on the support, the vertical force and the external result (the degree of implementation of the instructions) were evaluated when performing a standard task with visual feedback, performed three times with each hand, sequentially for 4 days (a short training course). The obtained data were analyzed using standard mathematical methods. The stable level of instruction execution was achieved most quickly, by the second session. In contrast, the optimization of the vertical pressure force occurred throughout the whole course, and the optimization of control in the support plane was more complex. Optimization of motor control occurred unevenly for conditionally different aspects of control: achieving optimal performance, choosing a vertical force and manipulating the force in the support plane. The rapid improvement of instructions execution is presumably related to optimizing the strategy. The task of optimizing the vertical force on the joystick was more difficult. The highest difficulty was observed with controlling the strength of the hands in the support plane, which may be explained by the fact that this part of the task was related to a later stage of training.

Keywords: motor control, manual control, low-amplitude movements, training, muscle adaptations, motor-cognitive task, functional system

ЦИТИРОВАТЬ:

Бабанов Н.Д., Бирюкова Е.А., Джелдубаева Э.Р., Махин С.А., Чуян Е.Н., Кубряк О.В. Динамика параметров малоамплитудных движений рук при повторяющейся двигательно-когнитивной задаче. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(11): 1370–1384.

DOI:10.31857/S0869813920110035

TO CITE THIS ARTICLE:

Babanov N.D., Biryukova E.A., Dzheldubaeva E.R., Makhin S.A., Chuyan E.N., Kubryak O.V. Dynamics of Parameters of Low-amplitude Hand Movements in a Repetitive Motor-cognitive Task. Russian Journal of Physiology. 106(11): 1370–1384.

DOI:10.31857/S0869813920110035

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 11, с. 1385–1399

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УЧАСТИЕ ГОРМОНОВ ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНО-АДРЕНОКОРТИКАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ КРЫС В ГАСТРОПРОТЕКЦИИ ПРИ СЕНСИТИЗАЦИИ И ДЕСЕНСИТИЗАЦИИ КАПСАИЦИН-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ АФФЕРЕНТНЫХ НЕЙРОНОВ

© 2020 г. Т. Т. Подвигина[1], *, О. Ю. Морозова[1], О. П. Комкова[1], Л. П. Филаретова[1]

[1]Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия
**E-mail: tpodvigina@yandex.ru*

Поступила в редакцию 22.07.2020 г.
После доработки 08.09.2020 г.
Принята к публикации 08.09.2020 г.

Задачей настоящей работы явилось: а) изучение вклада глюкокортикоидных гормонов в гастропротекцию, индуцированную сенситизацией капсаицин-чувствительных афферентных нейронов (КЧН), б) исследование гастропротективного эффекта кортикотропин-рилизинг-фактора (КРФ) в условиях десенситизации КЧН и возможного участия кортикостерона в этом эффекте. Эксперименты проведены на крысах-самцах линии Спрейг–Доули массой 260–300 г. В качестве ульцерогенных стимулов использовали иммобилизацию при температуре 10°С (3 ч) или введение индометацина в дозе 35 мг/кг. Сенситизацию КЧН индуцировали введением капсаицина в дозах 1 и 10 мг/кг за 1 ч до предъявления ульцерогенных стимулов, десенситизацию – введением капсаицина в суммарной нейротоксической дозе 100 мг/кг (20 + 30 + 50) в течение 3-х последовательных дней за 2 недели до начала экспериментов. КРФ вводили внутрибрюшинно в дозе 2.5 мг/кг за 30 мин до введения индометацина крысам с десенситизацией КЧН. Для изучения вовлечения кортикостерона в изучаемые гастропротективные эффекты использовали ингибитор его синтеза метирапон в дозе 30 мг/кг. Капсаицин, введенный в дозах 1 и 10 мг/кг, вызывал гастропротективный эффект в обеих ульцерогенных моделях. Введение метирапона за 30 мин до капсаицина устраняло гастропротективный эффект сенситизации КЧН, вызванной введением капсаицина в дозе 1 мг/кг, но не влияло на гастропротективный эффект капсаицина при его введении в дозе 10 мг/кг. Введение КРФ индуцировало гастропротективный эффект не только у контрольных крыс, но и у животных с десенситизацией КЧН. Результаты экспериментов с метирапоном свидетельствуют о том, что обнаруженный гастропротективный эффект КРФ у крыс с десенситизацией КЧН, по крайней мере, частично опосредуется кортикостероном.

Ключевые слова: капсаицин-чувствительные афферентные нейроны, глюкокортикоидные гормоны, кортикотропин-рилизинг фактор, эрозии желудка, гастропротекция, глюкоза, метирапон

DOI: 10.31857/S0869813920110072

Известно, что сенситизация капсаицин-чувствительных афферентных нейронов (КЧН) оказывает защитное действие на слизистую оболочку желудка [1–5], а десенситизация КЧН, напротив, усугубляет ульцерогенное действие на желудок различных факторов [6–9]. Влияние капсаицина опосредуется ваниллоидными рецепторами (TRPV1) [9–11]. Реализация гастропротективного эффекта КЧН проис-

ходит с участием кальцитонин-ген-связанного пептида, который выделяется из нервных окончаний при стимуляции КЧН [9, 12, 13]. Показано участие простагландинов и оксида азота в опосредовании гастропротективного эффекта капсаицина [9, 12–14].

Взаимодействие глюкокортикоидных гормонов и КЧН в гастропротекции до исследований нашей лаборатории не изучалось, что может быть связано с укоренившейся в литературе точкой зрения о глюкокортикоидных гормонах как ульцерогенных факторах [15, 16]. Исследования, проведенные в нашей лаборатории, доказали гастропротективную роль глюкокортикоидных гормонов, выделяющихся при стрессе [17–20], а также при действии других ульцерогенных факторов, в том числе и индометацина [21]. Кроме того, при определенных условиях мы продемонстрировали гастропротективное влияние и экзогенных глюкокортикоидов [21]. Изучение механизмов гастропротективного действия глюкокортикоидных гормонов выявило наличие общих мишеней с КЧН в гастропротекции [2, 17, 22, 23], что привело к предположению о возможном их взаимодействии. Это предположение подтвердилось в исследованиях лаборатории, продемонстрировавших компенсаторную гастропротективную роль эндогенных глюкокортикоидных гормонов в поддержании целостности слизистой оболочки желудка при десенситизации КЧН [8].

Вопрос об участии глюкокортикоидных гормонов в опосредовании гастропротективного действия сенситизации КЧН в литературе не освещен. В нашей предыдущей работе [24] было показано дозозависимое уменьшение площади индометацин-индуцированных эрозий желудка при введении капсаицина в малых дозах, а также параллельное повышение уровня кортикостерона и глюкозы в крови. Введение метирапона (ингибитора синтеза кортикостерона) предотвращало повышение уровня кортикостерона в ответ на введение капсаицина и устраняло гастропротективный эффект капсаицина, введенного в дозе 1 мг/кг [24]. Полученные результаты свидетельствуют об участии глюкокортикоидных гормонов в опосредовании гастропротективного эффекта капсаицина в указанных условиях. Настоящая работа является продолжением этих исследований.

Предположение о возможной гастропротективной роли кортикотропин-рилизинг-фактора (КРФ) у крыс с десенситизацией КЧН также основано на результатах наших предыдущих исследований, в которых был подтвержден гастропротективный эффект КРФ при действии различных ульцерогенных стимулов и впервые показано вовлечение глюкокортикоидных гормонов в реализацию этого эффекта [19, 25–27]. Вопрос о возможности гастропротективного действия КРФ в условиях десенситизации КЧН ранее не изучался.

Таким образом, задачей настоящей работы явилось: а) изучение вклада глюкокортикоидных гормонов в гастропротекцию, индуцированную сенситизацией КЧН, б) исследование гастропротективного эффекта КРФ в условиях десенситизации КЧН и возможного участия кортикостерона в этом эффекте.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на животных из биоколлекции “Коллекция лабораторных млекопитающих разной таксономической принадлежности” Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Эксперименты проводили на крысах-самцах линии Спрейг–Доули массой около 260–300 г. Количество крыс в экспериментальных группах варьировало от 8 до 12. За неделю до начала экспериментов крыс акклиматизировали к стандартным условиям лабораторного вивария: температура 20–22°С, световой режим 12 ч: 12 ч (включение света в 8 ч, выключение в 20 ч), свободный доступ к воде и пище. Сенситизацию КЧН индуцировали однократным введением капсаицина в дозах 1 и 10 мг/кг. Капсаицин (Sigma-Aldrich, Германия) для

этой цели вводили подкожно в объеме 5 мл/кг за 1 ч до применения ульцерогенного стимула. Выбор этих доз капсаицина был сделан на основании полученных в предыдущей работе результатов о дозозависимом гастропротективном эффекте капсаицина [24]. Контрольным крысам вводили растворитель капсаицина – спирт : твин 80 : физиологический раствор в объемном соотношении 5 : 5 : 90 соответственно.

Для десенситизации КЧН капсаицин вводили крысам под эфирным наркозом в нейротоксической дозе 100 мг/кг в течение 3-х последовательных дней (20, 30, 50 мг/кг) подкожно, в объеме 5 мл/кг. В этом случае использовали растворитель капсаицина с другим соотношением компонентов – спирт : твин : физиологический раствор соответственно – 10 : 10 : 80. Десенситизацию КЧН производили за 2 нед. до ульцерогенного стимула.

Эффекты сенситизации КЧН на слизистую оболочку желудка крыс изучали в условиях действия двух ульцерогенных стимулов: иммобилизации в пеналах при температуре 10°С в течение 3-х ч или индометацина (подкожное введение в дозе 35 мг/кг в объеме 5 мл/кг за 4 ч до декапитации). Влияние десенситизации КЧН на изучаемые показатели исследовали только в индометациновой ульцерогенной модели. Ульцерогенные стимулы применялись после 24-часового голодания животных.

Для изучения роли кортикостерона в гастропротекции, вызванной сенситизацией КЧН, использовали ингибитор его синтеза метирапон (Sigma-Aldrich, Германия). Метирапон вводили внутрибрюшинно в дозе 30 мг/кг за 30 мин до введения капсаицина. Контрольным крысам вводили растворитель метирапона: 0.9%-ный раствор NaCl с каплей твина 80.

Схема экспериментов: голод 24 ч, введение метирапона (ингибитора синтеза кортикостерона), через 30 мин введение капсаицина в дозе 1 или 10 мг/кг (сенситизация КЧН), через 1 ч применение ульцерогенного стимула (иммобилизация при 10°С или введение индометацина), декапитация через 3 ч после начала иммобилизации или через 4 ч после введения индометацина. Эксперименты без метирапона начинались соответственно с введения капсаицина.

Возможность проявления гастропротективного эффекта КРФ у крыс с десенситизацией КЧН оценивали после внутрибрюшинного введения КРФ (Sigma-Aldrich, Германия) в дозе 2.5 мкг/кг за 30 мин до применения индометацина. Чтобы проверить, влияет ли десенситизация КЧН на чувствительность гипофизарно-адренокортикального звена гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы (ГГАКС) к КРФ, сравнивали влияние введения КРФ у контрольных и десенситизированных крыс на уровень кортикостерона в крови через 30 мин после его введения (без ульцерогенных факторов). В опытах с изучением роли кортикостерона в гастропротекции КРФ у крыс с десенситизацией КЧН также использовали метирапон, который вводили за 30 мин до введения КРФ.

Схема экспериментов: введение капсаицина в течение 3-х последовательных дней в дозах 20, 30 и 50 мг/кг соответственно; в течение 13 дней развитие десенситизации КЧН, голод 24 ч, 14-й день – введение метирапона, через 30 мин – введение КРФ, еще через 30 мин – введение индометацина в ульцерогенной дозе, через 4 ч – декапитация животных. Эксперименты без метирапона начинались с введения КРФ.

При декапитации брали пробы крови для определения уровней кортикостерона и глюкозы. Наш интерес к определению глюкозы связан с имеющимися данными о том, что поддержание глюкокортикоидными гормонами уровня глюкозы в крови может быть одним из механизмов их гастропротективного действия [17, 21]. Площадь эрозий оценивали на основании фотографий желудков с помощью модифицированной компьютерной программы Image J [28]. Содержание глюкозы определяли в капле крови крыс с помощью тест-полосок системы One Touch Ultra, США.

Уровень кортикостерона в плазме крови определяли иммуноферментным методом с использованием набора реагентов “Кортикостерон крыса/мышь-ИФА” (ХЕМА). Все данные обрабатывали статистически. Непараметрический метод Манна–Уитни использовали для сравнения площадей эрозий слизистой оболочки желудка и уровней кортикостерона в крови, для анализа изменений уровня глюкозы использовали *t*-критерий Стьюдента.

Исследования проводились в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями Комиссии по содержанию и использованию животных Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Стимуляция КЧН при введении капсаицина в дозах 1 и 10 мг/кг приводила к дозозависимому гастропротективному эффекту в обеих ульцерогенных моделях (рис. 1). Выбранные модели существенно различались между собой по изменениям исследуемых физиологических параметров у контрольных животных (с введением растворителя капсаицина) и этим были интересны для сопоставления. Например, у контрольных крыс иммобилизация при холоде вызывала значительно большее повреждение слизистой оболочки желудка по сравнению с таковым после введения индометацина в ульцерогенной дозе. При стрессе наблюдался очень высокий подъем кортикостерона в крови и достаточно высокий уровень глюкозы, несмотря на предварительное голодание. В индометациновой модели уровень глюкозы после голода был низким, уровень кортикостерона значительно ниже, чем в группе контрольных крыс после стресса (рис. 1).

Тем не менее, в обеих ульцерогенных моделях наблюдался защитный эффект сенситизации КЧН на слизистую оболочку желудка, наиболее ярко выраженный в стрессорной модели после введения капсаицина в дозе 10 мг/кг: в этом случае происходило снижение площади эрозий с очень высоких значений у контрольных крыс до очень низких при введении капсаицина (рис. 1*A*). Несмотря на высокий уровень глюкозы и кортикостерона в крови контрольных крыс через 3 ч после начала иммобилизации, предварительное введение капсаицина в дозе 10 мг/кг (но не в дозе 1 мг/кг) приводило к дальнейшему росту этих показателей (рис. 1*A*). В индометациновой ульцерогенной модели введение капсаицина в дозе 10 мг/кг также оказало более выраженный гастропротективный эффект по сравнению с таковым при дозе 1 мг/кг (рис. 1*B*). При введении капсаицина (1 и 10 мг/кг) в индометациновой модели наблюдалось дозозависимое увеличение уровня глюкозы и кортикостерона в крови. Следует обратить внимание на то, что в индометациновой модели увеличение уровней кортикостерона и глюкозы после введения капсаицина в дозе 1 мг/кг происходило на фоне невысоких уровней этих показателей у контрольных животных (через 4 ч после введения индометацина) (рис. 2*B*).

Введение метирапона, ингибитора синтеза кортикостерона, как в стрессорной, так и в индометациновой ульцерогенной модели приводило к устранению гастропротективного эффекта капсаицина, введенного в дозе 1 мг/кг, о чем свидетельствует повышение площади эрозий до уровня контрольных значений у крыс без введения капсаицина (рис. 2, 3). При этом в стрессорной ульцерогенной модели не наблюдалось достоверных изменений в уровне кортикостерона и глюкозы в крови, тестируемом через 3 ч после начала действия стрессорного стимула (рис. 2), в индометациновой модели введение метирапона приводило к снижению уровня кортикостерона через 4 ч после введения индометацина (рис. 3).

В условиях введения капсаицина в дозе 10 мг/кг метирапон не вызывал достоверных изменений в гастропротективном эффекте сенситизации КЧН в обеих ульцеро-

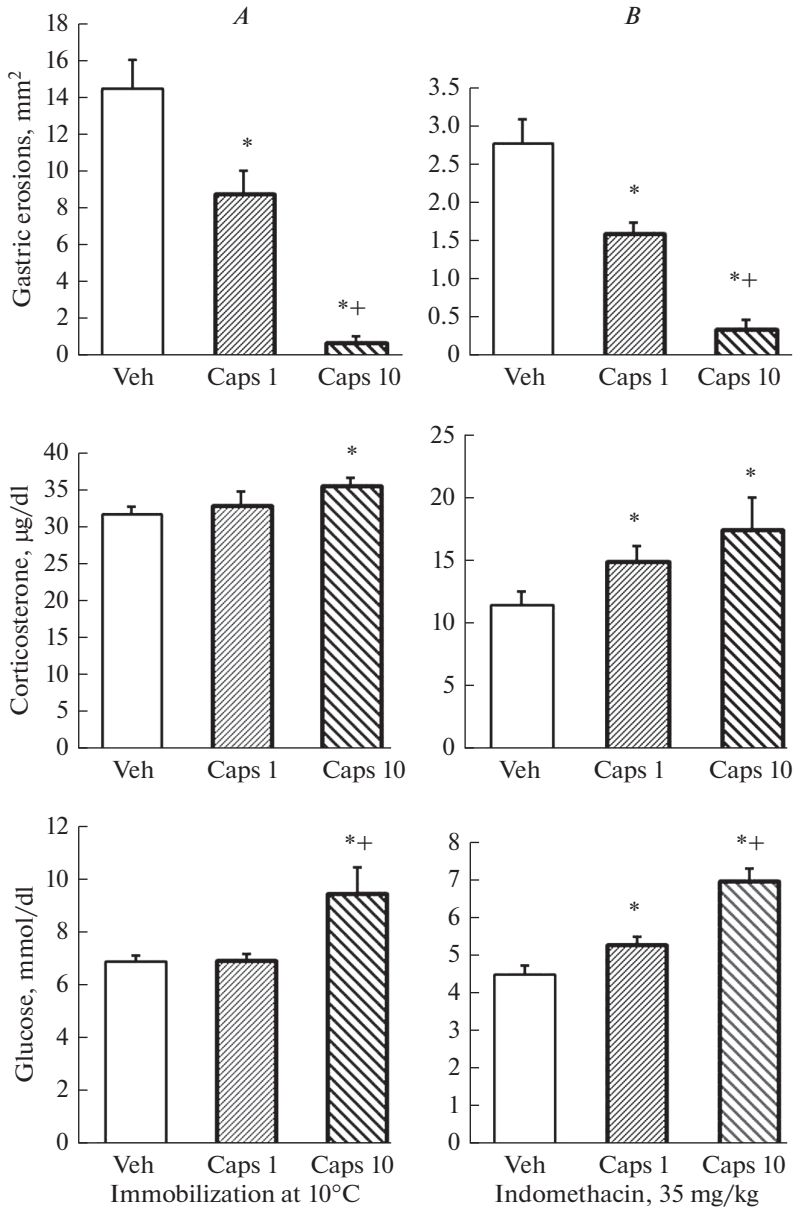


Рис. 1. Влияние сенситизации КЧН (введение капсаицина в дозе 1 и 10 мг/кг за 1 ч до ульцерогенного стимула) на площадь эрозий желудка, уровень кортикостерона и глюкозы в крови крыс через 3 ч после начала иммобилизации при 10°С (*A*) или через 4 ч после введения индометацина (*B*).

Veh – растворитель капсаицина, Caps 1 или Caps 10 – капсаицин в дозе 1 или 10 мг/кг. $p < 0.05$: * от Veh, + от Caps 1. Число крыс в группе 10–12.

Fig. 1. The effect of CSN sensitization (administration of capsaicin at the dose of 1 mg/kg or 10 mg kg 1 h before ulcerogenic stimuli) on the gastric erosions, blood corticosterone and glucose level in rats 3 h after the onset of immobilization (*A*) or 4 h after indomethacin administration (*B*).

Veh – capsaicin vehicle, Caps 1 or Caps 10 – capsaicin at the dose of 1 or 10 mg/kg $p < 0.05$: * from Veh, + from Caps 1 mg/kg. $n = 10–12$.

генных моделях (рис. 2, 3). При этой дозе капсаицина не было найдено достоверных различий и в уровне кортикостерона в крови крыс после введения метирапона.

При десенситизации КЧН чувствительность гипофизарно-адренокортикального звена ГГАКС к экзогенному КРФ, определяемая по уровню кортикостерона в крови, не изменялась по сравнению с таковой у контрольных животных: уровень кортикостерона в крови через 30 мин после введения КРФ был одинаково повышен у обеих групп крыс по сравнению с контрольными значениями (рис. 4). Не наблюдалось каких-либо изменений в уровне глюкозы.

Десенситизация КЧН, как и следовало ожидать, приводила к увеличению чувствительности слизистой оболочки желудка к ульцерогенному действию индометацина. Внутрибрюшинное введение КРФ за 30 мин до введения индометацина оказывало гастропротективный эффект как у контрольных крыс, так и у крыс с десенситизацией КЧН, при этом снижение площади эрозий у десенситизированных крыс в процентном отношении оказалось даже более выраженным по сравнению с контрольными животными (рис. 5). Так, у контрольных крыс площадь эрозий под влиянием КРФ снизилась на 50%, у десенситизированных крыс – на 70%.

Для выяснения вопроса о роли кортикостерона в наблюдаемом гастропротективном эффекте КРФ также был использован метирапон, который вводили до введения КРФ. Введение метирапона контрольным крысам не просто устраняло защитный эффект КРФ, а приводило к увеличению площади эрозий по сравнению с таковой у контрольных крыс. У крыс с десенситизацией КЧН введение метирапона приводило к повышению площади эрозий по сравнению с таковой у крыс с введением КРФ без метирапона, однако, наблюдаемая площадь эрозий оставалась ниже значений контрольных крыс с десенситизацией КЧН (без КРФ), т.е. защитный эффект КРФ все же частично сохранялся (рис. 5). Уровни кортикостерона и глюкозы в крови практически не изменялись после введения метирапона у крыс с десенситизацией КЧН по сравнению с таковыми у контрольных крыс (без метирапона) за исключением небольшого, но достоверного подъема глюкозы после введения метирапона крысам с десенситизацией КЧН (рис. 5). Отсутствие изменений может быть связано с тем, что тестирование кортикостерона и глюкозы происходило отставлено по времени после введения метирапона, действие которого является кратковременным.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

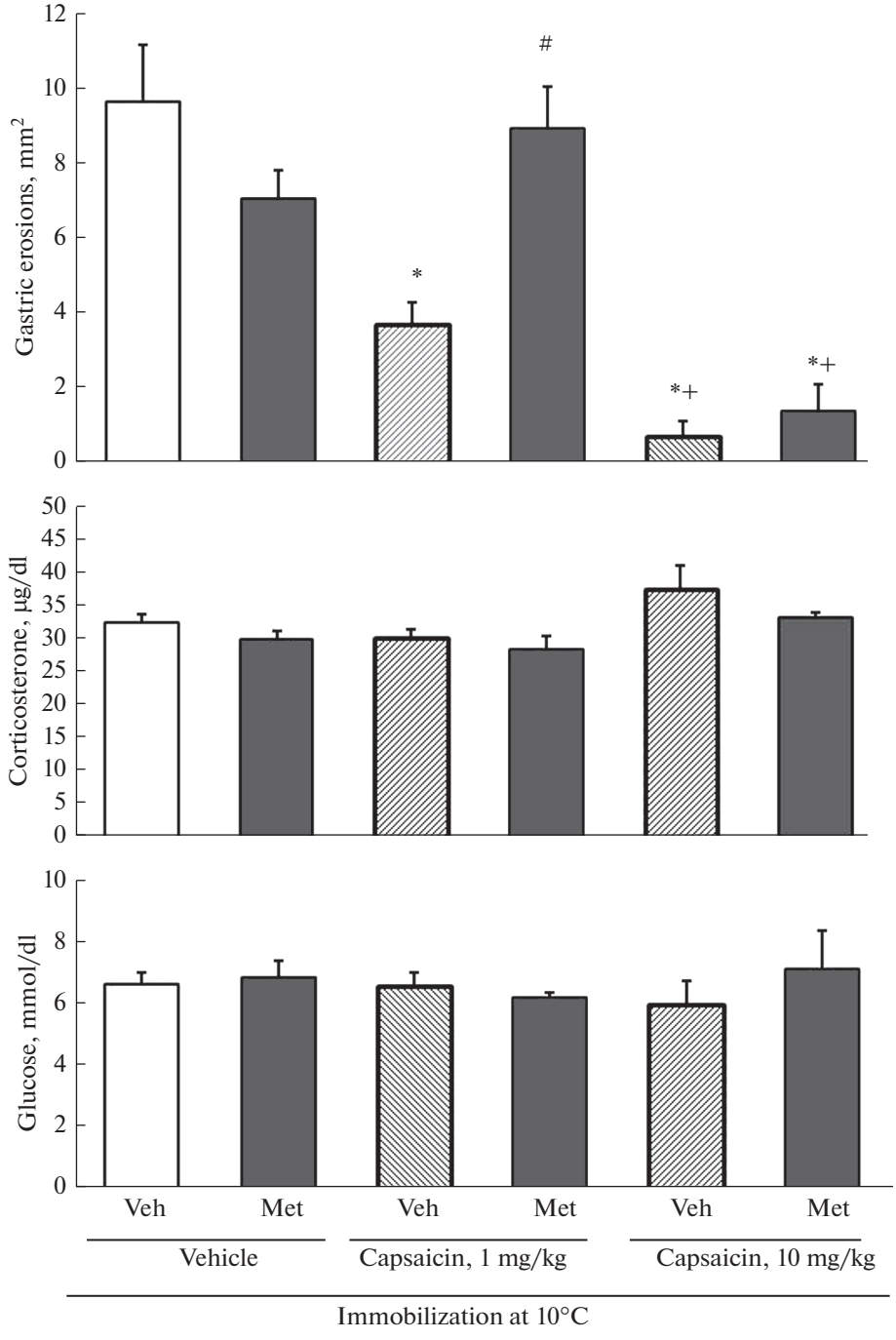
Введение капсаицина в дозах 1 и 10 мг/кг оказывало дозозависимый гастропротективный эффект в обеих ульцерогенных моделях (иммобилизационный стресс при холоде или введение индометацина), что, исходя из данных литературы [4, 5, 24], было ожидаемым. Особенно впечатляющим гастропротективное действие

Рис. 2. Эффект метирапона (введение в дозе 30 мг/кг за 30 мин до капсаицина) на площадь эрозий желудка, уровень кортикостерона и глюкозы в крови крыс с сенситизацией КЧН через 3 ч после начала иммобилизации при 10°С.

Veh – растворитель метирапона (0.9%-ный раствор NaC)l, Met – метирапон, Vehicle – растворитель капсаицина. $p < 0.05$: * от Veh – Vehicle, # от Veh – Capsaicin 1 мг/кг, + – от соответствующей группы в Capsaicin 1 мг/кг. Число крыс в группе 9–10.

Fig. 2. The effect of metyrapone administration at the dose of 30 mg/kg (i.p., 30 min before capsaicin injection) on the gastric erosions, blood corticosterone and glucose level in rats with sensitization of CSN 3 h after the onset of immobilization.

Met – metyrapone, Veh – metyrapone vehicle – 0.9% NaCl, Vehicle – capsaicin vehicle. $p < 0.05$: * from Veh in Vehicle, # from Veh in Capsaicin 1 mg/kg, + from the appropriate group in Capsaicin 1 mg/kg. $n = 9–10$.


Gastric erosions, mm2
12
10
8
6
4
2
0
#
*
*+
*+
Corticosterone, μg/dl
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Glucose, mmol/dl
10
8
6
4
2
0
Veh
Met
Veh
Met
Veh
Met
Vehicle
Capsaicin, 1 mg/kg
Capsaicin, 10 mg/kg
Immobilization at 10°C

капсаицина было при его введении в дозе 10 мг/кг в стрессорной ульцерогенной модели.

Участие кортикостерона в гастропротективном эффекте сенситизации КЧН, исследованное путем кратковременного ингибирования его синтеза метирапоном, проявилось при введении капсаицина в дозе 1 мг/кг в обеих ульцерогенных моделях. Этот факт, обнаруженный нами ранее в индометациновой ульцерогенной модели [24], подтвердился и в настоящей работе. Мы посчитали необходимым повторить эти опыты для более корректного сравнения эффекта двух доз капсаицина в двух ульцерогенных моделях. Как показали результаты настоящей работы, при использовании стрессорной модели также было обнаружено участие кортикостерона в защитном влиянии сенситизации КЧН на желудок, если она была вызвана введением капсаицина в дозе 1мг/кг. Вместе с тем, в обеих ульцерогенных моделях введение метирапона не повлияло на гастропротективный эффект капсаицина при его введении в дозе 10 мг/кг. В чем причина таких различий, пока не ясно. Можно предположить, что при применении более высокой дозы капсаицина подключаются другие механизмы его гастропротективного действия, не связанные с действием кортикостерона. Кроме того, представляется вероятным, что влияние метирапона, кратковременного ингибитора синтеза кортикостерона [19, 29], оказывается недостаточным для того, чтобы повлиять на высокий уровень кортикостерона, вызванный применением ульцерогенных факторов, да еще усиленный действием капсаицина в дозе 10 мг/кг. Тот факт, что не всегда проявляется ожидаемое изменение уровня кортикостерона при введении капсаицина или метирапона, можно еще объяснить кратковременностью этих изменений и длительностью эксперимента, связанную с применением ульцерогенных факторов. Это можно продемонстрировать на примере введения КРФ: к концу эксперимента через 4 ч после введения индометацина уровень кортикостерона в крови крыс с введением КРФ не отличался от контрольных значений. Однако через 30 мин после введения КРФ, как было показано в отдельном опыте, наблюдалось достоверное повышение уровня кортикостерона в крови.

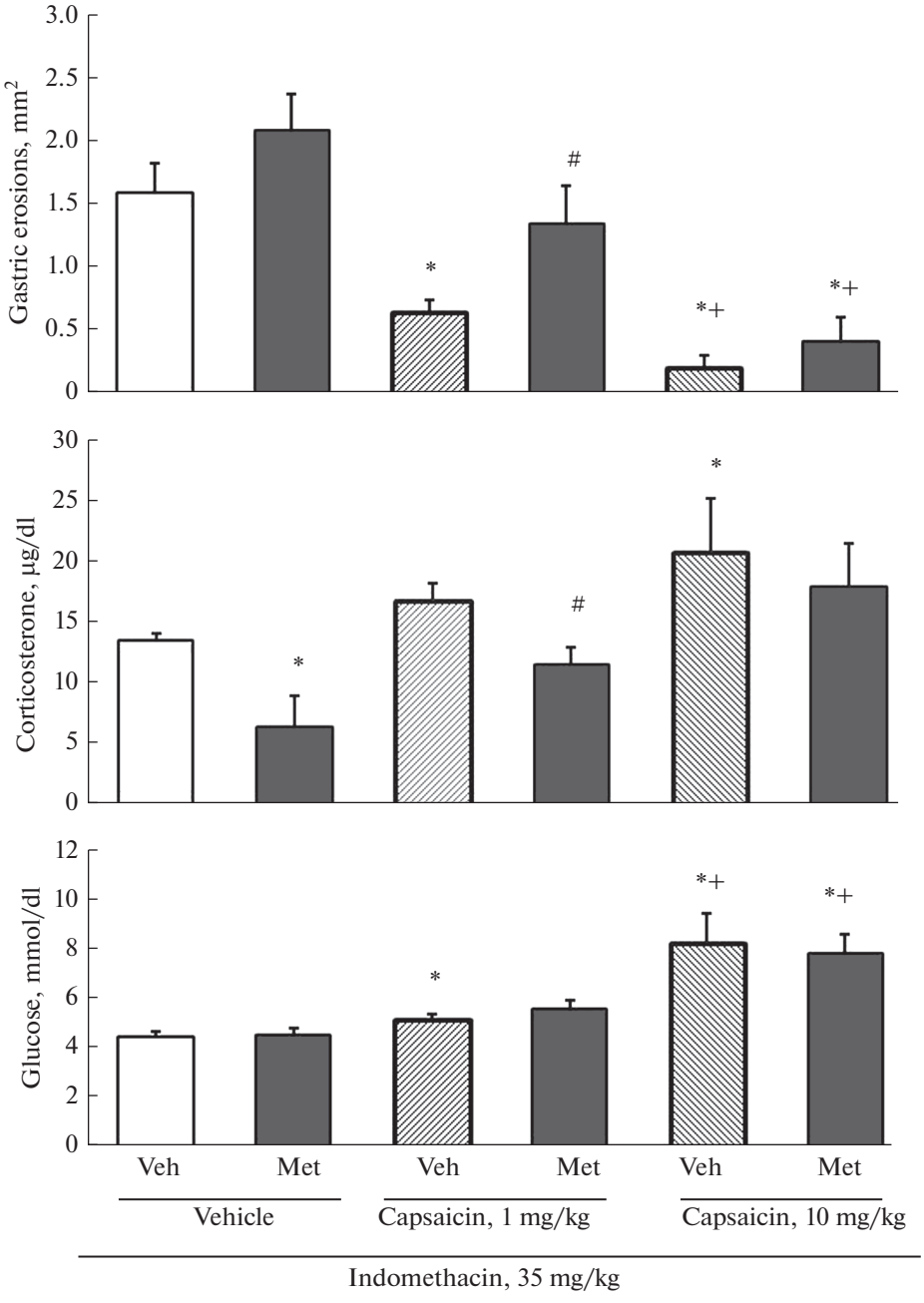
В работе получены данные о стимулирующем влиянии капсаицина на активность ГГАКС. Об этом свидетельствует дальнейшее увеличение стрессорного уровня кортикостерона после введения капсаицина в дозе 1 мг/кг в индометациновой модели и в обеих ульцерогенных моделях – после введения капсаицина в дозе 10 мг/кг. Имеющиеся немногочисленные данные литературы подтверждают этот вывод [30, 31]. Механизм этой стимуляции не ясен и практически не изучался. В одной из упомянутых выше работ показано, что при гипофизэктомии введение кальцитонин-ген-связанного пептида, одного из главных пептидов, опосредующих гастропротективное действие КЧН, активирует выброс кортизола в кровь у телят [30]. Однако другими авторами было обнаружено снижение высокого уровня кортикостерона

Рис. 3. Эффект метирапона (введение в дозе 30 мг/кг за 30 мин до капсаицина) на площадь эрозий, уровень кортикостерона и глюкозы в крови крыс с сенситизацией КЧН через 4 ч после введения индометацина в ульцерогенной дозе.

Veh – растворитель метирапона, Met – metyrapone, Vehicle – растворитель капсаицина. $p < 0.05$: * от Veh – Vehicle, # от Veh – Capsaicin 1мг/кг, + от соответствующей группы в Capsaicin 1 мг/кг. Число крыс в группе 10–12.

Fig. 3. The effect of metyrapone administration at the dose of 30 mg/kg (i.p., 30 min before capsaicin injection) on the gastric erosion, blood corticosterone and glucose level in the blood of rats with CSN sensitization 4 h after indomethacin administration (35 mg/kg).

Met – metyrapone, Veh – metyrapone vehicle , Vehicle – capsaicin vehicle. $p < 0.05$: * from Veh in Vehicle, # from Veh in Capsaicin 1 mg/kg, + from the appropriate group in Capsaicin 1 mg/kg. $n = 10–12$.


Gastric erosions, mm2
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0
*
#
*+
*+
Corticosterone, μg/dl
30
25
20
15
10
5
0
*
#
*
Glucose, mmol/dl
12
10
8
6
4
2
0
*
*+
*+
Veh
Met
Veh
Met
Veh
Met
Vehicle
Capsaicin, 1 mg/kg
Capsaicin, 10 mg/kg
Indomethacin, 35 mg/kg

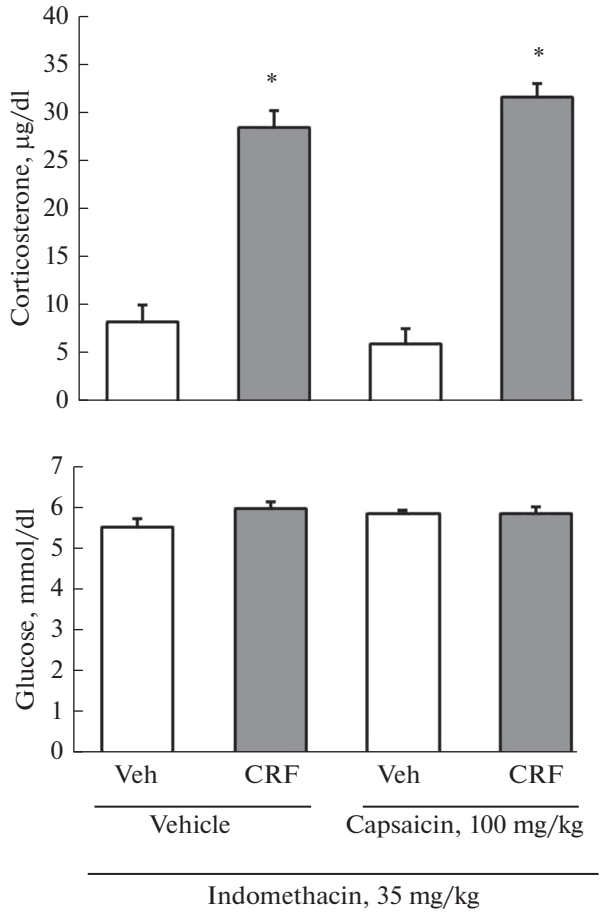


Рис. 4. Влияние КРФ (2.5 мг/кг, внутрибрюшинно) на уровень кортикостерона и глюкозы через 30 мин после его введения крысам с десенситизацией КЧН (введение капсаицина в общей дозе 100 мг/кг за 14 дней до эксперимента).

Veh – растворитель КРФ, Vehicle - растворитель капсаицина. $p < 0.05$: * – от Veh. Число крыс в группе 6.

Fig. 4. The effect of CRF (2,5 mg/kg, i.p.) on blood corticosterone and glucose level 30 min after its administration in rats with CSN desensitization (the administration of capsaicin in the total dose of 100 mg/kg) 14 day before experiment.

$p < 0.05$ * from Veh (0.9% NaCl). $n = 6$.

в крови, вызванного введением липополисахарида, после введения капсаицина в дозе 2 мг/кг [32]. Возможно, изменение стрессорного уровня кортикостерона под влиянием низких доз капсаицина зависит от вида и силы стрессорного фактора. Если работ о влиянии активации КЧН на ГГАКС недостаточно, чтобы сделать окончательный вывод о характере этого влияния, то исследования об участии глюкокортикоидов в гастропротективном эффекте сенситизации КЧН вообще нам не известны, что не позволяет сравнить полученные нами результаты с данными литературы.

Десенситизация КЧН – один из подходов для изучения роли этих нейронов в гастропротекции. При десенситизации КЧН происходит усугубление язвообразования в желудке при действии различных ульцерогенных факторов, в том числе и ин-

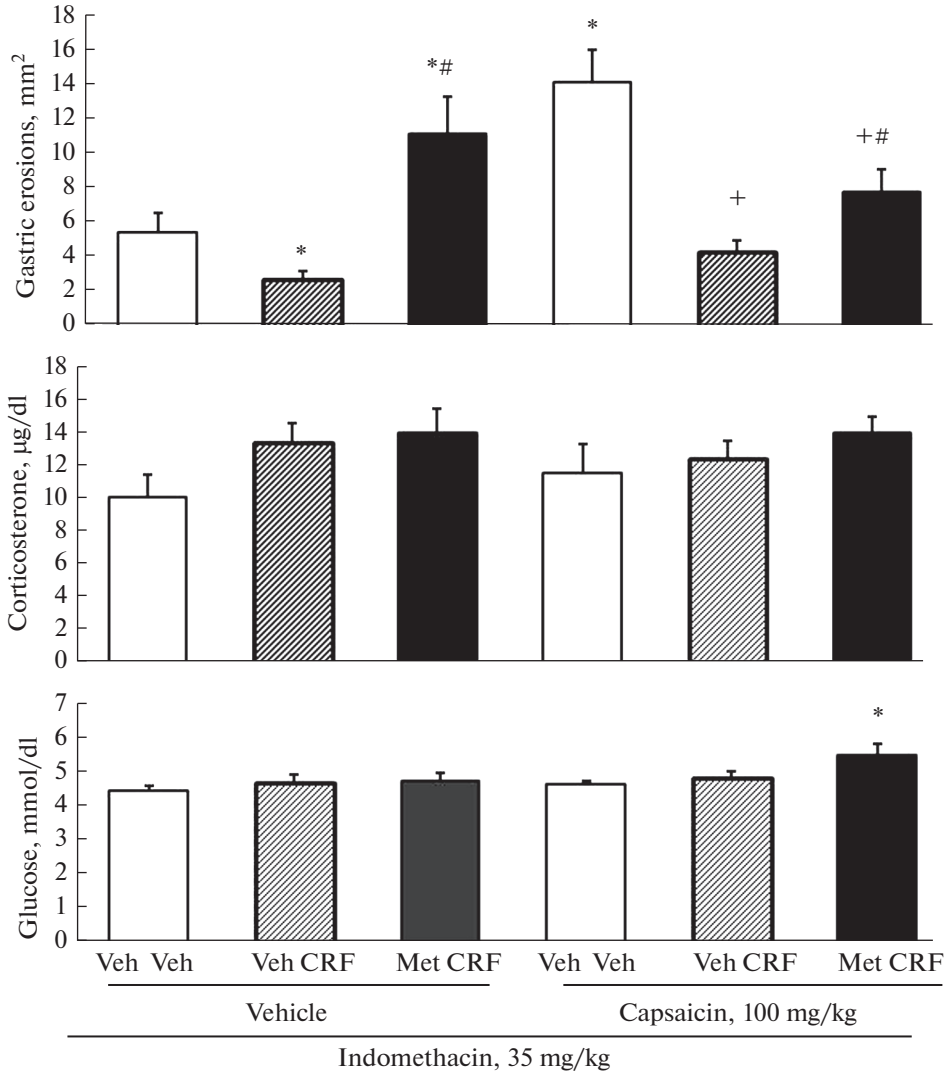


Рис. 5. Влияние метирапона (введение в дозе 30 мг/кг за 30 мин до КРФ) на гастропротективный эффект КРФ, уровень кортикостерона и глюкозы у крыс с десенситизацией КЧН и у контрольных крыс (введение растворителя капсаицина) через 4 ч после введения индометацина.

Veh Veh – растворители метирапона и КРФ, Veh CRF – растворитель метирапона + КРФ, Met CRF – метирапон + КРФ, Vehicle – растворитель капсаицина. $p < 0.05$: * от Veh Veh - Vehicle, # от Veh CRF – Vehicle и Capsaicin, + – от Veh Veh – Capsaicin. Число крыс в группе 10–12.

Fig. 5. The effect of metyrapone administration at the dose of 30 mg/kg (30 min before CRF administration) on the gastroprotective effect of CRF, blood corticosterone and glucose level in rats with desensitization of CSN and in control rats (the administration capsaicin vehicle) 4 h after indomethacin.

Veh Veh – metyrapone and CRF vehicle, Veh CRF – metyrapone vehicle + CRF, Met CRF – metyrapone + CRF. $p < 0.05$: * from Veh Veh in Vehicle, # from Veh CRF in Vehicle and Capsaicin groups, + from Veh Veh in Capsaicin. $n = 10–12$.

дометацина [6, 8, 9, 24]. Известно, что КРФ оказывает гастропротективный эффект у крыс при действии ульцерогенных стимулов [19, 25, 26]. В настоящей работе выясняли вопрос о том, сохранится ли защитный эффект КРФ на желудок при десенситизации КЧН. Результаты работы показали, что гастропротективный эффект КРФ у крыс с десенситизацией КЧН не только сохранился, но оказался даже более выраженным по сравнению с таковым у контрольных животных. В этой связи следует обратить внимание на удивительную устойчивость гастропротективного действия КРФ, которое было обнаружено нами в различных ульцерогенных моделях у интактных крыс [19, 25, 26], у крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом [27] и, наконец, у крыс с десенситизацией КЧН. Этот факт устойчивости гастропротективного эффекта КРФ сам по себе интересен и требует дальнейшего изучения.

Уровни кортикостерона и глюкозы у крыс с введением КРФ не изменились по сравнению с контролем в исследованной временной точке (через 4.5 ч после введения КРФ). В предварительных опытах было показано, что через 30 мин после введения КРФ уровень кортикостерона в крови в одинаковой степени повышается у контрольных крыс и у крыс с десенситизацией КЧН. Таким образом, десенситизация КЧН не влияла на реактивность нижних звеньев ГГАКС к КРФ, а также на уровень кортикостерона у контрольных крыс (без КРФ). Следует сказать, что данные литературы о влиянии десенситизации КЧН на активность гормонов ГГАКС очень немногочисленны и противоречивы [6, 33, 34]. Полученные нами результаты совпадают с некоторыми данными литературы [33, 34], в которых показано, что у крыс с десенситизацией КЧН и у контрольных животных не отличался ответ на внутривенное введение АКТГ или КРФ по уровню кортикостерона или АКТГ соответственно. В одной из работ у крыс с десенситизацией КЧН обнаружено снижение ответа ГГАКС на введение интерлейкина-1-бета или простагландина Е2 по уровню АКТГ [34]. Однако имеются данные и о стимулирующем эффекте десенситизации КЧН на ГГАКС [6].

Защитный эффект КРФ на желудок у контрольных крыс (с введением растворителя капсаицина) полностью устранялся введением метирапона. Эти результаты указывают на то, что гастропротективный эффект КРФ у контрольных крыс опосредуется кортикостероном и хорошо подтверждают полученные нами ранее данные [19, 25, 26]. У крыс с десенситизацией КЧН частично сохранялся гастропротективный эффект КРФ при введении метирапона, однако, этот эффект был значительно менее выраженным по сравнению с эффектом КРФ без метирапона. Представленные данные полностью совпадают с полученными ранее результатами исследования гастропротективного влияния КРФ при введении метирапона интактным крысам в стрессорной ульцерогенной модели [19]. Как и в указанной выше работе, мы делаем похожий вывод о том, что гастропротективный эффект КРФ у крыс с десенситизацией КЧН только частично обусловлен повышением уровня кортикостерона в крови. Возможно, изучение роли рецепторов КРФ в гастропротекции поможет лучше понять механизм защитного эффекта КРФ на желудок при десенситизации КЧН.

Таким образом, капсаицин, введенный в дозах 1 и 10 мг/кг, индуцировал гастропротективный эффект в обеих ульцерогенных моделях. Введение метирапона устраняло гастропротективный эффект сенситизации КЧН, вызванной введением капсаицина в дозе 1 мг/кг и не повлияло на гастропротективный эффект капсаицина при его введении в дозе 10 мг/кг. Введение КРФ крысам с десенситизацией КЧН оказывало гастропротективный эффект, который частично опосредовался кортикостероном.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-015-00514-а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Szolcsanyi J., Bartho L.* Capsaicin-sensitive afferents and their role in gastroprotection: an update. J. Physiol. (Paris). 95(1–6): 181–188. 2001.
2. *Holzer P.* Efferent-like roles of afferent neurons in the gut: blood flow regulation and tissue protection. Auton. Neurosci. 125(1–2): 70–75. 2006.
3. *Harada N., Okajima K.* Inhibition of neutrophil activation by lafutidine, an H2-receptor antagonist, through enhancement of sensory neuron activation contributes to the reduction of stress-induced gastric mucosal injury in rats. Dig. Dis. Sci. 52(2): 469–477. 2007.
4. *Kwiecien S., Magierowska K., Magierowski M., Surmiak M., Hubalewska-Mazgaj M., Pajdo R., Sliwowski Z., Chmura A., Wojcik D., Brzozowski T.* Role of sensory afferent nerve.s, lipid peroxidation and antioxidative enzymes in the carbon monoxide-induced gastroprotection against stress ulcerogenesis. J. Physiol. Pharmacol. 67(5): 717–729. 2016.
5. *Mózsik G.* Capsaicin as new orally applicable gastroprotective and therapeutic drug alone or in combination with nonsteroidal anti-inflammatory drugs in healthy human subjects and in patients. Prog. Drug Res. 68: 209–258. 2014.
6. *Бобрышев П.Ю., Подвигина Т.Т., Багаева Т.Р., Филаретова Л.П.* Компенсаторное гастропротективное действие глюкокортикоидных гормонов в условиях выключения функции капсаицин-чувствительных нейронов у крыс. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 92(8): 1006–1015. 2006. [*Bobryshev P.YU., Podvigina T.T., Bagaeva T.R., Filaretova L.P.* Compensatory gastroprotective action of glucocorticoid hormones in the rats with ablation of capsaicin-sensitive neurons. Russ. J. Physiol. 92(8): 1006–1015. 2006. (In Russ)].
7. *Mózsik G., Vincze A., Szolcsányi J.* Four response stages of capsaicin-sensitive primary afferent neurons to capsaicin and its analog: gastric acid secretion, gastric mucosal damage and protection. J. Gastroenterol. Hepatol. 16(10): 1093–1097. 2001.
8. *Filaretova L., Bobryshev P., Bagaeva T., Podvigina T., Takeuchi K.* Compensatory gastroprotective role of glucocorticoid hormones during inhibition of prostaglandin and nitric oxide production and desensitization of capsaicin-sensitive neurons. Inflammopharmacology. 15(4): 146–153. 2007.
9. *Филаретова Л.П., Ярушкина Н.И.* Капсаицин-чувствительные нейроны: роль в гастропротекции и регуляции болевой чувствительности. Успехи физиол. наук. 50(1): 3–16. 2019. [*Filaretova L.P., Yarushkina N.I.* Capsaicin sensitive neurons: role in gastroprotection and regulation of pain sensitivity. Usp. Fisiol. Nauk. 50(1): 3–16. 2019. (In Russ)].
10. *Holzer P.* Transient receptor potential (TRP) channels as drug targets for diseases of the digestive system. Pharmacol. Ther. 131(1): 142–170. 2011.
11. *Kunde D.A., Yingchoncharoen J., Jurković S., Geraghty D.P.* TRPV1 mediates capsaicin-stimulated metabolic activity but not cell death or inhibition of interleukin-1β release in human THP-1 monocytes. Toxicol. Appl. Pharmacol. 360: 9–17. 2018. https://doi.org/10.1016/j.taap.2018
12. *Konturek P.C., Brzozowski T., Walter B., Burnat G., Hess T., Hahn E.G., Konturek S.J.* Ghrelin-induced Gastroprotection Against Ischemia-Reperfusion Injury Involves an Activation of Sensory Afferent Nerves and Hyperemia Mediated by Nitric Oxide. Eur. J. Pharmacol. 536(1–2): 171–181. 2006.
13. *Sun F., Xiong S., Zhu Z.* Dietary capsaicin protects cardio metabolic organs from dysfunction. Nutrients. 8 (5): E174. 2016. https://doi.org/10.3390/nu8050174
14. *Takeuchi K., Kato S., Takeeda M., Ogawa Y., Nakashima M., Matsumoto M.* Facilitation by endogenous prostaglandins of capsaicin-induced protection in rodent through EP2 and IP receptors. J. Pharmacol. Exp. Ther. 304(3): 1055–1062. 2003.
15. *Garabadu D., Shah A., Ahmad A., Joshi V.B., Saxena B., Palit G., Krishnamurthy S.* Eugenol as an anti-stress agent: modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis and brain monoaminergic systems in a rat model of stress. Stress. 14(2): 145–155. 2011.
16. *Martínek J., Hlavova K., Zavada F., Seifert B., Rejchrt S., Urban O., Zavoral M.* "A surviving myth" – corticosteroids are still considered ulcerogenic by a majority of physicians. Scand. J. Gastroenterol. 45(10): 1156–1161. 2010.
17. *Filaretova L.P., Filaretov A.A., Makara G.B.* Corticosterone increase inhibits stress-induced gastric erosions in rats. Am. J. Physiol. 274(6): G1024–G1030. 1998.

18. *Филаретова Л.П.* Вклад глюкокортикоидных гормонов в гастропротекцию. Успехи физиол. наук. 45(1): 43–55. 2014. [*Filaretova L.P.* Contribution of glucocorticoid hormones to gastroprotection. Usp. Fisiol. Nauk. 45(1): 43–55. 2014. (In Russ)].

19. *Filaretova L., Bagaeva T., Morozova O.* Stress and stomach: corticotropin-releasing factor may protect the gastric mucosa through involvement of glucocorticoids. Cell. Mol. Neurobiol. 32(5): 829–836. 2012.

20. *Filaretova L., Podvigina T., Yaryshkina N.* Physiological and pharmacological effects of glucocorticoids on the gastrointestinal tract. Curr. Pharm. Des. V. 26. 2020. doi: . 2020 https://doi.org/10.2174/1381612826666200521142746

21. *Filaretova L., Podvigina T., Bagaeva T., Morozova O.* From gastroprotective to ulcerogenic effects of glucocorticoids: role of long-term glucocorticoid action. Curr. Pharm. Des. 20(7): 1045–1050. 2014.

22. *Podvigina T.T., Bobryshev P.Y., Bagaeva T.R., Mal'tsev N.A., Levkovich Y.I., Filaretova L.P.* The effects of desensitization of capsaicin-sensitive afferent neurons on the microcirculation in the stomach in rats depend on the blood glucocorticoid hormone level. Neurosci. Behav. Physiol. 39(6): 559–564. 2009.

23. *Morgan A.E., Lang C.H.* Involvement of capsaicin-sensitive nerves in regulating the hormone and glucose metabolic response to endotoxin. Am. J. Physiol. 273(2, Pt 1): E328–E335. 1997.

24. *Подвигина Т.Т., Морозова О.Ю., Солнушкин С.Д., Чихман В.Н., Филаретова Л.П.* Влияние сенситизации и десенситизации капсаицин-чувствительных нейронов на образование эрозий в слизистой оболочке желудка, индуцированных индометацином, у крыс: роль глюкокортикоидных гормонов. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.105(2): 225–237. 2019. [*Podvigina T.T., Morozova O.Yu., Solnushkin S.D., Chykhman V.N., Filaretova L.P.* Effect of sensitization and desensitization of capsaicin-sensitive neurons on the formation of gastric erosions induced by indomethacin in rats: the role of glucocorticoids. Russ. J. Physiol. 105(2): 225–237. 2019. (In Russ)].

25. *Filaretova L., Bagaeva T.* The realization of the brain-gut interactions with corticotropin releasing factor and glucocorticoids. Curr. Neuropharmacol. 14(8): 876–881. 2016.

26. *Филаретова Л.П.* Вклад кортикотропин-рилизинг фактора в гастропротекцию. Нейрохимия. 35(2): 122–125. 2018. *[Filaretova L.P.* Contribution of corticotropin releasing factor on gastroprotection. Neurochemistry. 35(2): 122–125. 2018. (In Russ)].

27. *Подвигина Т.Т., Морозова О.Ю., Багаева Т.Р., Филаретова Л.П.* Гастропротективный эффект кортикотропин-рилизинг фактора у крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 102(11): 1352–1362. 2016. [*Podvigina T.T., Bagaeva T.P., Filaretova L.P.* Gastroprotective effect of corticotropin-releasing factor in streptozotocin-induced diabetic rats. Russ. J. Physiol. 102(11): 1352–1362. 2016. (In Russ)].

28. *Солнушкин С.Д., Чихман В.Н.* Компьютерная обработка биологических изображений. Биомед. радиоэлектроника. 2: 35–40. 2018. [*Solnushkin S.D., Chikhman V.N.* Experience of biological images processing. Biomed. radioengineering. 2: 35–40. 2018. (In Russ.)]

29. *Cordero M.I., Kruyt N.D., Merino J.J., Sandi C.* Glucocorticoid involvement in memory formation in a rat model for traumatic memory. Stress. 5(1): 73–79. 2002.

30. *Bloom S.R., Edwards A.V., Jones C.T.* Adrenal responses to calcitonin gene-related peptide in conscious hypophysectomized calves. J. Physiol. 409: 29–41. 1989.

31. *Choi Y.J., Kim J.Y., Yoo S.B., Lee J.H., Jahng J.W.* Repeated oral administration of capsaicin increases anxiety-like behaviors with prolonged stress-response in rats. J. Biosci. 38(3): 561–571. 2013.

32. *Ferreira L.G., Prevatto J.P., Freitas H.R., Reis R.A.M., Silva P.M., Martins M.A., Faria R.X., Carvalho V.F.* Capsaicin inhibits lipopolysaccharide-induced adrenal steroidogenesis by raising intracellular calcium levels. Endocrine. 64(1): 169–175. 2019.

33. *Donnerer J., Lembeck F.* Different control of the adrenocorticotropin-corticosterone response and of prolactin secretion during cold stress, anesthesia, surgery, and nicotine injection in the rat: involvement of capsaicin-sensitive sensory neurons. Endocrinology. 126(2): 921–926. 1990.

34. *Watanabe T., Morimoto A., Tan N., Makisumi T., Shimada S.G., Nakamori T., Murakami N.* ACTH response induced in capsaicin-desensitized rats by intravenous injection of interleukin-1 or prostaglandin. Eur. J. Physiol. 475(1): 139–145. 1994.

Participation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical System Hormones in Gastroprotection in Rats with Sensitisation and Desensitization of Capsaicin-Sensitive Afferent Neurons

T. T. Podvigina[a], *, O. Yu. Morozova[a], O. P. Komkova[a], and L. P. Filaretova[a]

[a] *Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*
**e-mail: tpodvigina@yandex.ru*

The aim of this work was to study: a) the contribution of glucocorticoids to gastroprotection induced by sensitization of capsaicin-sensitive afferent neurons (CSN), b) gastroprotective effect of corticotropin-releasing factor (CRF) in rats with desensitization of CSN and possible corticosterone participation in this effect. The study was performed in male Sprague Dawley rats weighing 260–300 g. The immobilization at 10°C (3 h) or indomethacin (35 mg/kg) were used as ulcerogenic stimuli. Sensitization of CSN was induced by administration of capsaicin at the doses of 1 and 10 mg/kg, 1h before the onset of ulcerogenic stimulus. Desensitization was performed by administration of capsaicin in a total dose of 100 mg/kg (20 + 30 + 50) in 3 subsequent days, 2 weeks before the start of the experiment. CRF was injected at the dose of 2.5 mg/kg, i. p., 30 minutes before indomethacin in rats with CSN desensitization. To estimate the involvement of corticosterone in the gastroprotective effects, metyrapone (inhibitor of glucocorticoid synthesis) at the dose of 30 mg/kg was used. Capsaicin, administered at doses of 1 and 10 mg/kg, caused a gastroprotective effect in both ulcerogenic models. The metyrapone administration 30 minutes before capsaicin eliminated its gastroprotective effect for the 1 mg/kg dose, but not 10 mg/kg dose. The CRF administration caused a gastroprotective effect in both control rats, and rats with CSN desensitization. The results obtained in experiments with metyrapone indicate that CRF gastroprotective effect observed in rats with desensitization of CSN are at least partially mediated by corticosterone.

Keywords: capsaicin-sensitive afferent neurons, glucocorticoids, corticotropin-releasing factor, gastric erosions, gastroprotection, glucose, metyrapone

ЦИТИРОВАТЬ:

Подвигина Т.Т., Морозова О.Ю., Комкова О.П., Филаретова Л.П. Участие гормонов гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы крыс в гастропротекции при сенситисации и десенситизации капсаицин-чувствительных афферентных нейронов. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(11): 1385–1399.

DOI: 10.31857/S0869813920110072

TO CITE THIS ARTICLE:

Podvigina T.T., Morozova O.Yu., Komkova O.P., Filaretova L.P. Participation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system hormones in gastroprotection in rats with sensitisation and desensitization of capsaicin-sensitive afferent neurons. Russian Journal of Physiology. 106(11): 1385–1399.

DOI: 10.31857/S0869813920110072

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 11, с. 1400–1411

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИРОВАНИЯ ЦИКЛООКСИГЕНАЗНЫХ ПУТЕЙ НА РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К НАРАСТАЮЩЕЙ ГИПОКСИИ У КРЫС С ПОВЫШЕННЫМ УРОВНЕМ ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 БЕТА

© 2020 г. Ж. А. Донина[1], *, Е. В. Баранова[1], Н. П. Александрова[1]

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

Поступила в редакцию 23.04.2020 г.
После доработки 15.09.2020 г.
Принята к публикации 20.09.2020 г.

В настоящее время актуальной проблемой физиологии и медицины критических состояний является выяснение механизмов влияния гиперцитокинемии, развивающейся при острых вирусных и бактериальных инфекциях, на развитие дыхательной недостаточности и устойчивость организма к быстро нарастающей гипоксии. Целью настоящего исследования явилось выявление участия циклооксигеназных путей в формировании реакций респираторной системы и резистентности к нарастающей гипоксии на фоне повышенного системного уровня интерлейкина-1β (IL-1β), являющегося ключевым воспалительным медиатором в острой фазе развития системной воспалительной реакции. Исследование проведено на 4-х группах наркотизированных крыс линии Вистар (n = 48) с внутривенным введением: физиологического раствора (контроль), неселективного ингибитора циклооксигеназ диклофенака (1.5 мг/кг), IL-1β (500 нг в 1 мл 0.9%-ного NaCl) и сочетанного введения диклофенака и IL-1β. Все группы животных подвергались действию нарастающей гипоксии, которая создавалась методом “возвратного дыхания”. Продолжительность гипоксического воздействия составляла несколько минут: от нормоксии до остановки дыхания (апноэ). Полученные результаты показали, что повышение системного уровня IL-1β усугубляет действие острой, быстро нарастающей гипоксии, вызывая более значительное снижение содержания кислорода в артериальной крови, связанное с резким уменьшением прироста вентиляции в ответ на действие гипоксического стимула. При этом наблюдается выраженное подавляющее влияние IL-1β на увеличение инспираторных колебаний внутригрудного давления на прирост дыхательного объема при гипоксическом воздействии. Кроме того, повышение системного уровня IL-1β ускоряет остановку дыхания, вызванную острой гипоксией. Апноэ возникает при меньшем уровне гипоксической стимуляции и заканчивается летальным исходом у всех животных данной экспериментальной группы. Предварительное ингибирование циклооксигеназной активности диклофенаком уменьшает угнетающее влияние IL-1β на гипоксический ответ респираторной системы, повышает уровень оксигенации артериальной крови до контрольных значений и увеличивает выживаемость в постгипоксическом периоде. Сделан вывод о том, что активация циклооксигеназных путей при действии провоспалительных цитокинов может быть одним из основных механизмов, опосредующих их влияние на респираторную функцию и резистентность к нарастающей гипоксии.

Ключевые слова: интерлейкин-1β, респираторная система, гипоксемия, апноэ, циклооксигеназа

DOI: 10.31857/S0869813920110047

Значительный интерес для физиологии и медицины представляют исследования гипоксических состояний. Изучению стабильного кратковременного или хронического влияния гипоксии на функциональное состояние здорового организма посвящено большое количество исследований [1–4]. В ряде работ показано положительное влияние определенных режимов интервальной гипоксической тренировки на кардиореспираторную систему [5, 6]. Вместе с тем при тяжелых патологических состояниях, сопровождающихся развитием дыхательной недостаточности, стремительно развивающаяся гипоксия часто приводит к возникновению угрожающих для жизни состояний. Известно, что респираторный дистресс-синдром, характеризующийся острой дыхательной недостаточностью, сопровождается развитием системной воспалительной реакции, в основе которой лежит резкое увеличение системного уровня провоспалительных цитокинов. Актуальным представляется выяснение механизмов влияния провоспалительных цитокинов на развитие дыхательной недостаточности и устойчивость организма к быстро нарастающей острой гипоксии.

Как известно, системная воспалительная реакция является неспецифическим универсальным ответом организма на внедрение патогенных агентов, в том числе, вирусной или бактериальной инфекции. Механизмом активации воспалительного процесса является массивная продукция провоспалительных цитокинов (IL-1β, IL-6, ФНО-α) и других медиаторов воспаления, которым в прогрессировании системной воспалительной реакции принадлежит ключевая роль [7, 8]. В ряде экспериментальных работ показано, что цитокины принимают участие в нейроиммунных взаимодействиях в центральной нервной системе. Рецепторы IL-1β и ФНО-α обнаружены в микроглии, нейронах, астроцитах и эндотелиальных клетках сосудов во многих областях мозга, в том числе, в тех, которые участвуют в центральной регуляции респираторной функции – ядре солитарного тракта и вентролатеральном отделе продолговатого мозга [8–10, 12, 13]. Влияние цитокинов на физиологические функции может быть опосредовано несколькими способами: высвобождением простагландинов, норэпинефрина, рилизинг-фактора кортикотропина, оксида азота [14–16]. В наших предыдущих исследованиях было установлено участие провоспалительного цитокина IL-1β в центральных механизмах гиперкапнических и гипоксических дыхательных хеморефлексов [17, 18]. Кроме того, результаты, полученные с применением неселективного блокатора синтазы оксида азота (NOS) L-NAME показали, что снижение резистентности к острой гипоксии при повышенном системном уровне IL-1β сопровождается изменением функционального состояния вазомоторного центра, обусловленного влиянием NO-зависимых механизмов на нейроны мозгового ствола [19]. Однако при развитии нарастающей острой гипоксии на фоне действия IL-1β наблюдалось изменение реакции на гипоксию не только со стороны сердечно-сосудистой, но и со стороны дыхательной системы. Вместе с тем, блокада NOS не оказывала влияния на изменение вентиляционных параметров при действии гипоксии на фоне повышенного системного уровня IL-1β. В результате было сделано предположение, что действие IL-1β на дыхательную систему, которое тоже может влиять на устойчивость организма к острой гипоксии, реализуется посредством других медиаторов воспаления, среди которых возможными кандидатами являются простагландины.

Целью настоящего исследования явилось выявление участия циклооксигеназных путей в формировании реакций респираторной системы и резистентности к нарастающей гипоксии на фоне повышенного системного уровня IL-1β, являющегося ключевым воспалительным медиатором в острой фазе развития системной воспалительной реакции.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена на животных из биоколлекции “Коллекция лабораторных млекопитающих разной таксономической принадлежности” Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, поддержанной программой биоресурсных коллекций ФАНО России. Исследование проводилось в соответствии с принципами Базельской декларации об использовании животных для экспериментальных исследований, а также рекомендациями биоэтического комитета ФГБУН Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (заключение № 02/04 от 06 апреля 2020 г.).

Опыты выполнены на 48 крысах-самцах линии Вистар массой 280–300 г, наркотизированных внутрибрюшинным введением уретана (1000 мг/кг). Уретан часто используется в ветеринарии, а также при проведении острых экспериментов на лабораторных животных. Использование уретана в данной работе обосновано тем, что он вызывает наркоз без стадии двигательного возбуждения, с малыми отклонениями со стороны дыхания и сердечно-сосудистой системы. Препарат обладает длительным стабильным действием, что позволяет поддерживать основные показатели функционального состояния животного (величину артериального давления, частоту сердечных сокращений, глубину дыхания) на постоянном уровне в течение всего эксперимента.

В процессе хирургической подготовки животных производилась имплантация катетеров в бедренную вену, введение трахеостомической канюли и внутрипищеводного зонда. Животные были случайным образом разделены на 4 группы по 12 крыс в каждой. В процессе исследования было поставлено 4 серии экспериментов. В 1-ой серии контрольной группе крыс вводили физиологический раствор (1 мл 0.9%-ного раствора NaCl). Во 2-ой серии животным второй группы вводился неселективный блокатор циклооксигеназы (COX) – диклофенак (ОАО “Синтез”, Россия) из расчета 1.5 мг/кг. Неселективность диклофенака проявляется в том, что он ингибирует оба изофермента циклооксигеназы – и COX-1 и COX-2. Однако достоверно установлено, что при действии диклофенака в гораздо большей степени ингибируется COX-2, которая образуется под воздействием цитокинов, запускающих воспалительную реакцию. Третьей группе крыс вводился провоспалительный цитокин интерлейкин-1β (IL-1β) в количестве 500 нг в 1 мл 0.9%-ного раствора NaCl. Четвертой группе животных IL-1β вводился после предварительного введения диклофенака. Все применяемые препараты вводились в бедренную вену в объеме 1 мл.

Протокол эксперимента был следующим: по истечении 70 мин после введения препаратов и регистрации фоновых значений в нормоксических условиях животных переключали на систему “возвратного дыхания”, описанную ранее [19], и начинали тестирование нарастающей гипоксии (от нормоксии до полной остановки дыхания). При возвратном дыхании избыток CO_2 поглощался адсорбентом. После апноэ крыс отключали от гипоксического воздействия. Эвтаназию животных после окончания эксперимента осуществляли передозировкой уретана.

Регистрировали: фракционное содержание O_2 во вдыхаемой газовой смеси (F_{IO2}), продолжительность дыхания гипоксической смесью до наступления апноэ (время жизни), длительность гипоксического апноэ до спонтанного появления первого вдоха – время восстановления, выживаемость в постгипоксическом периоде в % от контроля. В ходе эксперимента непрерывно проводилась регистрация параметров внешнего дыхания. Для измерения объемной скорости инспираторного потока (Vi), величины дыхательного объема и частоты дыхания использовался метод пневмотахографии. Минутный объем дыхания вычислялся как произведение величины дыхательного объема и количества дыхательных движений за одну минуту. Для оценки силы сокращений инспираторных мышц регистрировались инспираторные ко-

Таблица 1. Параметры дыхания при введении NaCl, диклофенака и IL-1β в условиях нормоксии
Table 1. Respiratory variables during normoxia after administration NaCl, diclofenac and IL-1β

Показатели Variables	Контроль NaCl Control	Диклофенак Diclofenac	IL-1β IL-1β
Дыхательный объем, мл Tidal volume, ml	0.95 ± 0.20	0.93 ± 0.12	2.3 ± 0.1*
Частота дыхания, мин$^{-1}$ Breathing frequency, min^{-1}	80 ± 4	82 ± 3	93 ± 2
Минутный объем дыхания, мл/мин Minute ventilation, ml/min	76 ± 3	76 ± 2	214 ± 6*
Внутригрудное давление, см водн.ст. Esophageal pressure, cm H_2O	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1

В таблице приводятся среднее арифметическое и ошибка среднего ($M \pm m$). * $p < 0.05$ по сравнению с контролем. Число животных в каждой группе равно12.
Table 1 show that in normoxic rats administration of IL-1β evokes significantly increase in tidal volume and minute ventilation. Diclofenac had no effect on lung ventilation and its components. Data are presented as mean ± SEM. * $p < 0.05$ compared with control. The number of animals in each group is 12.

лебания внутригрудного давления с помощью баллонографического метода. Инспираторные колебания внутригрудного давления преобразовывались в электрический сигнал при помощи электроманометра ПДП-1000. Непрерывный мониторинг насыщения крови кислородом (SpO_2%) проводился методом пульсоксиметрии, используя ветеринарный пульсоксиметр типа UT (Zoomed, Россия). Фракционное содержание (F_IO_2) кислорода и углекислого газа (F_ICO_2) в выдыхаемой газовой смеси измерялось соответственно газоанализатором кислорода ПГК-06 (Инсовт, Санкт-Петербург) и газоанализатором МАГ-6П (Эксис, Москва). Сигналы пневмотахограммы и внутригрудного давления оцифровывались и сохранялись на твердом диске персонального компьютера при помощи аппаратно-программного комплекса, созданного на основе устройства сбора биологических данных Biograf-7 (разработка ГУАП, Санкт-Петербург, Россия).

Статистический анализ данных производился с использованием программы Statistica 6.0 (Windows). Вычислялась средняя величина и ошибка средней регистрируемых показателей ($M \pm m$). Достоверность различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0.05$. Сравнительную оценку исследуемых параметров проводили при максимальной гипоксической стимуляции на уровне 10% O_2. Сравнения производились между контрольной и всеми экспериментальными группами, а также между 3-ей (введение IL-1β) и 4-ой (введение IL-1β на фоне действия диклофенака) экспериментальными группами.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установлено, что введение IL-1β в нормоксических условиях при дыхании воздухом вызывало достоверное увеличение дыхательного объема (на 140 ± 12%) и минутного объема дыхания (на 182 ± 19%). Наблюдалась также незначительная тенденция к увеличению частоты дыхания. Введение диклофенака не оказывало влияния на параметры внешнего дыхания (табл. 1).

При действии нарастающей гипоксии характер динамики минутного объема дыхания во всех группах животных имел сходную направленность. При умеренной степени гипоксии (F_{IO2} = 17–15%) отмечалось нарастание легочной вентиляции, углубление тяжести гипоксии (F_{IO2} = 15–8%) сопровождалось постепенным снижением минутного объема дыхания в результате уменьшения дыхательного объема

и частоты дыхания. Дальнейшее падение концентрации O_2 во вдыхаемой газовой смеси приводило к еще большему угнетению легочной вентиляции, развитию терминального типа дыхания, появлению гаспингов – редких и резких судорожных вдохов, переходящих в апноэ. В процессе нарастания гипоксии остановка дыхания в контроле и в разных экспериментальных группах происходила при различном содержании O_2 во вдыхаемой газовой смеси.

Сравнительная оценка реакций исследованных параметров у разных групп животных проводилась при одинаковом уровне гипоксической стимуляции (F_{IO2} = 10%). Как показано на рис. 1, прирост минутного объема дыхания при данном уровне гипоксии у крыс контрольной группы составлял 80 ± 3% по сравнению с дыханием воздухом ($p < 0.05$). Введение IL-1β угнетало вентиляционную реакцию на гипоксию, минутный объем дыхания возрастал всего на 7 ± 1% ($p < 0.05$). На фоне действия диклофенака влияние IL-1β ослабевало, угнетение вентиляционной реакции на гипоксию было выражено в меньшей степени: минутный объем дыхания возрастал на 42 ± 5% по сравнению с его величиной при дыхании воздухом ($p < 0.05$). Следует отметить, что во всех экспериментальных группах угнетение прироста минутного объема дыхания происходило, прежде всего, за счет уменьшения прироста дыхательного объема. Изменение частотного компонента вентиляционной реакции в группе с введением IL-1β достоверно не отличалось от контроля. Предварительное введение диклофенака ослабляло влияние IL-1β: в группе животных с совместным введением этих препаратов снижение прироста дыхательного объема и уменьшение частоты дыхания при гипоксии были достоверно ниже, чем при введении только IL-1β (рис. 1*A*, *B*).

В группе с введением IL-1β по сравнению с контрольной группой наблюдалось также достоверное снижение прироста величины инспираторных колебаний внутригрудного давления в ответ на гипоксическое воздействие. Так, если в контроле при данной степени гипоксии инспираторные колебания внутригрудного давления возрастали на 170 ± 23%, т.е. более чем в два раза, то при действии IL-1β прирост снижался до 20 ± 8%. Введение IL-1β на фоне действия диклофенака не вызывало достоверного уменьшения прироста инспираторных колебаний внутригрудного давления, отражающих силу сокращений инспираторных мышц (рис. 1*D*).

При гипоксической стимуляции (F_{IO2} = 10%) у всех групп животных наблюдалось снижение насыщения артериальной крови кислородом по сравнению с нормоксией (рис. 2). При этом в группе с введением IL-1β падение сатурации O_2 крови оказалось более выраженным, чем в остальных группах: SpO_2 снижалась до 56 ± 3%. У крыс с предварительным введением диклофенака действие IL-1β не оказывало дополнительного эффекта: SpO_2 при гипоксической стимуляции снижался до 69 ± 3%, так же, как и в контрольной группе.

Экспериментальные данные, характеризующие резистентность к острой гипоксии, показали, что влияние IL-1β в условиях нарастающей гипоксии в 1.5 раза сокращало продолжительность периода дыхания до точки апноэ по сравнению с контрольной группой. Остановка дыхания происходила при меньшей степени гипоксии: F_{IO2} в 2.4 раза превышало соответствующее значение в контрольной группе животных. Длительность апноэ у животных, самостоятельно восстановивших дыхание, имела тенденцию к уменьшению по сравнению с остальными группами. Однако, несмотря на это, в группе с повышенным уровнем IL-1β спонтанное восстановление дыхания после снятия гипоксической нагрузки наблюдалось только у 50% животных. В группе крыс, которым IL-1β вводился на фоне действия диклофенака, достоверных изменений регистрируемых параметров по сравнению с контрольными значениями не наблюдалось, у всех животных происходило восстановление дыхания (табл. 2).

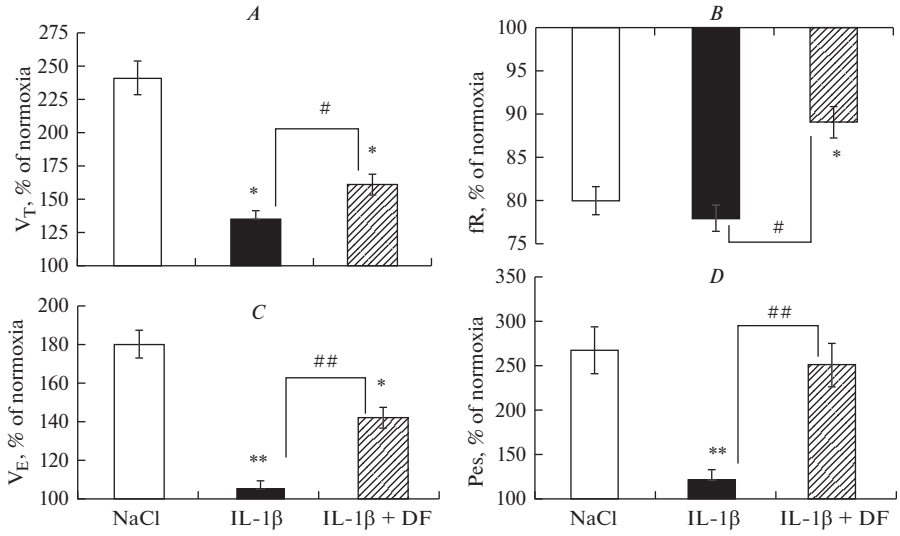


Рис. 1. Изменения параметров внешнего дыхания при гипоксической стимуляции у крыс контрольной группы (NaCl), группы с введением IL-1β и группы с введением IL-1β на фоне действия диклофенака (IL-1β + DF) (F_{IO2} = 10%) по сравнению с нормоксическим дыханием (F_{IO2} = 21%). По оси абсцисс: исследуемые группы.

По оси ординат: *A* – дыхательный объем (V_T); *B* – частота дыхания (fR); *C* – минутный объем дыхания (V_E); *D* – инспираторные колебания внутригрудного давления (Pes). За 100% принята величина параметров при дыхании воздухом (F_{IO2} = 21%).

**p* < 0.05; ***p* < 0.001 по сравнению с контролем; #*p* < 0.05; ##*p* < 0.001 между экспериментальными группами. Число животных в каждой группе равно 12.

Fig. 1. Changes in the respiratory parameters under hypoxic stimulation (F_{IO2} = 10%) in rats of the control group (NaCl), the group with the administration of IL-1β only and the group with the administration of IL-1β whith diclofenac (IL-1β + DF) compared with normoxic respiration (F_{IO2} = 21%).

Panel *A* – V_T (tidal volume), *B* – fR (frequency rate), *C* – V_E (minute ventilation), *D* – Pes (inspiratory swings of esophageal pressure). Data are presented as mean ± SEM. The value of parameters for breathing air (F_{IO2} = 21%) is taken as 100%.

**p* < 0.05; ***p* < 0.001 compared to control, #*p* < 0.05; ##*p* < 0.001 differences between the experimental groups. IL-1β significantly decreases the ventilatory response to acute hypoxia. A non-selective cyclooxygenase inhibitor diclofenac reduces the depressive effects of IL-1β on the hypoxic ventilatory response). The number of animals in each group is 12.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что повышение системного уровня IL-1β усугубляет действие острой быстро нарастающей гипоксии, вызывая более значительное снижение содержания кислорода в артериальной крови. Так, после введения IL-1β уменьшение фракционного содержания кислорода в дыхательной газовой смеси до 10% вызывало снижение сатурации артериальной крови до 56 ± 3%, тогда как в группе животных с нормальным уровнем IL-1β при таком же снижении кислорода в дыхательной смеси сатурация уменьшалась только до 69 ± 3%. Более значительный уровень гипоксемии при действии IL-1β был связан с резким уменьшением прироста минутного объема дыхания в ответ на действие гипоксиче-

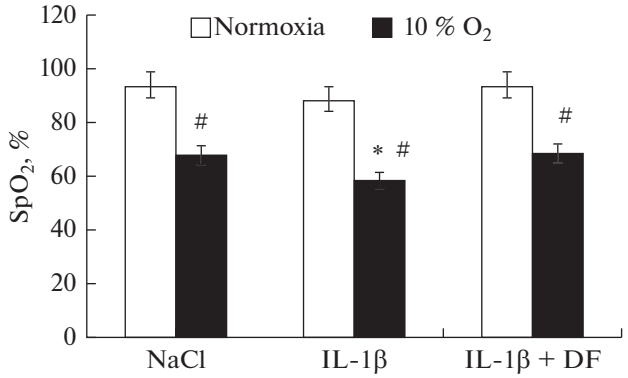


Рис. 2. Снижение насыщения артериальной крови кислородом при гипоксической стимуляции (F_{IO2} = 10%) у крыс контрольной группы (NaCl), группы с повышенным уровнем IL-1β (IL-1β) и введением IL-1β на фоне действия диклофенака (IL-1β + DF). Число животных в каждой группе равно12.

#$p < 0.01$ по сравнению с нормоксией; *$p < 0.05$ по сравнению с действием гипоксии в контрольной группе и в группе с предварительным введением диклофенака.

Fig. 2. Oxygen saturation at acute hypoxia (F_{IO2} = 10%) in control rats (NaCl), after administration of IL-1β only and IL-1β with diclofenac. Data are presented as mean ± SEM.

#$p < 0.01$ compared to normoxia; *$p < 0.05$ compared with the effect of hypoxia in the control group and in the group with preliminary administration of diclofenac. At hypoxic stimulation was observed a decrease in SpO_2 in all groups of animals compared with normoxia. In group with administration of IL-1β, a decrease in arterial blood saturation was more pronounced compared to other groups. The number of animals in each group is 12.

ского стимула. Как известно, изменение минутного объема дыхания является наиболее эффективным приспособительным механизмом, обеспечивающим адекватный транспорт кислорода в ткани [20]. Минутный объем дыхания отражает уровень вентиляции легких и является интегральным показателем, величина которого зависит от дыхательного объема и частоты дыхания. Величина дыхательного объема, в свою очередь, связана с величиной инспираторных колебаний внутригрудного давления, которые являются показателем силы сокращений инспираторных мышц. Полученные данные указывают на то, что повышение системного уровня IL-1β ска-

Таблица 2. Параметры гипоксической резистентности у крыс контрольной группы (NaCl), после введения IL-1β и после введения IL-1β с диклофенаком

Table 2. The parameters of hypoxic resistance in control rats (NaCl), after administration of IL-1β only, and IL-1β with diclofenac

Экспериментальные группы Experimental groups	Продолжительность дыхания до апноэ, мин Appearance time of apnea, min	F_{IO2} в точке апноэ, % F_{IO2} at apnea point, %	Длительность апное, с Apnea duration, s	Выживаемость, % Survival, %
NaCl	9.2 ± 0.8	3.4 ± 0.9	44.2 ± 1.5	100 ± 2
IL-1β	5.9 ± 0.9*#	8.5 ± 0.8*#	31.4 ± 0.3*	50 ± 1*#
IL-1β + DF	8.5 ± 0.8	3.5 ± 0.9	35.7 ± 1.0	100 ± 1

* $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой (NaCl); # $p < 0.05$ по сравнению с группой, которой IL-1β вводился на фоне действия диклофенака (IL-1β + DF). Число животных в каждой группе равно 12.

Data are presented as mean ± SEM. * $p < 0.05$ compared with control (NaCl); # $p < 0.05$ compared with the group, which received IL-1β with diclofenac (IL-1β + DF). The number of animals in each group is 12.

Administration of IL-1β reduced the respiratory duration from normoxia to apnea by 1.5 times. Respiratory arrest occurred in a lesser degree of hypoxia. The duration time of apnea tended to decrease compared to other groups, however spontaneous respiration recovery was observed only in 50% of the animals.)

зывается в основном на объемном компоненте вентиляционной реакции на гипоксию. При этом наблюдается выраженное подавляющее влияние IL-1β на увеличение силы сокращений дыхательных мышц, а соответственно и на прирост дыхательного объема при гипоксическом воздействии. В экспериментальной группе с введением IL-1β снижение O_2 в дыхательной смеси до 10% вызывало увеличение дыхательного объема только на 35 ± 8%, а инспираторных колебаний внутригрудного давления на 20 ± 8%, тогда как в контрольной группе величина этих параметров возрастала на 140 ± 13% и на170 ± 23% соответственно (рис. 1).

Непосредственные причины артериальной гипоксемии могут быть множественными [21]. Это и гиповентиляция, и уменьшение содержания кислорода во вдыхаемом газе, и шунтирование крови в легких, и нарушение диффузионной способности легких. В нашем исследовании причиной артериальной гипоксемии в контрольной группе животных было постепенное снижение содержания кислорода в дыхательной газовой смеси, вызванное возвратным дыханием. Усиление же степени гипоксемии при повышенном уровне IL-1β имело другую причину и было связано с гиповентиляцией. Снижение вентиляционного ответа на гипоксический стимул при повышении системного уровня IL-1β, обнаруженное в данном исследовании, дополняет и подтверждает результаты, полученные нами в других экспериментальных условиях [17, 18].

Анализируя полученный материал, прежде всего, следует учитывать, что прирост легочной вентиляции в ответ на гипоксическую стимуляцию является рефлекторной реакцией, опосредуемой синокаротидными и аортальными хеморецепторами [22, 23]. Это позволяет предполагать, что ослабление компенсаторного роста вентиляции могло быть обусловлено изменением функционального состояния периферических хеморецепторов, вызванным действием IL-1β. Тем более, что в ряде исследований было установлено, что основные провоспалительные цитокины (IL-1β, TNF-α, IL-6) и их рецепторы экспрессируются в гломусных клетках каротидного тела, выполняющего хеморецепторную функцию [22, 23]. Однако, стимулируя гломусные клетки и увеличивая фоновую активность каротидного синусного нерва, цитокины в то же самое время снижают его хемочувствительность [10, 11, 22]. Этот механизм действия провоспалительных цитокинов может лежать в основе обнаруженного нами снижения эффективности вентиляторной реакции на острую гипоксию при увеличении системного уровня IL-1β. Кроме того, уменьшение силы сокращений дыхательных мышц, выявленное в проведенном исследовании, приводящее к снижению гипоксического прироста вентиляции, могло быть вызвано влиянием IL-1β на медуллярные инспираторные нейроны и ослаблением центральной инспираторной активности. Рецепторы IL-1β обнаружены на многих клеточных элементах мозга: нейронах, микроглии, астроцитах, эндотелиальных клетках церебральных сосудов [9, 10]. Значительное количество функционально активных рецепторов основных провоспалительных цитокинов IL-1β и ФНО-α обнаружено в ядре одиночного тракта (NTS), в области которого расположена дорсальная респираторная группа нейронов дыхательного центра [8, 12]. Хотя молекулы цитокинов являются достаточно крупными гидрофильными полипептидами, которые не могут легко проходить через гематоэнцефалический барьер, тем не менее, они могут оказывать центральный эффект даже при периферическом введении. Центральный респираторный эффект при системном действии интерлейкина может реализовываться через посредство вторичных мессенджеров, например, простагландинов, которые в большом количестве экспрессируются клетками эндотелия мозговых сосудов при активации имеющихся здесь рецепторов IL-1β [24–26]. В отличие от цитокинов, простагландины являются более мелкими молекулами, которые могут легко проходить через плазмолемму и гематоэнцефалический барьер и оказывать действие на клетки ЦНС. Рецепторы PGE2, такие как EP3R, интенсивно

экспрессируются в связанных с дыханием областях ствола мозга [27, 28]. Кроме того, простагландины могут опосредовать действие воспалительных цитокинов и на периферическую хеморецепцию, участвуя в модуляции активности каротидных тел. Установлено, что гломусные клетки продуцируют PGE2 и цитокины воспаления (IL-1β, IL-6, TNF-α) с соответствующими рецепторами. Эти факторы модулируют возбудимость гломусных клеток, высвобождение катехоламинов и разряды хеморецепторов [29]. Было показано, что применение противовоспалительных препаратов (ибупрофена или дексаметазона) блокировало инвазию иммунных клеток, значительно уменьшало индуцированную гипоксией экспрессию цитокинов в области каротидного синуса и восстанавливало хемосенсорную чувствительность [30].

Как известно, простагландины продуцируются последовательным действием изоформ циклооксигеназы (COX-1 и COX-2), которые метаболизируют арахидоновую кислоту [31]. В этом исследовании мы показали, что ингибирование циклооксигеназных путей, угнетающее синтез простагландинов, ослабляет влияние IL-1β на прирост легочной вентиляции при действии острой гипоксии. Так, если при действии IL-1β минутный объем дыхания при снижении кислорода в дыхательной смеси до 10% возрастал только на 7% по сравнению с контролем, то при сочетанном действии IL-1β с диклофенаком отмечалось восстановление прироста минутного объема дыхания при таком же гипоксическом воздействии до 42% от контроля. Кроме того, наши предыдущие исследования показали участие циклооксигеназных путей в реализации влияний повышенного церебрального уровня IL-1β на гипоксическую хеморецепцию [18]. Представленные нами данные подтверждают мнение о том, что простагландины участвуют в респираторных эффектах циркулирующего IL-1β.

Представленные в статье данные указывают также на то, что повышение системного уровня IL-1β ускоряет остановку дыхания, вызванную острым гипоксическим воздействием. Апноэ возникает при меньшем уровне гипоксической стимуляции и заканчивается летальным исходом у всех животных данной экспериментальной группы. Предварительное ингибирование циклооксигеназной активности удлиняет временной период до возникновения апноэ и восстанавливает процент выживаемости при действии IL-1β до контрольного уровня (50%). Полученные данные соответствуют результатам экспериментальных исследований, направленных на изучение синдрома внезапной детской смерти, который наблюдается у недоношенных младенцев с воспалительными заболеваниями [16, 32, 33]. Однако эти исследования проводились на новорожденных животных, у которых еще не в полной мере развиты центральные механизмы регуляции дыхания, к тому же использовалось аноксическое воздействие (вдыхание азота). Постепенно нарастающее гипоксическое воздействие, которое применялось в нашей работе, выполненной на взрослых животных, в большей степени соответствует патогенезу острой дыхательной недостаточности. На основании полученных данных мы предполагаем, что развитие гиперцитокинемии, так называемый “цитокиновый шторм”, может стать одной из существенных причин развития критических состояний, приводящих к летальному исходу вследствие остановки дыхания. Активация циклооксигеназных путей при действии провоспалительных цитокинов может быть одним из основных механизмов, опосредующих их влияние на респираторную функцию и резистентность к нарастающей гипоксии.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2013–2020 гг. (ГП-14, раздел 65.2).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Сосин Д.В., Шалаева О.В., Евсеев А.В., Шабанов П.Д.* Механизмы формирования острой экзогенной гипоксии и возможности ее фармакологической коррекции антигипоксантами. Обзоры по клин. фармакол. и лекарств. терапии. 13(1): 3–24. 2015. [*Sosin D.V., Shalaeva O.V., Evseev A.V., Shabanov P.D.* The mechanisms of formation of acute exogenous hypoxia and the possibility of its pharmacological correction with antihypoxants. Clin. Pharmacol. and drug therapy rev. 13(1): 3–24. 2015. (In Russ)].
2. *Благинин А.А., Жильцова И.И., Михеева Г.Ф.* Гипоксическая тренировка как метод коррекции пограничных функциональных состояний организма операторов сложных эргатических систем. Нижневартовск. Изд. Нижневарт. гос. ун-та. 2015. [*Blaginin A.A., Zhil'cova I.I., Miheeva G.F.* Hypoxic training as a method of correction of borderline functional states of the organism of operators of complex ergatic systems]. Nizhnevartovsk. Nizhnevart. state university. 2015. (In Russ)].
3. *Rispen L., Marks D., Green S.* Dynamic ventilatory responses of females and males to acute isocapnic and poikilocapnic hypoxia. Respir. Physiol. Neurobiol. 245: 57–64. 2017.
4. *Berger M.M., Grocott M.P.* Facing acute hypoxia: from the mountains to critical care medicine. Br. J. Anaesth. 118(3): 283–286. 2017.
5. *Колчинская А.З., Цыганова Т.Н., Остапенко Л.А.* Нормобарическая интервальная гипоксическая тренировка в медицине и спорте. М. Медицина. 2003. *Kolchinskaya A.Z., Cyganova T.N., Ostapenko L.A.* Normobaric interval hypoxic training in medicine and sports. Moskow. Medicine. 2003. (In Russ)].
6. *Кривощеков С.Г., Диверт Г.М., Диверт В.Э.* Регуляция внешнего дыхания и газообмен организма при 20-дневном воздействии сеансами прерывистой нормобарической гипоксии. Физиология человека. 30(3): 88–94. 2004. [*Krivoshchekov S.G., Divert G.M., Divert V.E.* Regulation of external respiration and gas exchange of the body during 20-day exposure to sessions of intermittent normobaric hypoxia. Human Physiol. 30(3): 88–94. 2004. (In Russ)].
7. *Симбирцев А.С., Тотолян А.А.* Цитокины в лабораторной диагностике. Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение. 2(11): 82–98. 2015. [*Simbircev A.S., Totolyan A.A.* Cytokines in laboratory diagnosis. Infectious diseases: news, views, education. 2(11): 82–98. 2015. (In Russ)].
8. *Hocker A.D., Stokes A.J., Powell F.L., Huxtable A.G.* The impact of inflammation on respiratory plasticity. Exp. Neurol. (287): 243–253. 2017.
9. *Probert L.* TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. Neurosci. 302: 2–22. 2015.
10. *Lampron A., Elali A., Rivest S.* Innate immunity in the CNS: redefining the relationship between the CNS and Its environment. Neuron. 78(2): 214–232. 2013.
11. *Hofstetter A.O., Herlenius E.* Interleukin-1β depresses hypoxic gasping and autoresuscitation in neonatal DBA/1lacJ mice. Respir. Physiol. Neurobiol. 146: 135–146. 2005.
12. *Dantzer R., Konsman J.P., Bluthe R.M., Kelley K W.* Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? Auton. Neurosci. 85: 60. 2000.
13. *Gordon F.J.* Effect of nucleus tractus solitarius lesions on fever produced by interleukin-1beta. Auton. Neurosci. 85: 102. 2000.
14. *Nakamori T., Morimoto A., Murakami N.* Effect of a central CRF antagonist on cardiovascular and thermoregulatory responses induced by stress or IL-1β. Am. J. Physiol. 265(4): 834–839. 1993.
15. *Watanabe T., Tan N., Saiki Y., Makisumi T., Nakamura S.* Possible involvement of glucocorticoids in the modulation of interleukin-1-induced cardiovascular responses in rats. J. Physiol. 491(1): 231–239. 1996.
16. *Herlenius E.* An inflammatory pathway to apnea and autonomic dysregulation. Respir. Physiol. Neurobiol. 178(3): 449–457. 2011.
17. *Aleksandrova N.P., Danilova G.A., Aleksandrov V.G.* Cyclooxygenase patway in modulation of the ventilator response to hypercapnia by interleukin-1β in rats. Respir. Physiol. Neurobiol. (209): 85–90. 2015.
18. *Aleksandrova N.P., Danilova G.A., Aleksandrov V.G.* Interleukin-1 beta suppresses the ventilatory hypoxic response in rats via prostaglandin-dependent pathways. Can. J. Physiol. Pharmacol. 95(6): 681–685. 2017.
19. *Донина Ж.А., Баранова Е.В., Александрова Н.П.* Ингибирование гиперпродукции оксида азота в условиях прогрессивно, нарастающей гипоксии на фоне действия ИЛ-1β снижает выживаемость крыс после острой гипоксии. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 105(12): 1514–1525. 2019. [*Donina Zh. A., Baranova E.V., Alexandrova N.P.* Inhibition of the hyperproduction of nitric oxide during progressively increasing hypoxia under the action of IL-1β reduces the survival of rats after acute hypoxia. Russ. J. Physiol. 105(12): 1514–1525. 2019. (In Russ)].

20. *Gonzalez N., Kuwahira I.* Systemic oxygen transport with rest, exercise, and hypoxia: A Comparison of humans, rats, and mice. Compar. Physiol. 8(4): 1537–1573. 2018.
21. *Шустов С.Б., Куренкова И.Г., Харитонов М.А., Асямов К.В.* Нарушения функции внешнего дыхания при различных формах легочной патологии. Пульмонология. 27(3): 410–418. 2017. [*Shustov S.B., Kurenkova I.G., Kharitonov M.A., Asyamov K.V.* Lung function abnormalities in different respiratory diseases. Pulmonology. 27(3): 410–418. 2017. (In Russ)].
22. *Gauda E., Shirahata M., Mason A., Pichard L., Kostuk E., Chavez-Valdez R.* Inflammation in the carotid body during development and its contribution to apnea of prematurity. Respir. Physiol. Neurobiol. 185(1): 120–131. 2013.
23. *Lopez-Barneo J., Ortega-Saenz P., Gonzalez-Rodriguez P., Fernandez-Aguera M.C., Macias D., Pardal R., Gao I.* Oxygen-sensing by arterial chemoreceptors: Mechanisms and medical translation. Mol. Aspects Med. 47–48: 90–108. 2016.
24. *Ericsson A., Liu C., Hart R., Sawchenko P.E.* Type 1 interleukin-1 receptor in the rat brain: distribution, regulation, and relationship to sites of IL-1-induced cellular activation. J. Comp. Neurol. 361(4): 681–698. 1995.
25. *Nadeau S., Rivest S.* Effects of circulating tumor necrosis factor on the neuronal activity and expression of the genes encoding the tumor necrosis factor receptors (p55 and p75) in the rat brain: a view from the blood-brain barrier. Neurosci. 93(4): 1449–1464. 1999.
26. *Wong M.L., Bongiorno P.B., Gold P.W., Licinio J.* Localization of interleukin-1 beta converting enzyme mRNA in rat brain vasculature: evidence that the genes encoding the interleukin-1 system are constitutively expressed in brain blood vessels. Pathophysiol. Implications, Neuroimmunomodulation. 2(3): 141–148. 1995.
27. *Ek M., Arias C., Sawchenko P., Ericsson-Dahlstrand A.* Distribution of the EP3 prostaglandin E (2) receptor subtype in the rat brain: relationship to sites of interleukin-1-induced cellular responsiveness. J. Comp. Neurol. 428(1): 5–20. 2000.
28. *Nakamura K., Kaneko T., Yamashita Y., Hasegawa H., Katoh H., Negishi M.* Immunohistochemical localization of prostaglandin EP3 receptor in the rat nervous system. J. Comp. Neurol. 421(4): 543–569. 2000.
29. *Porzionato A., Macchi V., De Caro R., Di Giulio C.* Inflammatory and immunomodulatory mechanisms in the carotid body. Respir. Physiol. Neurobiol. 187(1): 31–40. 2013.
30. *Popa D., Fu Z., Go A., Powell F.* Ibuprofen blocks time-dependent increase in hypoxic ventilation in rats. Respir. Physiol. Neurobiol. 178(3): 381–386. 2011.
31. *Каратеев А.Е., Алейникова Т.Л.* Эйкозаноиды и воспаление. Современная ревматология. 10(4): 73–86. 2016. [*Karateev A.E., Aleinikova T.L.* Eicosanoids and inflammation. Modern Rheumatol. J. 10(4): 73–86. 2016. (In Russ)].
32. *Hofstetter A., Saha S., Siljehav V., Jakobsson P-J, Herlenius E.* The induced prostaglandin E-2 pathway is a key regulator of the respiratory response to infection and hypoxia in neonates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 104(23): 9894–9899. 2007.
33. *Olsson A., Kayhan G., Lagercrantz H., Herlenius E.* IL-1 beta depresses respiration and anoxic survival via a prostaglandin-dependent pathway in neonatal rats. Pediatr. Res. 54(3): 326–331. 2003.

Influence of Inhibition of Cyclooxygenase Pathways on Hypoxic Resistance in Rats with Increased Levels of Interleukin-1β

Zh. A. Donina[a], *, E. V. Baranova[a], and N. P. Aleksandrova[a]

[a] *Pavlov Institute of Physiology Russian Academy of Sciences, St.Petersburg, Russia*
**e-mail: zdonina@mail.ru*

One of the current problems of the physiology and medicine is the investigation of the of the influence of hypercytokinemia, which develops in acute viral and bacterial infections, on the development of respiratory failure and the body's resistance to rapidly increasing hypoxia. The aim of this study was to identify the involvement of cyclooxygenase pathways in the hypoxic respiratory responses and resistance to increasing hypoxia in an increased systemic level of a key inflammatory mediator interleukin-1 beta (IL-1β). The study was carried out on 4 groups of anesthetized Wistar rats ($n = 48$) with intravenous injection: saline (control), non-selective cyclooxygenase inhibitor diclofenac (1.5 mg/kg), IL-1β (500 ng in 1 ml 0.9% NaCl) and the combined administration of diclofenac and IL-1β. All groups of animals were exposed to increasing hypoxia, which was created by the "rebreathing" method. The duration of hypoxic exposure was several minutes: from normoxia to respiratory arrest (apnea). The obtained results showed that an increase in

the systemic level of IL-1β exacerbates the effect of acute rapidly increasing hypoxia, causing a more significant decrease in the oxygen saturation in arterial blood associated with a sharp decrease in the increment in the hypoxic ventilatory response. There is a pronounced suppressive effect of IL-1β on an increase in inspiratory fluctuations of intrathoracic pressure and on an increase the tidal volume increment during hypoxic exposure. In addition, an increase in the systemic level of IL-1β accelerates respiratory arrest caused by acute hypoxia. Apnea occurs at a lower level of hypoxic stimulation and is fatal in all animals of this experimental group. Preliminary inhibition of cyclooxygenase activity by diclofenac reduces the inhibitory effect of IL-1β on the hypoxic ventilatory response, increases the level of arterial blood oxygenation to control values and increases survival in the posthypoxic period. It is concluded that the activation of cyclooxygenase pathways under the action of proinflammatory cytokines may be one of the main mechanisms mediating their effect on respiratory function and resistance to increasing hypoxia.

Keywords: interleukin-1β, respiratory system, hypoxemia, prostaglandins, apnea

ЦИТИРОВАТЬ:

Донина Ж.А., Баранова Е.В., Александрова Н.П. Влияние ингибирования циклооксигеназных путей на резистентность к нарастающей гипоксии у крыс с повышенным уровнем интерлейкина-1 бета. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(11): 1400–1411.

DOI:10.31857/S0869813920110047

TO CITE THIS ARTICLE:

Donina Zh.A., Baranova E.V., Aleksandrova N.P. Influence of Inhibition of Cyclooxygenase Pathways on Hypoxic Resistance in Rats with Increased Levels of Interleukin-1β. Russian Journal of Physiology. 106(11): 1400–1411.

DOI:10.31857/S0869813920110047

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 11, с. 1412–1420

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ТРАНСДУКЦИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСНОГО ВЕКТОРА ГИППОКАМПА МЛЕКОПИТАЮЩИХ В КЛЕТКИ МОЗЖЕЧКА МОЛОДИ КЕТЫ *ONCORHYNCHUS KETA*

© 2020 г. М. Е. Стуканёва[1, *], Е. В. Пущина[1, 2], А. А. Вараксин[1]

[1]Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского, ДВО РАН, г. Владивосток, Россия

[2]Институт физиологии им. А. Богомольца, Национальной Академии Наук Украины, Киев, Украина

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

Поступила в редакцию 21.04.2020 г.
После доработки 09.06.2020 г.
Принята к публикации 05.07.2020 г.

Целью данной работы было исследование возможности трансдукции рекомбинантного аденоассоциированного вирусного вектора гиппокампа млекопитающих (rAAV) в клетки мозжечка годовалой молоди кеты (*Oncorhynchus keta*) через месяц после интрапаренхиматозной инъекции. Введение 0.2 мкл rAAV в дорсальную область тела мозжечка молоди кеты сопровождалось мониторингом состояния рыб и последующим исследованием мозжечка с помощью флуоресцентной микроскопии. Полученные нами результаты демонстрируют, что rAAV способен эффективно инфицировать клетки мозжечка молоди кеты. Средний размер трансдуцированных клеток составлял 5 и 7 мкм. При трансдукции rAAV в структуры мозжечка было установлено, что наибольшая концентрация клеток характерна для центральной части инъекции и по мере удаления от нее диффузно снижается. На периферии инъекции находится большое число GFP-позитивных гранул, что свидетельствует о начале деградации клеток в ходе иммунного ответа. Результаты исследования демонстрируют, что rAAV способен трансдуцировать субпопуляции клеток, удаленные от зоны инъекции, это предполагает его распространение с помощью диффузии, а также внутриклеточного транспорта.

Ключевые слова: аденоассоциированный вирус, *Oncorhynchus keta*, мозжечок, антероградный транспорт, костистая рыба, трансдукция

DOI: 10.31857/S0869813920100118

Встраивание нового гена для восстановления дикого типа (добавление гена), коррекция измененного генома (редактирование гена) и ингибирование/инактивация мутантного гена является одним из перспективных методов при лечении заболеваний ЦНС [1, 2]. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) рассматривается как перспективный вектор в генной терапии человека [3]. Он способен инфицировать постмитотические клетки, обеспечивая простую и безопасную доставку генов в ЦНС [4, 5]. rAAV – непатогенный вирус с одноцепочечной ДНК, лишенный оболочки, который не может осуществлять автономную репликацию или завершение своего жизненного цикла без аденовируса [6, 7]. rAAV трансдуцирует клетки, преодолев три физиологических барьера: плазматическую мембрану, эндосомальную мембрану и ядерную оболочку [8]. Вирусные частицы попадают в

ядро в течение 20 ч, накапливаясь преимущественно в перинуклеарном компартменте [9]. Было показано, что rAAV осуществляют эффективную и стабильную клеточную трансдукцию без возникновения немедленного иммунного ответа или индукции цитотоксичности [10, 11]. Поскольку они считаются непатогенными, это снизило требования к уровню биобезопасности при работе с rAAV по сравнению с другими популярными вирусными векторными системами [12].

Помимо разработки терапевтических методов, вирусы бешенства, простого герпеса, лентивирусы и rAAV успешно используются нейробиологами при визуализации нервных цепей *in vivo* [10, 13]. Длительная трансдукция rAAV может наблюдаться через месяцы и годы после первичной инъекции в ЦНС [14, 15]. У приматов экспрессия генов в постмитотических клетках сохранялась более 6 лет [16]. Нативная флуоресценция при инъекции rAAV не требует обязательного дополнительного гистохимического окрашивания и позволяет получить статичное или динамическое изображение из зоны инъекции [17, 18]. Другое преимущество rAAV-опосредованной экспрессии флуоресцентного белка заключается в том, что инфицированные клеточные тела полностью маркируются. Это позволяет точно определить место инъекции и проанализировать, какие типы нейронов имеют проекции аксонов [14]. rAAV могут инфицировать постмитотические клетки, такие как нейроны, что ускорило развитие новых методов манипуляции и реконструкции нервных цепей *in vivo* [10, 13]. В дальнейшем использование rAAV может расширить наши знания о картировании путей нейронов в интактной и поврежденной ЦНС млекопитающих [19].

В настоящее время активно исследуется трансдукция rAAV в клетки мозга млекопитающих и самым распространенным модельным объектом является мышь (*Mus musculus*) [20]. Но, как было показано при оценке токсичности, даже такой классический объект исследований имеет некоторые отличия от метаболизма человека [20]. Костистые рыбы используются в качестве модельных животных *in vivo* в различных областях молекулярной генетики, таких как биология развития [21] и нейробиология [22, 23]. Введение аденовирусных векторов в их мозг способствует генетическому анализу функций нервных клеток и нейронов в составе отдельных нервных цепей [24]. Несмотря на столь перспективное направление, на сегодняшний день существует не так много исследований, демонстрирующих, что человеческий rAAV может инфицировать нервные клетки в мозге костистых рыб [24]. Таким образом, молодь кеты может рассматриваться в качестве модельного объекта для оценки свойств аденовирусных векторов в доклинических исследованиях.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперимент проводили на 10 годовалых особях молоди кеты с длиной тела 11–12.5 см и массой 25–35 г. Животные были получены с Рязановского экспериментального производственного рыбоводного завода в 2019 г. Все экспериментальные манипуляции были проведены в соответствии с правилами, регулируемыми уставом Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН и Этической комиссией, регламентирующей гуманное обращение с экспериментальными животными. Кету содержали в аквариуме с аэрируемой морской водой при температуре 16–17°C, с одноразовым кормлением за сутки. Соотношение освещенного и темнового периодов в сутках составляло 14/10 ч. Содержание растворенного кислорода в воде составляло 7–10 мг/дм^3, что соответствует нормальному насыщению. Для выявления трансдукции клеток использовали rAAV, который кодирует ген зеленого флуоресцентного белка (GFP). В большинстве клинических исследований ЦНС векторы rAAV вводят путем интрапаренхиматозной инъекции [25, 26]. Мы осуществляли введение rAAV при долговременной экспозиции в течение месяца путем интрапаренхиматозной инъекции в дорсаль-

ную область тела мозжечка. Животные были разделены на две группы. Рыбам в контрольной группе ($n = 5$) был введен в мозжечок 0.2 мкл раствора 0.1 М фосфатного буфера (pH 7.2), экспериментальной группе вводили 0.2 мкл rAAV ($n = 5$). Во всех контрольных экспериментах GFP-позитивная реакция отсутствовала.

Сразу после инъекции животных выпускали в аквариум с морской водой для их восстановления и дальнейшего мониторинга. После инъекции двигательная активность рыб существенно повышалась: они выпрыгивали из воды и совершали вращательные движения. Далее рыбы были анестезированы в растворе трикаин метансульфоната MS-222 (Sigma-Aldrich, США) в течение 10–15 мин при комнатной температуре. Животные выводились из эксперимента и подвергались эвтаназии методом быстрой декапитации. После анестезии внутричерепную полость обездвиженного животного префиксировали с помощью шприца 4%-ным раствором параформальдегида, приготовленным на 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.2). После префиксации мозг извлекали из полости черепа и фиксировали в 4%-ом растворе параформальдегида в течение двух часов при 4°C. Затем в течение двух суток выдерживали в 30%-ном растворе сахарозы при 4°C (с семикратной сменой раствора). Серийные фронтальные срезы мозга толщиной 50 мкм изготавливали на замораживающем микротоме Cryo-star HM 560 MB (Carl Zeiss, Германия). Для исследования каждый третий фронтальный срез мозжечка помещали на предметное стекло и заключали в глицерин.

Визуализация экспрессии GFP была проведена на микроскопе Axiovert 200-M (Carl Zeiss, Германия) в режиме флуоресц. с использованием зеленого светофильтра (488 нм). Измерения проводили в 5 случайно выбранных микроскопических полях для каждой области исследования. Микрофотографии препаратов получали с помощью цифровой камеры Axiovert 200. Обработку полученных данных проводили с использованием программы AxioVision и в графическом редакторе Corel Photo-Paint 12. Количественную обработку полученных результатов выполняли с использованием программных пакетов Statistica 12 и Microsoft Excel 2010. Все данные представлены в виде: среднее ± стандартное отклонение ($M \pm SD$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

GFP полностью заполняет тела инфицированных rAAV клеток [19] и, демонстрируя интенсивную флуоресценцию, позволяет точно определить область инъекции. В мозжечке молоди кеты контрольной группы экспрессия GFP не была выявлена (рис. 1*A*).

Результаты проведенного исследования показывают, что rAAV векторы способны опосредовать эффективную трансдукцию клеток в мозжечке при интрапаренхиматозной инъекции. Подавляющее большинство GFP+ клеток во всех зонах мозжечка имели размер 4–5 мкм (табл. 1). Встречались единичные крупные GFP+ клетки, размером 7 мкм (табл. 1).

Через месяц после введения rAAV в дорсальную область тела мозжечка в месте инъекции было выявлено максимальное число GFP+ клеток (рис. 1*C*, 1*D*). Площадь их распределения составляла 53.5 ± 4.7 мкм^2 в ростральной части и 25.3 ± 2.3 мкм^2 в каудальной части мозжечка (рис. 2*A*).

Трансдуцированные клетки формировали крупное скопление с равномерным распределением по всей области инъекции, как в молекулярном, так и в гранулярном слоях, что свидетельствует об обширном повреждении тканей.

С помощью фазового контраста было показано, что область инъекции содержит темные включения, которые, очевидно, соответствуют GFP+ клеткам (рис. 1*C*). При трансдукции rAAV в структуры мозжечка наибольшая концентрация клеток наблюдалась в центральной части инъекции и по мере удаления от нее диффузно

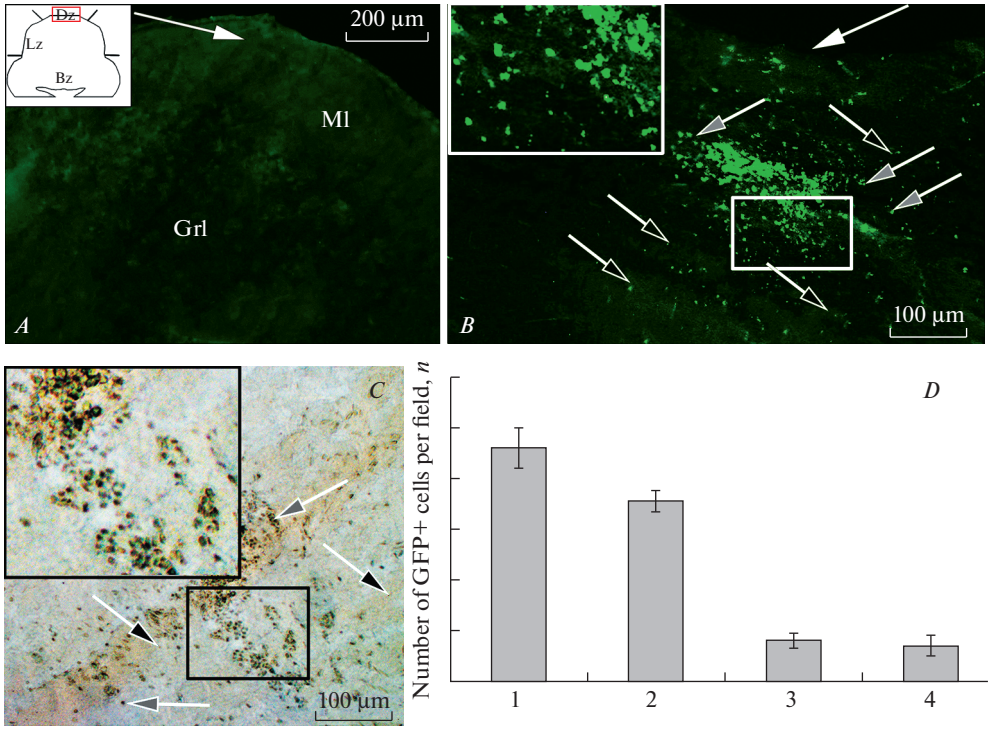


Рис. 1. Распределение зеленого флуоресцентного белка (GFP) в мозжечке молоди кеты. *A* – общий вид контрольного среза при введении фосфатного буфера; *B* – область инъекции через месяц после введения rAAV, флуоресценция. Белой стрелкой обозначено место инъекции rAAV, серыми стрелками обозначены GFP+ клетки, черными – GFP+ гранулы; *C* – микрофотография области введения rAAV в режиме фазового контраста, серыми стрелками обозначены GFP+ клетки, черными – GFP+ гранулы; *D* – соотношение GFP+ клеток после введения rAAV, 1 – инъекция в ростральной части мозжечка, 2 – инъекция в каудальной части, 3 – латеральная зона, 4 – базальная зона. Ml – молекулярный слой, Grl – гранулярный слой, Dz – дорсальная зона, Lz – латеральная зона, Bz – базальная зона.

Fig. 1. Distribution of green fluorescent protein (GFP) in the cerebellum of juvenile *O. keta*. *A* – general view of a control slice with the introduction of phosphate buffer; *B* – injection area one month after the introduction of rAAV, fluorescence. The white arrow indicates the injection site of rAAV, the gray arrows indicate GFP+ cells, the black arrows indicate GFP+ granules; *C* – microphotography of the rAAV injection area in the phase contrast mode, gray arrows indicate GFP+ cells, black arrows indicate GFP+ granules; *D* – ratio of GFP+ cells after rAAV administration, 1 – injection in the rostral part of cerebellum, 2 – injection in the caudal part of cerebellum, 3 – lateral zone, 4 – basal zone. Ml – molecular layer, Grl – granular layer, Dz – dorsal zone, Lz– lateral zone, Bz – basal zone.

снижалась. Помимо GFP+ клеток на периферии области инъекции были расположены менее интенсивно маркированные GFP+ гранулы. Их размеры приведены в таблице. Максимальное число GFP+ клеток находилось в ростральной части и постепенно снижалось в каудальной части мозжечка. В ростральной и каудальной частях мозжечка число гранул было сходным (рис. 2*B*). Наши результаты демонстрируют, что rAAV не распространяется равномерно по всему мозжечку, но встраивается в области, удаленные от зоны инъекции. Так, в небольшом количестве были выявлены отдельные GFP+ клетки в молекулярном слое латеральной и базальной зон. Доля GFP+ клеток составляла не более 7.5%.

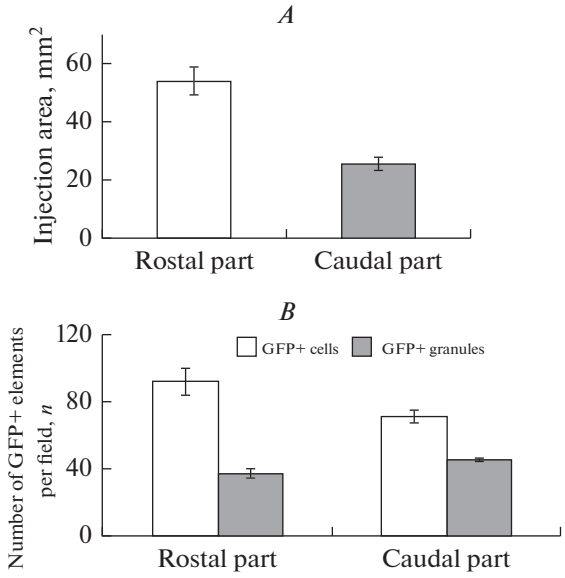


Рис. 2. *A* – Распределение GFP+ клеток, показана площадь инъекции (мм^2) через месяц после введения rAAV; *B* – соотношение распределения GFP+ клеток и GFP+ гранул. Белые столбцы обозначают ростральную часть, серые столбцы – каудальную ($n = 5$ в каждой группе).
Fig. 2. *A* – Distribution of GFP+ cells, shows the injection area (mm^2) one month after the introduction of rAAV; *B* – the ratio of the distribution of GFP+ cells and GFP+ granules. White columns indicate the rostral part, gray columns indicate the caudal part ($n = 5$ in each group).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При планировании эксперимента с введением вектора необходимо, чтобы прошло достаточно времени для достижения видимой экспрессии генов. Было показано, что две недели после инъекции в мозг мыши – достаточный срок для трансдукции нейронов, определяемой по интенсивной флуоресц. их тел и выявлению аксонов [19]. При удалении от зоны инъекции было установлено большое число гранул, что может свидетельствовать о начале деградации клеток в ходе иммунного ответа.

Таблица 1. Морфометрические параметры* клеток ($M \pm SD$) мозжечка молоди кеты *O. keta* через месяц после введения rAAV
Table 1. Morphometric parameters * of cells ($M \pm SD$) of the cerebellum of juvenile chum *O. keta* one month after the introduction of rAAV

	Область инъекции Injection area	Дорсальная зона Dorsal zone	Латеральная зона Lateral zone	Базальная зона Basal area
Клетки молекулярного слоя Molecular layer cells	5 ± 0.5/4.3 ± 0.4 8.2 ± 0.9/7.1 ± 0.5	5.1 ± 0.4/4.4 ± 0.6 8 ± 0.5/6.4 ± 0.5	5.3 ± 0.3/4.8 ± 0.5 7.6 ± 0.6/6.2 ± 0.3	5.1 ± 0.1/5 ± 0.1 7.5 ± 0.5/6.7 ± 0.5
Клетки гранулярного слоя Granular layer cells	5.1 ± 0.3/4.3 ± 0.2	–	–	–
Гранулы Granules	2 ± 0.1/2.1 ± 0. 1	–	–	–

* – большой и малый диаметр клеток. Размеры клеток приведены как средние значения их большого и малого диаметров, указанные через косую черту.
* – large and small diameter of cells. Cell sizes are given as average values of their large and small diameters, indicated through a slash.

С другой стороны, такой паттерн распределения вирусных частиц может свидетельствовать о диффузном способе их распространения. После вирусной трансдукции и начала экспрессии трансгена, иммунный ответ может привести к очистке трансдуцированных клеток с последующей потерей экспрессии генов и развитием воспаления в ЦНС [3]. При введении серотипа AAV-9 или GFP в стриатум или таламус крысы развивался полный адаптивный иммунный ответ. Усиливалась регуляция MHC II в глие, а такжке лимфоцитарная инфильтрация и воспаление, что приводило к потере значительного числа нейронов и генерации антител против трансгенов [27]. Клеточно-опосредованный иммунный ответ также наблюдался после внутричерепной инъекции вектора AAV1-GFP у приматов (*Macaca fascicularis*) [28] и инъекции AAV5-α-l-идуронидазы у собаки с синдром Гурлера [29]. Данные на млекопитающих показывают, что в дальнейших исследованиях необходимо учитывать появление иммунного ответа на чужие белки, экспрессируемые векторами AAV [3].

Мы предполагаем, что непосредственное введение вектора в ростральную часть мозжечка объясняет большое количество GFP экспрессирующих клеток в этой зоне. Далее вектор путем диффузии распределялся в каудальную часть, где число клеток было снижено (рис. 2*B*). В мозге мыши rAAV трансдуцируют как митотические, так и постмитотические клетки [30]. Большая часть серотипов AAV демонстрирует нейрональный тропизм, но некоторые из них также способны трансдуцировать и глиальные клетки [12], в зависимости от экспрессии капсидных белков [31]. Лечение генетических заболеваний ЦНС вызывает затруднения из-за непроницаемости гематоэнцефалического барьера и поражений обширных областей мозга [32]. Интрапаренхиматозная инъекция проникает через гематоэнцефалический барьер, в результате чего экспрессия трансгена ограничена небольшим (1–3 мм) местом введения [33]. Считается, что основной способ распространения вектора в ЦНС – аксональный транспорт, в ретроградном и/или антероградном направлении [30]. Антероградный транспорт rAAV векторов характеризуется трансдукцией клеток в той области мозга, в которую не была введена инъекция, но которая содержала проекции аксонов от нейронов, находящихся в области инъекции. Напротив, при ретроградном транспорте происходит трансдукция нейронов, расположенных в области мозга вдали от места инъекции, но непосредственно иннервирующих место введения [30].

В мозжечке молоди кеты область распространения GFP+ клеток в месте инъекции составляла 0.4–0.6 мм. Наши данные демонстрируют, что rAAV способен трансдуцировать субпопуляции клеток, удаленных от зоны инъекции. Мы предполагаем, что отсутствие трансдуцированных клеток между удаленными зонами и областью инъекции объясняется тем, что трансдукция происходит не только путем диффузии, но и с помощью антероградного транспорта. Так, в небольшом количестве были выявлены отдельные rAAV+ клетки в молекулярном слое латеральной и базальной зон (рис. 1*D*). Возможность вектора трансдуцировать клетки путем антероградного транспорта способствует его более широкому распространению в ЦНС [34]. По предварительным оценкам полная трансдукция всего мозга человека в младенческом периоде развития для лечения лизосомных нарушений памяти требует от 50 до 350 инъекций [35, 33]. Перенос гена на большие расстояния от места инъекции и нацеливание его на уже известные проекции в головном мозге способно снизить число инъекций [36]. Подобное свойство имеет потенциальные преимущества для лечения генетических заболеваний, при которых поражается весь мозг [37]. В исследовании на приматах (*cynomolgus*) нейроны, удаленные от места инъекции, также были трансдуцированы, что указывало на аксонный транспорт вектора, трансгена или трансгенного продукта [38].

При инъекции серотипа rAAV-2 в кору или глубокие ядра мозжечка мыши сообщалось об эффективной трансдукции клеток Пуркинье. Авторы предполагают, что вирусный вектор распространялся ретроградно по аксонам в тела клеток Пуркинье из глубоких ядер мозжечка [39]. Паренхиматозная инъекция мозжечка примата (*Callithrix jacchus*) интенсивно трансдуцировала клетки коры мозжечка и его афференты, такие как нейроны мостовых ядер, вестибулярное ядро и нижнее оливарное ядро [40]. В мозжечке молоди кеты после инъекции rAAV отсутствовали GFP+ экспрессирующие клетки Пуркинье и эвридендроидные нейроны.

Таким образом, полученные нами, путем прямого введения rAAV, результаты демонстрируют, что он способен инфицировать клетки мозжечка молоди кеты. Видимо, трансдукция клеток мозжечка молоди кеты осуществляется как локально в зоне инъекции, путем диффузии, так и антероградно. Полученные нами данные являются предварительными и необходимо проводить дальнейшие исследования для выяснения фенотипа GFP+ клеток и особенностей развития иммунного ответа.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке ННЦМБ ДВО РАН (госконтракт № 120к-19 от 14.11.2019).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wang L.L.F, Dang L., Liang C., Wang C., He B., Liu J, Li D., Wu X., Xu X., Lu A., Zhang G. In Vivo* Delivery Systems for Therapeutic Genome Editing. Int. J. Mol. Sci. 17. pii: E626. 2016.
2. *Lundstrom K.* Viral Vectors in Gene Therapy. Diseases. 6(2): E42. 2018.
3. *Ojala D.S., Amara D.P., Schaffer D.V.* Adeno-associated virus vectors and neurological gene therapy. Neuroscientist. 21(1): 84–98. 2015.
4. *Towne C., Schneider B.L., Kieran D., Redmond D.E, Aebischer P.* Efficient transduction of non-human primate motor neurons after intramuscular delivery of recombinant AAV serotype 6. Gene Ther. 17(1): 141–146. 2010.
5. *Hollis E.R., Kadoya K., Hirsch M., Samulski R.J., Tuszynski M.H.* Efficient retrograde neuronal transduction utilizing self-complementary AAV1. Mol. Ther. 16(2): 296–301. 2008.
6. *Buller R.M., Janik J.E., Sebring E.D., Rose J.A.* Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. J. Virol. 40(1): 241–247. 1981.
7. *Kay C.N, Ryals R.C, Aslanidi G.V, Min SH., Ruan Q, Sun J, Dyka F.M, Kasuga D, Ayala A.E., Van Vliet K., Agbandje-McKenna M., Hauswirth W.W., Boye S.L., Boye S.E.* Targeting photoreceptors via intravitreal delivery using novel, capsid-mutated AAV vectors. PLoS One 2013;8(4): e62097.
8. *Harbison C.E., Chiorini J.A., Parrish C.R.* The parvovirus capsid odyssey: from the cell surface to the nucleus. Trends Microbiol. 16(5): 208–214. 2008.
9. *Bartlett J.S., Wilcher R., Samulski R.J.* Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. J. Virol. 74(6): 2777–2785. 2000.
10. *Enquist L.W., Card J.P.* Recent advances in the use of neurotropic viruses for circuit analysis. Curr. Opin. Neurobiol.13(5): 603–606. 2003.
11. *Vannucci L., Lai M., Chiuppesi F., Ceccherini-Nelli L., Pistello M.* Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. New Microbiol. 36(1): 1–22. 2013.
12. *Aschauer D.F., Kreuz S., Rumpel S.* Analysis of transduction efficiency, tropism and axonal transport of AAV serotypes 1, 2, 5, 6, 8 and 9 in the mouse brain. PLoS One. 8(9): e76310. 2013.
13. *Parr-Brownlie L.C., Bosch-Bouju C., Schoderboeck L., Sizemore R.J., Abraham W.C., Hughes S.M.* Lentiviral vectors as tools to understand central nervous system biology in mammalian model organisms. Front Mol. Neurosci. 8: 14. 2015.
14. *Chamberlin N.L., Du B., de Lacalle S., Saper C.B.* Recombinant adeno-associated virus vector: use for transgene expression and anterograde tract tracing in the CNS. Brain Res. 793(1–2): 169–175. 1998.
15. *Hadaczek P., Eberling J.L., Pivirotto P., Bringas J., Forsayeth J., Bankiewicz K.S.* Eight years of clinical improvement in MPTP-lesioned primates after gene therapy with AAV2-hAADC. Mol. Ther. 18(8): 1458–1461. 2010.
16. *Rivera V.M., Gao G.P., Grant R.L., Schnell M.A., Zoltick P.W., Rozamus L.W., Clackson T., Wilson J.M.* Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. Blood. 105(4): 1424–1430. 2005.

17. *Marik S.A, Yamahachi H., McManus J.N., Szabo G., Gilbert C.D.* Axonal dynamics of excitatory and inhibitory neurons in somatosensory cortex. PLoS Biol. 8(6): e1000395. 2010.
18. *Mittmann W., Wallace D.J., Czubayko U., Herb J.T., Schaefer A.T., Looger L.L., Denk W., Kerr J.N.* Two-photon calcium imaging of evoked activity from L5 somatosensory neurons *in vivo*. Nat. Neurosci.14(8): 1089–1093. 2011.
19. *Harris J.A., Oh S.W., Zeng H.* Adeno-associated viral vectors for anterograde axonal tracing with fluorescent proteins in nontransgenic and cre driver mice. Curr. Protoc. Neurosci. 1(20): 1–18. 2012.
20. *Lootens L., Meuleman P., Pozo O.J., Van Eenoo P., Leroux-Roels G., Delbeke F.T.* uPA+/+-SCID mouse with humanized liver as a model for in vivo metabolism of exogenous steroids: methandienone as a case study. Clin. Chem. 55(10): 1783–1793. 2009.
21. *Furutani-Seiki M., Wittbrodt J.* Medaka and zebrafish, an evolutionary twin study. Mech. Dev.121(7–8): 629–637. 2004.
22. *Asakawa K., Suster M. L., Mizusawa K., Nagayoshi S., Kotani T., Urasaki A., Kishimoto Y., Hibi M., Kawakami K.* Genetic dissection of neural circuits by Tol2 transposon-mediated Gal4 gene and enhancer trapping in zebrafish. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105(4): 1255–1260. 2008.
23. *Neuhauss S.C., Biehlmaier O., Seeliger M.W., Das T., Kohler K., Harris W.A., Baier H.* Genetic disorders of vision revealed by a behavioral screen of 400 essential loci in zebrafish. J. Neurosci. 19(19): 8603–8615. 1999.
24. *Suehiro Y., Kinoshita M., Okuyama T., Shimada A., Naruse K., Takeda H., Kubo T., Hashimoto M., Takeuchi H.* Transient and permanent gene transfer into the brain of the teleost fish medaka (Oryzias latipes) using human adenovirus and the Cre-loxP system. FEBS Lett. 584(16): 3545–3549. 2010.
25. *Duarte-Neves J., Gonçalves N., Cunha-Santos J, Simões A.T., den Dunnen W. F., Hirai H., Kügler S., Cavadas C., Pereira de Almeida L.* Neuropeptide Y mitigates neuropathology and motor deficits in mouse models of Machado-Joseph disease. Hum. Mol. Genet. 24(19): 5451–5463. 2015.
26. *Simões A.T., Gonçalves N., Koeppen A., Déglon N., Kügler S., Duarte C.B., Pereira de Almeida L.* Calpastatin-mediated inhibition of calpains in the mouse brain prevents mutant ataxin 3 proteolysis, nuclear localization and aggregation, relieving Machado-Joseph disease. Brain. 135(Pt 8): 2428–2439. 2012.
27. *Ciesielska A., Hadaczek P., Mittermeyer G., Zhou S., Wright J.F., Bankiewicz K.S., Forsayeth J.* Cerebral infusion of AAV9 vector-encoding non-self proteins can elicit cell-mediated immune responses. Mol. Ther. 21(1): 158–166. 2013.
28. *Hadaczek P., Forsayeth J., Mirek H., Munson K., Bringas J., Pivirotto P., McBride J.L., Davidson B.L., Bankiewicz K.S.* Transduction of nonhuman primate brain with adeno-associated virus serotype 1: vector trafficking and immune response. Hum. Gene Ther. 20(3): 225-237. 2009.
29. *Ciron C., Desmaris N., Colle M.A., Raoul S., Joussemet B., Vérot L., Ausseil J., Froissart R., Roux F., Chérel Y., Ferry N., Lajat Y., Schwartz B., Vanier M.T., Maire I., Tardieu M., Moullier P., Heard J.M.* Gene therapy of the brain in the dog model of Hurler's syndrome. Ann. Neurol. 60(2): 204–213. 2006.
30. *Saraiva J., Nobre R.J., Pereira de Almeida L.* Gene therapy for the CNS using AAV: The impact of systemic delivery by AAV9. J. Control Release. 241: 94–109. 2016.
31. *Alves S., Nascimento-Ferreira I., Auregan G., Hassig R., Dufour N., Brouillet E., Pedroso de Lima M.C., Hantraye P., Pereira de Almeida L., Déglon N.* Allele-specific RNA silencing of mutant ataxin-3 mediates neuroprotection in a rat model of Machado-Joseph disease. PLoS One. 3(10): e3341. 2008.
32. *Cearley C.N., Wolfe J.H.* Transduction characteristics of adeno-associated virus vectors expressing cap serotypes 7, 8, 9, and Rh10 in the mouse brain. Mol. Ther. 13(3): 528–537. 2006.
33. *Cunningham J., Pivirotto P., Bringas J., Suzuki B, Vijay S, Sanftner L., Kitamura M., Chan C., Bankiewicz K.S.* Biodistribution of adeno-associated virus type-2 in nonhuman primates after convection-enhanced delivery to brain. Mol. Ther.16(7): 1267–1275. 2008.
34. *Castle M.J., Perlson E., Holzbaur E.L., Wolfe J.H.* Long-distance axonal transport of AAV9 is driven by dynein and kinesin-2 and is trafficked in a highly motile Rab7-positive compartment. Mol. Ther. 22(3): 554–566. 2014.
35. *Vite C.H., Passini M.A., Haskins M.E., Wolfe J.H.* Adeno-associated virus vector-mediated transduction in the cat brain. Gene Ther. 10(22): 1874–1881. 2003.
36. *Hsiao C.D., Hsieh F.J., Tsai H.J.* Enhanced expression and stable transmission of transgenes flanked by inverted terminal repeats from adeno-associated virus in zebrafish. Dev. Dyn. 220(4): 323–336. 2001.
37. *Tervo D.G., Hwang B.Y., Viswanathan S., Gaj T., Lavzin M., Ritola K.D., Lindo S., Michael S., Kuleshova E., Ojala D., Huang C.C., Gerfen C.R., Schiller J., Dudman J.T., Hantman A.W., Looger L.L., Schaffer D.V., Karpova A.Y.* A Designer AAV Variant Permits Efficient Retrograde Access to Projection Neurons. Neuron. 92(2): 372–382. 2016.
38. *Salegio E.A., Kells A.P., Richardson R.M., Hadaczek P., Forsayeth J., Bringas J., Sardi S.P., Passini M.A., Shihabuddin L.S., Cheng S.H., Fiandaca M.S., Bankiewicz K.S.* Magnetic resonance

imaging-guided delivery of adeno-associated virus type 2 to the primate brain for the treatment of lysosomal storage disorders. Hum. Gene Ther. 21(9): 1093–1103. 2010.
39. *Kaemmerer W.F., Reddy R.G., Warlick C.A., Hartung S.D., McIvor R.S., Low W.C.* In vivo transduction of cerebellar Purkinje cells using adeno-associated virus vectors. Mol. Ther. 2(5): 446–457. 2000.
40. *Matsuzaki Y., Konno A., Mukai R., Honda F., Hirato M., Yoshimoto Y., Hirai H.* Transduction Profile of the Marmoset Central Nervous System Using Adeno-Associated Virus Serotype 9 Vectors. Mol. Neurobiol. 54(3): 1745–1758. 2017

Transduction of the Recombinant Adeno-Associated Mammalian Hippocampal Virus Vector in Cells of the Cerebellum of Juvenile *Oncorhynchus keta*

M. E. Stukaneva[a], *, E. V. Pushchina[a, b], and A. A. Varaksin[a]

[a] *Zhirmunsky National Scientific Center for Marine Biology, FEB RAS, Vladivostok, Russia*
[b] *Bogomolets Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine*
**e-mail: stykanyova@mail.ru*

The aim of this work was to study the possibility of transduction of the recombinant adeno-associated mammalian hippocampal virus (rAAV) into the cells of the cerebellum of the one-year-old juvenile of *Oncorhynchus keta* one month after intraparenchymal injection. The introduction of 0.2 μl of rAAV into the dorsal region of the cerebellar body of *O. keta* salmon was accompanied by monitoring of the condition of the fish and subsequent examination of the cerebellum using fluorescence microscopy. Our results demonstrate that rAAV is able to effectively infect the cerebellum cells of juvenile *O. keta*. The average size of the transduced cells was 5 and 7 μm. During transduction of rAAV into the structures of the cerebellum, it was found that the highest concentration of cells is characteristic of the central part of the injection and diffusely decreased with distance from it. At the periphery of the injection there is a large number of GFP-positive granules, which indicates the onset of cell degradation during the immune response. The results of the study demonstrate that rAAV is able to transduce subpopulations of cells distant from the injection zone, which suggests its distribution through diffusion, as well as intracellular transport.

Keywords: adeno-associated virus, *Oncorhynchus keta*, cerebellum, anterograde transport, bony fish, transduction

ЦИТИРОВАТЬ:

Стуканёва М.Е., Пущина Е.В., Вараксин А.А. Трансдукция рекомбинантного аденоассоциированного вирусного вектора гиппокампа млекопитающих в клетки мозжечка молоди кеты *Oncorhynchus keta*. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(11): 1412–1420.

DOI: 10.31857/S0869813920100118

TO CITE THIS ARTICLE:

Stukaneva M.E., Pushchina E.V., Varaksin A.A. Transduction of the Recombinant Adeno-Associated Mammalian Hippocampal Virus Vector in Cells of the Cerebellum of Juvenile *Oncorhynchus keta*. Russian Journal of Physiology. 106(11): 1412–1420.

DOI: 10.31857/S0869813920100118

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 11, с. 1421–1435

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

МЕМБРАННЫЙ ГИДРОЛИЗ УГЛЕВОДОВ И ВСАСЫВАНИЕ ГЛЮКОЗЫ В ТОНКОЙ КИШКЕ КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ

© 2020 г. Л. В. Громова[1, *], Е. В. Савочкина[1], А. С. Алексеева[1], Ю. В. Дмитриева[1], А. А. Груздков[1]

[1]Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

Поступила в редакцию 27.05.2020 г.
После доработки 14.07.2020 г.
Принята к публикации 18.08.2020 г.

Хронический стресс как неотъемлемый атрибут жизни человека и животных часто приводит к развитию патологических состояний, выраженность которых зависит от его характера, степени и продолжительности. Цель работы состояла в исследовании адаптации ряда физиологических параметров тонкой кишки к умеренному стрессу при ежедневной 3-часовой иммобилизации крыс в течение 3–16 дней при комнатной (21 ± 2°C) температуре и к аналогичному, но более сильному, стрессу при пониженной (5 ± 1°C) температуре. Исследовалось всасывание глюкозы в тонкой кишке в условиях, максимально близких к физиологическим (без наркоза и хирургических операций), содержание транспортеров глюкозы SGLT1 и GLUT2 в энтероцитах и активность кишечных карбогидраз. Обнаружено, что через 3 дня умеренного стресса при комнатной температуре всасывание глюкозы в тонкой кишке и содержание GLUT2 в апикальной мембране энтероцитов тощей кишки повысились ($p < 0.05$) по сравнению с контролем (без стресса), но через 10 и 16 дней не отличались от контроля. Активности глюкоамилазы и мальтазы через 3, 10 и 16 дней умеренного стресса сохранялись на уровне контроля. Более сильный стресс (ежедневная иммобилизации крыс при пониженной температуре) через 3, 10 и 16 дней приводил к достоверному повышению по сравнению с контролем всасывания глюкозы ($p < 0.001$). При этом содержание SGLT1 и GLUT2 в энтероцитах тощей кишки не менялось через 3 и 10 дней, но было выше, чем в контроле, через 16 дней ($p < 0.05$ для SGLT1). Активности глюкоамилазы и мальтазы после 3 и 10 дней хронической иммобилизации крыс на холоде заметно повышались, но через 16 дней возвращались к контрольным значениям. Поскольку холодовое воздействие усиливает термогенез, можно заключить, что хроническая иммобилизация крыс в сочетании с пониженной температурой существенно замедляет адаптацию системы всасывания глюкозы в тонкой кишке и мембранных карбогидраз к стрессорному воздействию.

Ключевые слова: хронический стресс, воздействие холода, адаптация, всасывание глюкозы в тонкой кишке, транспортеры SGLT1 и GLUT2, мембранные пищеварительные ферменты

DOI: 10.31857/S0869813920100040

Стресс представляет угрозу гомеостазу в организме человека и животных, а хронический стресс является одним из существенных факторов, способствующих раз-

витию таких широко распространенных патологических состояний, как метаболический синдром, ожирение, диабет 2-го типа [1, 2].

Действие хронического стресса на пищеварительную систему изучалось довольно интенсивно [3–10], однако, до сих пор имеется существенный пробел в наших знаниях о реакции на хронический стресс ферментов, осуществляющих мембранное пищеварение, которое является важным звеном в общем метаболизме организма. По-прежнему остаются дискуссионными вопросы, касающиеся реакции на хронический стресс системы всасывания глюкозы в тонкой кишке и, в частности, его влияния на основные мембранные транспортеры глюкозы (SGLT1 и GLUT2) в энтероцитах. В ряде работ [4, 7, 9] показано стимулирующее влияние хронического стресса на всасывание глюкозы в тонкой кишке, тогда как согласно другим работам [3, 6], он оказывает ингибирующее действие на этот процесс. Неоднозначные реакции на хронический стресс описаны и в отношении транспортеров глюкозы (SGLT1 и GLUT2) в энтероцитах [3–10].

Существующие расхождения в работах разных авторов могут быть обусловлены проявлением в некоторых случаях дезадаптации или, напротив, адаптации к повторяющемуся стрессору, а также тем, что для оценки всасывания глюкозы в целом и его отдельных составляющих – активного транспорта, облегченной диффузии – используются подходы, не вполне адекватно отражающие функционирование реальных живых систем.

Ранее при имитации хронического стресса у крыс путем ежедневного введения кортикостерона в повышенных концентрациях мы показали, что уровень всасывания глюкозы в тонкой кишке *in vivo*, в условиях, наиболее близких к физиологическим (в отсутствие наркоза и хирургических операций), прямо коррелирует с концентрацией кортикостерона в крови [9]. При этом мы наблюдали различную реакцию транспортеров глюкозы SGLT1 и GLUT2 в апикальной мембране энтероцитов на повышение уровня кортикостерона в крови. Однако такая экспериментальная модель стресса достаточно хорошо имитирует физиологическое состояние организма в случае отсутствия адаптации гипоталамо-гипофизарной адренокортикальной системы (ГГАКС) к хроническому стрессору. Представлялось логичным и важным проанализировать связь между уровнем всасывания глюкозы в тонкой кишке и тяжестью хронического стресса на экспериментальных моделях, которые обеспечивают адаптацию ГГАКС к хроническому стрессору.

Цель настоящей работы состояла в том, чтобы впервые в условиях максимально близких к физиологическим исследовать адаптацию всасывания глюкозы в тонкой кишке, транспортеров глюкозы SGLT1, GLUT2 в энтероцитах и мембранных кишечных карбогидраз к умеренному стрессу, вызванному ежедневой 3-часовой иммобилизацией крыс на протяжении 16 дней при комнатной (21 ± 2°C) температуре и к аналогичному, но более сильному, стрессорному воздействию при пониженной (5 ± 1°C) температуре.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В опытах использовались взрослые крысы линии Вистар (самцы, исходная масса тела 180–220 г), полученные из ЦКП Биоколлекция Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Эксперименты проводились в полном соответствии с Директивой Европейского Совета (The European Council Directive (86/609/EEC)) по соблюдению этических принципов в работе с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных при ФГБУН “Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН”.

Перед началом опытов и при их проведении, исключая периоды стрессорного воздействия, животные содержались в нормальных условиях по температуре и

освещению, а также имели свободный доступ к стандартному лабораторному корму и воде.

Всасывание глюкозы в тонкой кишке оценивалось по средней скорости свободного потребления крысами ее концентрированного (200 г/л) раствора. Как было показано нами ранее [11], эта скорость в среднем постоянна в широком временном интервале (от 1 до 5 ч) и почти не зависит от исходной концентрации раствора. Она может служить надежным критерием (хотя и косвенным, но зато объективным и количественным) оценки всасывательной способности тонкой кишки в отношении глюкозы в условиях, близких к естественным (без наркоза и хирургических операций). Чтобы вызвать у животных потребность в свободном питье раствора глюкозы их накануне лишали корма (но не воды) на 18–20 ч.

Эта методика уникальна в том отношении, что только она позволяет проводить многократные опыты по оценке всасывательной способности тонкой кишки на одном и том же животном в течение продолжительного времени (до нескольких месяцев), что особенно важно при исследовании особенностей адаптации системы всасывания глюкозы в тонкой кишке к умеренному и более сильному хроническому стрессу.

Были проведены две серии опытов с регистрацией скорости свободного потребления раствора глюкозы.

В первой серии животных из опытных групп ежедневно подвергали трехчасовой иммобилизации при комнатной температуре в специальных клетках-“норках”, частично ограничивающих их подвижность, а у контрольных – на это время отбирали корм. Такой вид стессорного воздействия является моделью умеренного эмоционального и физического стресса. Опыты с иммобилизацией проводили в дневное время с 10:00 до 13:00.

Сначала в нескольких предварительных экспериментах (до начала опытов со стрессом) у каждого животного в течение 5–6 ч регистрировалась временная динамика свободного потребления раствора глюкозы (200 г/л). Для этого каждое животное помещали в индивидуальную клетку размером 14 × 21 × 11 см с двумя мерными поилками, в одной из которых содержался раствор глюкозы, а в другой – обычная вода. Затем, методом линейной регрессии с использованием программного ресурса ORIGIN 7 (OriginLabCorporation, США) [11] определялось среднее значение исходной скорости всасывания глюкозы в тонкой кишке.

По результатам предварительных опытов было сформировано 4 группы: О1, О2 (опыт) и К1, К2 (контроль) по 7 крыс в каждой с близкими средними значениями скоростей свободного потребления раствора глюкозы (табл. 1).

Уровень всасывания глюкозы в тонкой кишке у всех животных (опытных и контрольных) оценивали по скорости свободного потребления ими раствора глюкозы (200 г/л) на следующий день после предварительного голодания в течение 18–20 ч в интервале 10:00–15:00 ч (в период неактивной фазы питания у крыс). При расчетах на каждом сроке суммировались данные по группам О1 и О2 и по группам К1 и К2.

По результатам предварительных опытов были сформированы еще две группы крыс с близкими средними значениями скоростей свободного потребления раствора глюкозы: О3 (опыт) и К3 (контроль) по 9 крыс в каждой. Они использовались для определения кортикостерона в крови крыс через 3, 10 и 16 дней после начала умеренного стресса ($n = 3$ на каждом сроке).

Через 3, 10 и 16 дней после начала опытов с хроническим стрессом у каждого животного в состоянии покоя (то есть спустя 22 ч после окончания предыдущего стрессорного воздействия) по указанной выше методике определялась скорость всасывания глюкозы в тонкой кишке. На каждом из сроков в конце опыта с регистрацией скорости свободного потребления раствора глюкозы у части животных из опытных и контрольных групп ($n = 5–8$) после их декапитации отбирались пробы

Таблица 1. Дизайн опытов с определением всасывания глюкозы в тонкой кишке крыс с иммобилизационнным стрессом при комнатной температуре (21 ± 2°C)
Table 1. Design of the experiments on estimation of glucose absorption in the small intestine of rats under immobilization stress at room temperature (21 ± 2°C)

За 3–4 дня до стресса 3–4 days before stress		Время, прошедшее от начала опытов со стрессом, дни Time elapsed from the beginning of the experiments with stress, days																	
		1–3			4	5	5–10				11	12	12–16				17	18	
			24					6–11					13–18						
O1 (7)	R	**O1** (Стресс, Stress) (7)			R	**O1** (Стресс, Stress) (7)					R	**O1** (Стресс, Stress) (4)					R		
K1 (7)	R	**K1 (**Контр., Contr.) (7)			R	**K1(**Контр., Conr-tr.) (7)					R	**K1 (**Контр., Con-tr.) (4)					R		
O2 (7)	R		**O2** (Стресс, Stress) (7)		R			**O2** (Стресс, Stress) (7)			R			**O2** (Стресс, Stress) (4)			R		
K2 (7)	R		**K2** (Контр., Contr.) (7)		R			**K2** (Контр., Contr.) (7)			R			**K2** (Контр., Contr.) (4)			R		

R – регистрация свободного потребления крысами раствора глюкозы (в скобках указано число животных).
R – registration of free consumption of glucose solution by rats (the number of animals is indicated in brackets).

слизистой оболочки из различных отделов кишечника для оценки в них активности кишечных ферментов и содержания белка. Кроме того, из середины тощей кишки отбирались пробы ткани для анализа содержания транспортеров глюкозы SGLT1 и GLUT2 в апикальной мембране энтероцитов. У животных из опытной (O3) и контрольной (K3) групп в те же сроки (3, 10 и 16 дней) через 30 мин после начала стрессорного воздействия и декапитации отбирались пробы крови для определения в них концентрации кортикостерона.

Активности глюкоамилазы (НФ 3.2.1.3) и мальтазы (НФ 3.2.1.20), а также содержание белка в слизистой оболочке кишечника определялись общепринятыми биохимическими методами, как описано ранее [9]. Ферментативные активности выражали в мкмоль/мин/г белка (удельная активность) и на массу слизистой оболочки участка или всего кишечника (интегральная активность), а содержание белка – в мг/г влажной массы слизистой оболочки (удельное содержание) и на массу слизистой оболочки участка или всего кишечника (интегральное содержание).

Содержание транспортеров глюкозы SGLT1 и GLUT2 в апикальной мембране энтероцитов оценивалось с использованием иммуногистохимии и конфокальной микроскопии, как описано ранее [12]. Готовые срезы просматривали на конфокальном микроскопе Leica TCS SL (Германия). Содержание транспортеров глюкозы в апикальной мембране энтероцитов оценивали полуколичественным способом путем измерения по программе Image J средней интенсивности иммунофлуоресцентного свечения (в относительных единицах) в полосках, охватывающих щеточную кайму энтероцитов, расположенных вдоль периметра ворсинки (в расчет принимались энтероциты из верхней и средней третей кишечной ворсинки).

Концентрацию кортикостерона в плазме крови определяли иммуноферментным анализом с использованием набора реагентов “Кортикостерон крыса/мышь-ИФА” фирмы ХЕМА.

Во второй серии опытов хроническая иммобилизация животных проводилась ежедневно в таких же клетках-“норках”, но помещавшихся в холодильную камеру на 3 ч при пониженной температуре (5 ± 1°C). Контрольные животные в это время не подвергались иммобилизации и содержались при комнатной температуре, но не получали корма и воды.

Таблица 2. Дизайн опытов с определением всасывания глюкозы при иммобилизационном стрессе на холоде (5 ± 1°C)
Table 2. Design of the experiments on estimation of glucose absorption in the small intestine of rats under immobilization stress in the cold (5 ± 1 °C)

3–4 дня до стресса 3–4 days before stress		Время, прошедшее от начала опытов со стрессом, дни Time elapsed from the beginning of the experiments with stress, days					
		1–3	4	5–10	11	12–16	17
O1 (5)	R	**O1** (Стресс, Stress) (5)	R				
K1 (5)	R	**K1 (**Контр., Contr.)(5)	R				
O2 (5)	R	**O2** (Стресс, Stress) (5)	R	**O2** (Стресс, Stress) (5)	R		
K2 (5)	R	**K2** (Контр., Contr.) (5)	R	**K2** (Контр., Contr.) (5)	R		
O3 (5)	R	**O3** (Стресс, Stress) (5)	R	**O3** (Стресс, Stress) (5)	R	**O3** (Стресс, Stress) (5)	R
K3 (5)	R	**K3** (Контр., Contr.) (5)	R	**K3** (Контр., Contr.) (5)	R	**K3** (Контр., Contr.) (5)	R

R – регистрация свободного потребления крысами раствора глюкозы (в скобках указано число животных).
R – registration of free consumption of glucose solution by rats (the number of animals is indicated in brackets).

Как и в первой серии, в нескольких предварительных экспериментах (до начала опытов со стрессом) у каждого животного в течение 5–6 ч регистрировалась временная динамика свободного потребления раствора глюкозы (200 г/л) и определялось среднее значение исходной скорости всасывания глюкозы в тонкой кишке. По результатам этих предварительных опытов было сформировано шесть групп крыс с близкими средними значениями скоростей свободного потребления раствора глюкозы: O1, O2, O3 (опыт) и K1, K2 и K3 (контроль).

Через 3, 10 и 16 дней после начала опытов с мобилизацией крыс при пониженной температуре у каждого животного определялась скорость всасывания глюкозы в тонкой кишке концентрированного (200 г/л) раствора глюкозы. При этом дизайн второй серии (табл. 2) отличался тем, что регистрация потребления крысами раствора глюкозы проводилась в один день у всех шести групп (O1, O2, O3 и K1, K2, K3). В расчетах на каждом сроке суммировались данные по группам O1, O2 и O3 (опыт), а также по группам K1, K2 и K3 (контроль).

После каждого срока хронической иммобилизации у животных из опытных и контрольных групп после их декапитации отбирались пробы слизистой оболочки кишечника для оценки в них активности кишечных ферментов и содержания белка, а из середины тощей кишки отбирались пробы ткани для анализа содержания транспортеров глюкозы SGLT1 и GLUT2 в апикальной мембране энтероцитов. У нескольких животных опытных и контрольных групп (по три из каждой) в те же сроки (3, 10 и 16 дней) через 30 мин после начала стрессорного воздействия и декапитации отбирались пробы крови для определения в них концентрации кортикостерона.

Расчеты. В тексте статьи и на рисунках результаты представлены в виде среднего арифметического (M) со стандартной ошибкой среднего ($\pm m$).

Статистика. Обработка результатов опытов проводилась с использованием *t*-критерия Стьюдента и частично (отмечено в тексте) с использованием непараметрического критерия Вилкоксона–Манна–Уитни. За достоверные принимались различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Масса тела животных. В первые 3 дня хронической иммобилизации крыс при комнатной температуре прирост массы тела у них несколько снижался по сравнению с контролем. Но в дальнейшем он восстанавливался до уровня близкого к контролю, и через 16 дней масса тела крыс в опытной группе была лишь слегка ниже, чем в контрольной (234.6 ± 6.1 и 243.1 ± 5.2 г, соответственно). В случае аналогичного воздействия при пониженной температуре масса тела животных в первые 3 дня практически не менялась, а затем ее прирост был близок к контролю. К концу экспериментального периода масса тела у крыс после стресса была лишь на 7.7% ниже, чем у контрольных (250.0 ± 8.0 и 270.0 ± 16.0 г, соответственно).

Уровень кортикостерона в плазме крови. После трех дней хронической изоляции крыс при комнатной температуре содержание кортикостерона в плазме крови у них было в 2.5 раза выше, чем в контроле (21.4 ± 2.1 против 8.5 ± 1.4 мкг/дл, $p < 0.05$ по критерию Вилкоксона–Манна–Уитни). Однако через 10 и 16 дней такого воздействия содержание гормона в плазме крови (12.8 ± 1.6 и 10.6 ± 1.6 мкг/дл соответственно) существенно не отличалось от контроля (10.5 ± 1.5 и 7.1 ± 1.3 мкг/дл соответственно). В случае хронической иммобилизации крыс при пониженной температуре содержание кортикостерона в плазме крови через 3, 10 и 16 дней было значительно ($p < 0.001$) выше по сравнению с контролем (19.4 ± 0.4; 24.0 ± 2.2 и 19.4 ± 2.1 мкг/дл против 7.3 ± 1.2; 6.0 ± 1.3 и 5.0 ± 0.2 мкг/дл в контроле, соответственно).

Такую реакцию гормона можно рассматривать как адаптивную, так как она направлена на снижение влияния хронического стресса на энергетический баланс.

Содержание белка в слизистой оболочке кишечника. Через 3 и 10 дней хронической иммобилизации крыс при комнатной температуре (рис. 1) наблюдалась тенденция к повышению содержания белка в слизистой оболочке ряда участков кишечника (в расчете на массу слизистой оболочки данного участка). Однако это повышение было статистически достоверным по сравнению с контролем лишь в проксимальном участке тощей кишки через 10 дней (на 44%, $p < 0.02$ по критерию Вилкоксона–Манна–Уитни).

Через 16 дней такого воздействия содержание белка в различных отделах кишечника было близким к контролю.

В случае хронической иммобилизации крыс при пониженной температуре (рис. 1*B*) содержание белка в ряде отделов кишечника было сниженным по сравнению с контролем на всех сроках: через 3 дня – в двенадцатиперстной кишке (на 33%, $p < 0.02$), через 10 дней – в двенадцатиперстной кишке (на 17%, $p < 0.02$), в подвздошной кишке (на 22%, $p < 0.02$) и в толстой кишке (на 56%, $p < 0.01$), а через 16 дней – в дистальном участке тощей кишки (на 48%, $p < 0.01$ по критерию Вилкоксона–Манна–Уитни).

Всасывание глюкозы. Как было отмечено выше, скорость всасывания глюкозы в тонкой кишке (мкмоль/мин) у крыс оценивалась по скорости свободного потребления этими животными (после предварительного голодания в течение 18–20 ч) концентрированного раствора глюкозы (200 г/л). После 3 дней хронической иммобилизации крыс при нормальной температуре ($n = 14$) скорость потребления раствора глюкозы повышалась по сравнению с контролем (на 7%, $p < 0.01$), но через 10 ($n = 14$) и 16 ($n = 8$) дней она не отличалась от контроля (рис. 2*A*).

Если принять во внимание приведенные выше данные об изменении уровня кортикостерона в крови на аналогичных сроках, то можно предположить, что именно этот фактор является наиболее существенным в развитии адаптации системы всасывания глюкозы в тонкой кишке к хроническому умеренному стрессу. Такое предположение подкрепляется также другими нашими данными, полученны-

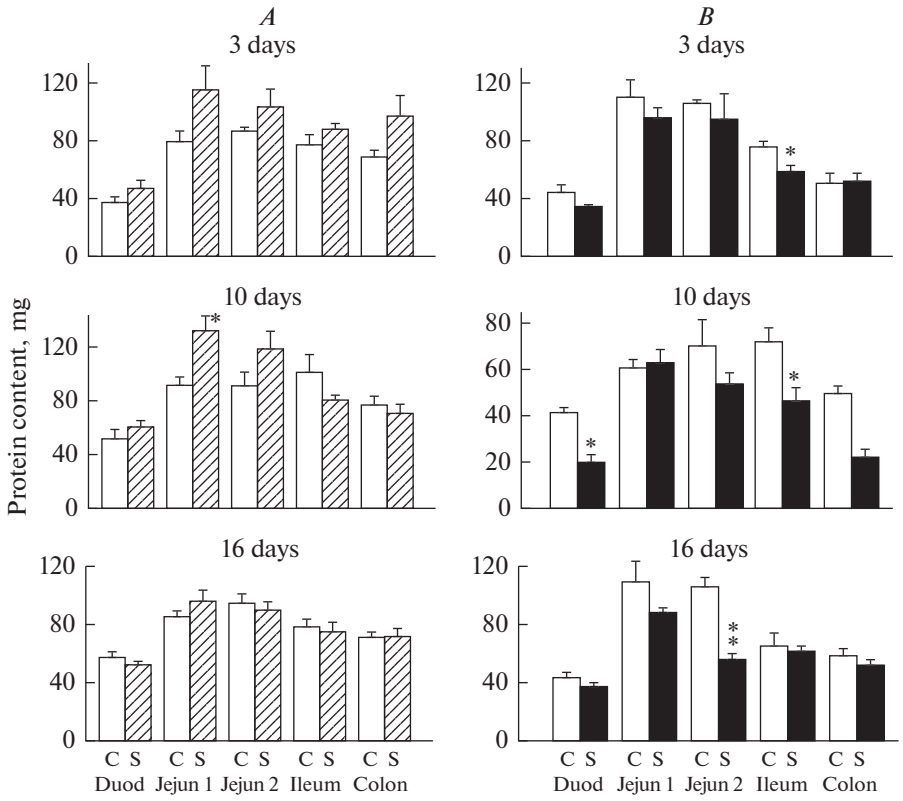


Рис. 1. Содержание белка в различных участках кишечника ($M \pm m$, в расчете на массу слизистой оболочки данного участка) в контроле и в ходе хронического иммобилизационного стресса при комнатной (*A*) и пониженной (*B*) температуре ($n = 5$).

Обозначения: C – контроль; S – стресс; * $p < 0.02$; ** $p < 0.01$ (по критерию Вилкоксона–Манна–Уитни).

Fig. 1. The protein content in various parts of the intestinal tract (calculated per mass of mucosa in the given part) during chronic immobilization stress at room (*A*) and lowed (*B*) temperature ($n = 5$).

Designations: C – control; S – stress; * $p < 0.02$; ** $p < 0.01$ (according to the Wilcoxon–Mann–Whitney criterion).

ми в предшествующей работе [10], которые свидетельствуют о том, что стимулирующие эффекты кортикостерона в отношении всасывания глюкозы в тонкой кишке зависят от дозы вводимого гормона.

В случае такого же воздействия при пониженной температуре скорость потребления раствора глюкозы на всех сроках была существенно выше, чем в контроле: через 3 дня – на 32%, через 10 – на 30%, и через 16 дней – на 42% ($p < 0.001$) (рис. 2*B*).

Содержание транспортеров глюкозы в апикальной мембране энтероцитов. В случае хронической иммобилизации крыс при комнатной температуре отмечалась тенденция к повышению содержания транспортера SGLT1 в апикальной мембране энтероцитов тощей кишки на всех сроках стрессорного воздействия (рис. 3*A*). При этом содержание транспортера GLUT2 в апикальной мембране энтероцитов тощей кишки было выше, чем в контроле (на 85%, $p < 0.05$) через 3 дня, но не менялось через 10 и 16 дней.

При хронической иммобилизации крыс на холоде содержание транспортеров (как SGLT1, так и GLUT2) в апикальной мембране энтероцитов тощей кишки су-

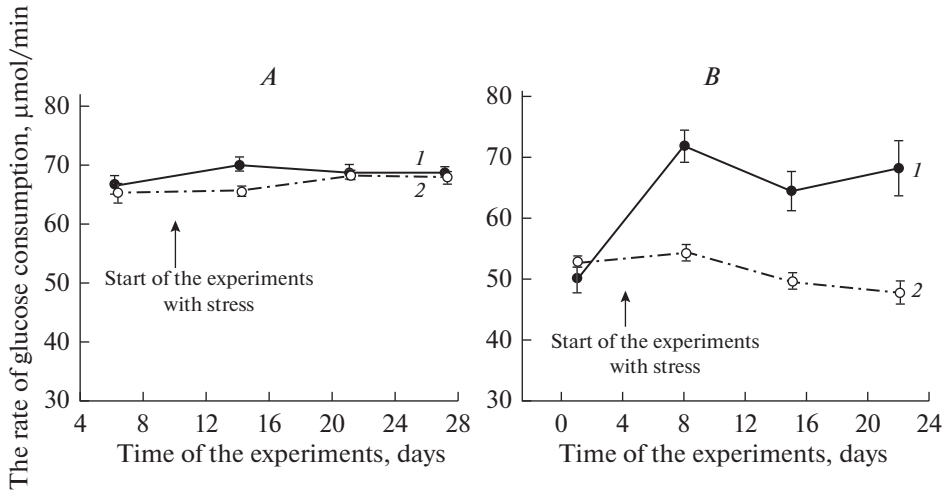


Рис. 2. Скорость свободного потребления крысами концентрированного раствора глюкозы (200 г/л) в контроле и в ходе хронического иммобилизационного стресса при комнатной (*A*) (n = 14, 14 и 8) и пониженной (*B*) (n = 15, 10 и 5) температурах ($M \pm m$).

Обозначения: *1* – опыт (стресс); *2* – контроль (без стресса); * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$.

Fig. 2. The rate of free consumption of concentrated glucose solution (200 g/L) by rats in the control and during chronic immobilization stress at room (*A*) (n = 14, 14 и 8) and lowed (*B*) (n = 15, 10 и 5) temperatures ($M \pm m$).

Designations: *1* – the experiment (stress); *2* –control (no stress); * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$.

щественно не менялось через 3 и 10 дней, но было заметно повышенным через 16 дней по сравнению с контролем. Однако достоверным это повышение было только в отношении SGLT1 (на 70%, $p < 0.05$).

Активности ферментов. На рис. 4 представлены данные об удельной активности глюкоамилазы и мальтазы (мкмоль/мин/г белка, в среднем по всей кишке). Важно отметить, что у обоих ферментов наибольший вклад в их активность вносит тонкая кишка.

В ходе хронической иммобилизации крыс при комнатной температуре удельная активность обоих ферментов на всех сроках достоверно не менялась по сравнению с контролем. Однако имела место тенденция к снижению активности мальтазы через 3 дня и глюкоамилазы – через 10 дней стрессорного воздействия. В случае хронической иммобилизации крыс при пониженной температуре значения удельной активности глюкоамилазы и мальтазы через 3 (n = 6) и 10 (n = 6) дней были повышенными по сравнению с контролем: для глюкоамилазы – на 26% ($p < 0.05$) и в 2.2 раза, ($p < 0.01$), для мальтазы – на 35% (но $p > 0.05$) и в 1.9 раз ($p < 0.01$) соответственно. Через 16 дней (n = 6) стрессорного воздействия активности этих ферментов не отличались от контроля. В основном близкие изменения наблюдались и в отношении интегральной (в среднем по всей кишке) активности этих ферментов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как показали наши результаты, ежедневная трехчасовая иммобилизация крыс на протяжении 16 дней как при комнатной температуре, так и на холоде не влияет (за исключением первых трех дней) на прирост массы тела животных. Отсутствие изменений прироста массы тела лабораторных животных в случае их хрониче-

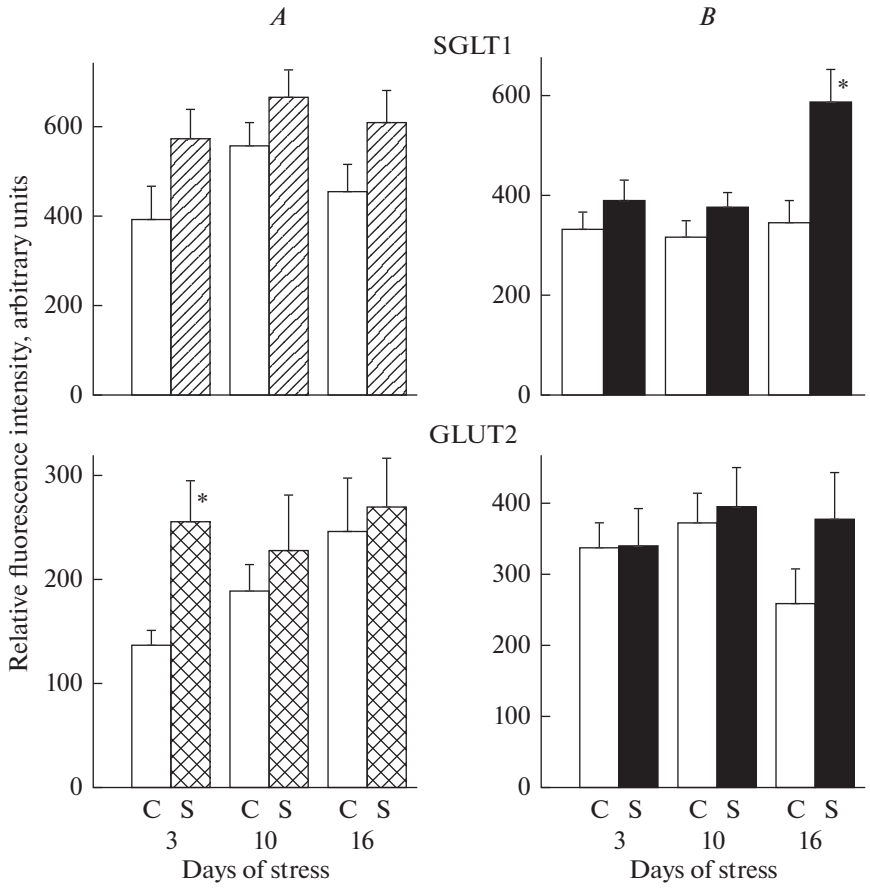


Рис. 3. Содержание транспортеров глюкозы SGLT1 и GLUT2 в апикальной мембране энтероцитов тощей кишки крыс ($M \pm m$) в контроле и в ходе хронического иммобилизационного стресса при комнатной (*A*) ($n = 5$) и пониженной (*B*) ($n = 5$) температурах.

Обозначения: C – контроль; S – стресс; * $p < 0.01$ (по критерию Вилкоксона–Манна–Уитни).

Fig. 3. The content of glucose transporters SGLT1 and GLUT2 in the apical membrane of jejunum enterocytes in the rats in the controls and during chronic immobilization stress at room (*A*) ($n = 5$) and lowed (*B*) ($n = 5$) temperature.

Designations: C – control; S – stress; * $p < 0.01$ (according to the Wilcoxon–Mann–Whitney criterion).

ской иммобилизации при комнатной температуре отмечали и другие исследователи [13, 14]. Имеются также данные, что и хроническое кратковременное воздействие холода на мышей (4 °C в течение 1–4 ч три раза в неделю) [15] или (4 °C в течение 1 ч на протяжении 7 недель) [16] и на крыс (4 °C в течение 6 ч на протяжении 14 дней) [17] не вызывает изменения массы тела у этих животных.

При определении содержания кортикостерона в плазме крови крыс в ходе их хронической иммобилизации при комнатной температуре мы обнаружили прогрессивное снижение этого показателя на фоне стресса с увеличением длительности стрессорного воздействия, что свидетельствовало об адаптации ГГАКС к этому стрессору. Факт адаптации ГГАКС и некоторых других физиологических показателей организма у лабораторных животных к хроническому иммобилизационному

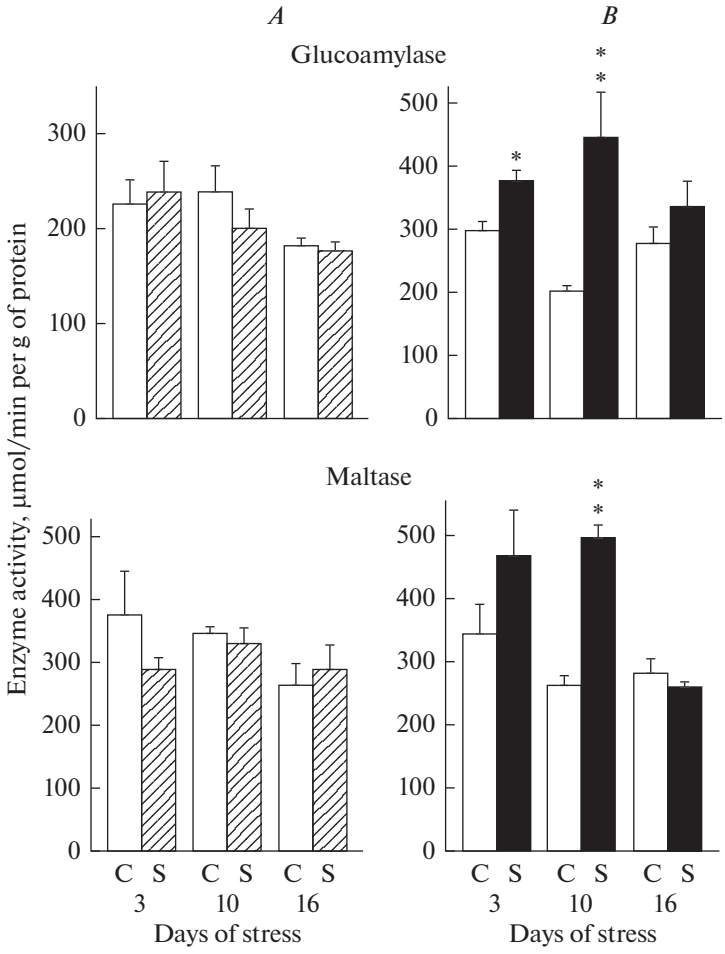


Рис. 4. Удельные активности ($M \pm m$) глюкоамилазы и мальтазы (мкмоль/мин/г белка) в среднем по всей кишке крыс в контроле и в ходе хронического иммобилизационного стресса при комнатной (*A*) и пониженной (*B*) температурах.

Обозначения: C – контроль; S – стресс; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Fig. 4. The specific activity of glucoamylase and maltase (μmol/min/g protein) on average throughout the intestine in the controls and during chronic immobilization stress at room (*A*) and lowed (*B*) temperatures.

Designations: C – control; S – stress; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

стрессу при нормальной температуре среды отмечался и в других работах [14, 18, 19]. Однако в случае хронической иммобилизации крыс при пониженной температуре в наших опытах уровень кортикостерона в плазме крови на фоне стресса был достоверно выше, чем в контроле при всех сроках этого воздействия (3, 10 и 16 дней). Полученный нами результат хорошо согласуется с данными работы Eshkevari с соавт. [20], где показан повышенный по сравнению с контролем уровень кортикостерона в плазме крови мышей через 1 ч после возвращения животных к нормальной температуре после одночасовой их выдержки на колотом льду (2–5°C) в течение 10 дней. Поскольку у теплокровных животных и человека снижение температуры окружаю-

щей среды вызывает усиление термогенеза [15–17], можно предположить, что наличие этого фактора в нашей модели хронической иммобилизации оказывает доминирующее влияние на развитие адаптации ГГАКС к данному стрессору.

Существенные различия между ответами на хроническую иммобилизацию крыс при комнатной температуре и на холоде были обнаружены нами и в отношении содержания белка в слизистой оболочке различных отделов кишечника. Так, в случае хронической иммобилизации крыс при комнатной температуре происходило небольшое повышение содержания белка в слизистой оболочке тощей кишки (в расчете на массу участка кишечника) через 10 дней, без изменения этого показателя на других сроках. Однако при иммобилизации на холоде содержание белка в слизистой оболочке было сниженным (по сравнению с контролем) в ряде отделов кишечника на всех сроках этого воздействия (рис. 1*B*). Таким образом, только в случае хронической иммобилизации на холоде проявлялось катаболическое действие повышенных уровней кортикостерона в плазме крови (через 3, 10 и 16 дней) в отношении содержания белков в слизистой оболочке кишечника.

Как мы уже упоминали выше, данные литературы о влиянии хронического стресса на всасывание глюкозы в тонкой кишке, в том числе, на две его составляющие – активный транспорт с участием SGLT1 и облегченную диффузию с участием GLUT2 – весьма неоднозначны [3–10]. Эти расхождения могут быть обусловлены, в частности, тем, что для оценки всасывания глюкозы в целом и его составляющих использовались подходы, не вполне адекватно отражающие функционирование реальных живых систем.

В нашей предшествующей работе [9] для определения скорости всасывания глюкозы в тонкой кишке мы применяли методику с регистрацией временной динамики свободного потребления крысами концентрированного раствора глюкозы, что обеспечивало условия максимально близкие к физиологическим. При этом было показано, что ежедневное введение животным кортикостерона в повышенных дозах (соответствующих хроническому стрессу разной степени тяжести) сопровождается усилением всасывания глюкозы в тонкой кишке, причем эффект прямо зависел от дозы гормона. Эти результаты в совокупности с данными литературы позволяли рассматривать такую реакцию системы всасывания глюкозы на глюкокортикоиды (экзогенные или секретируемые при стрессе) как нормальный адаптивный ответ. В настоящей работе впервые в условиях, максимально близких к физиологическим, были проанализированы изменения системы всасывания глюкозы в тонкой кишке на моделях (хроническая иммобилизации животных при нормальной и пониженной температуре среды, соответствующих умеренному и более сильному стрессу), которые проявляют адаптацию физиологических показателей к хроническому стрессору. Важно заметить, что в наших экспериментах регистрация потребления крысами раствора глюкозы проводилась в отсутствие в этот день стрессорного воздействия.

Результаты настоящего исследования показали, что в случае хронической иммобилизации крыс при комнатной температуре небольшое повышение всасывания глюкозы в тонкой кишке (по сравнению с контролем) происходило только через 3 дня, тогда как в сочетании с холодом такая иммобилизация приводила к значительному повышению всасывания глюкозы в тонкой кишке на всех сроках стрессорного воздействия. Эти изменения всасывания глюкозы хорошо коррелировали с изменениями в уровне кортикостерона в плазме крови крыс при тех же воздействиях и на соответствующих сроках, что свидетельствует о важной роли эндогенного кортикостерона в изменении всасывания глюкозы в тонкой кишке в наших моделях хронического стресса.

Известно, что даже кратковременное (на несколько часов в день), но регулярное понижение температуры среды приводит к развитию адаптации организма к холоду,

первичным ответом которой является ускорение метаболизма в различных органах, что обеспечивает повышенную выработку тепла для сохранения температуры тела [17, 21]. Воздействие холода на организм сопровождается также повышенным потреблением пищи [15, 16, 22], что, в свою очередь, приводит к увеличению времени воздействия углеводной нагрузки на тонкую кишку. Кроме того, в некоторых работах [22, 23] показано усиление под влиянием холодового стресса скорости поглощения глюкозы в органах, играющих существенную роль в термогенезе: в мышечной ткани, белой и бурой жировых тканях. Учитывая вышесказанное, в наших опытах с хронической иммобилизацией на холоде было вполне резонно ожидать повышения всасывания глюкозы как важного энергетического субстрата. Это повышение скорости всасывания глюкозы, по-видимому, направлено на обеспечение быстрого пополнения энергетических запасов в организме при их повышенном расходе, что хорошо вписывается в схему координированной адаптации всех систем организма млекопитающих к пониженной температуре среды.

Обращают на себя внимание результаты, полученные нами в отношении изменения содержания транспортеров глюкозы SGLT1 и GLUT2 в апикальной мембране энтероцитов при хронической иммобилизации крыс. Оказалось, что небольшое повышение всасывания глюкозы в тонкой кишке, наблюдаемое через 3 дня после начала иммобилизации животных при комнатной температуре, сопряжено в основном с увеличением в апикальной мембране энтероцитов содержания транспортеров облегченной диффузии GLUT2. Примерно такая же реакция в отношении транспортеров GLUT2 в апикальной мембране энтероцитов тощей кишки наблюдалась и в нашей предшествующей работе при имитации хронического стресса у крыс введением повышенных доз кортикостерона [9]. Аналогично нашим данным, Boudry с соавт. [5], используя модель хронического стресса у крыс, вызванного избеганием воды (“water-avoidance stress” [5]), обнаружили повышение экспрессии транспортеров GLUT2 в энтероцитах без изменения в экспрессии транспортеров SGLT1. Этот результат представляется вполне логичным в связи с тем, что в энтероцитах всегда имеется внутриклеточный пул транспортеров GLUT2, и они способны достаточно быстро встраиваться в апикальную мембрану этих клеток в случае необходимости срочного увеличения скорости всасывания глюкозы в тонкой кишке [3]. Однако в отличие от наших данных и результатов Boudry с соавт. [5], в работе Lee [6] сообщается о повышении экспрессии SGLT1 в тощей и подвздошной кишке после хронического стресса, вызванного ограничением подвижности крыс (4 ч ежедневно в течение 8 нед.) по сравнению с контролем. Возможно, что отмеченные различия в реакциях транспортеров глюкозы на хронический стресс связаны с более длительным периодом этого воздействия в опытах Lee [6] по сравнению с тем, что имело место в наших опытах и опытах Boudry с соавт. [5].

Иная картина наблюдалась нами в отношении реакции транспортеров SGLT1 и GLUT2 на хроническую иммобилизацию крыс на холоде. Через 3 и 10 дней этого воздействия, несмотря на повышенное всасывание глюкозы в тонкой кишке, в апикальной мембране энтероцитов не выявлялось существенных изменений в содержании обоих транспортеров по сравнению с контролем. Возможно, это связано с тем, что на данных сроках развития адаптации к умеренному холоду повышенное всасывание глюкозы в тонкой кишке происходит за счет увеличения активности Na^+/K^+-АТФазы в базолатеральной мембране энтероцитов, обеспечивающей энергией активный транспорт глюкозы через апикальную мембрану с участием SGLT1. В пользу такого предположения свидетельствуют данные о повышении уровня АТФ в клетках многих жизненно важных органов под влиянием хронического холодового прерывистого стресса [17]. Вместе с тем, через 16 дней хронической иммобилизации на холоде, на фоне сохранения повышенного всасывания глюкозы в тонкой кишке, содержание обоих транспортеров в апикальной мембра-

не энтероцитов, особенно SGLT1, заметно увеличилось. Учитывая наши данные в отношении снижения в тощей кишке через 16 дней общего содержания белка, можно предположить, что в этих условиях увеличение содержания транспортеров SGLT1 и GLUT2 в апикальной мембране энтероцитов является компенсаторной реакцией, направленной на сохранение на повышенном уровне скорости всасывания глюкозы в тонкой кишке. Безусловно, этих данных, полученных в отношении только одного небольшого участка из тощей кишки, недостаточно для того, чтобы судить о механизмах, обеспечивающих изменение всасывания глюкозы в тонкой кишке в целом. Кроме того, нельзя исключить, что в повышенное всасывание глюкозы может вносить вклад и подвздошная кишка как резервная зона тонкой кишки в случае чрезмерной углеводной нагрузки на тощую кишку. К сожалению, полученные нами результаты трудно сравнивать с данными других авторов, так как в имеющейся литературе практически нет сведений о реакции различных транспортеров глюкозы в тонкой кишке на холодовой стресс.

Особый интерес представлял анализ реакции ключевых мембранных карбогидраз на хроническую иммобилизацию крыс при комнатной и пониженной температуре. В нашей работе установлено, что в первом случае активности глюкоамилазы и мальтазы (в среднем по всей кишке, как в расчете на мг белка, так и на массу слизистой оболочки кишечника) заметно не менялись по сравнению с контролем на всех сроках этого стрессорного воздействия. Однако при хронической иммобилизации на холоде имело место достоверное повышение активностей обоих ферментов через 3 и 10 дней и их возвращение к значениям в контроле через 16 дней хронического стресса. Известно, что мембранные карбогидразы имеют определенный запас активности, что позволяет сохранить на высоком уровне мембранный гидролиз пищевых олигомеров и всасывание образующейся из них глюкозы в случае повышенной углеводной нагрузки на тонкую кишку. В связи с этим можно было ожидать отсутствия изменения активности исследованных ферментов на фоне незначительного повышении всасывания глюкозы в тонкой кишке в случае хронической иммобилизации животных при комнатной температуре. В то же время адаптация к пониженной температуре среды всегда сопровождается повышенным потреблением пищи [16, 22, 24] и, соответственно, увеличенным временем контакта углеводной нагрузки со слизистой оболочкой тонкой кишки, что может служить ключевым фактором для ускорения в ней синтеза ферментов, участвующих в мембранном пищеварении углеводов. Однако через 16 дней хронической иммобилизации крыс на холоде повышения активностей карбогидраз в тонкой кишке в наших опытах не происходило. Возможно, проявлению этого эффекта препятствовало существенно усиленное на этом сроке катаболическое действие эндогенных глюкокортикоидов в отношении белков в слизистой оболочке тонкой кишки.

В целом, проведенная работа показала, что пониженная температура среды в сочетании с хронической иммобилизацией животных существенно модифицирует адаптацию ГГАКС и пищеварительных характеристик тонкой кишки к этому виду стрессорного воздействия. Результаты работы дают новую информацию, важную для понимания временных особенностей развития адаптации системы всасывания глюкозы, транспортеров глюкозы SGLT1 и GLUT2 в энтероцитах, а также ферментов, реализующих мембранный гидролиз углеводов, к умеренному и усиленному хроническому стрессу.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность с.н.с. Института цитологии РАН, к.б.н. Н.М. Грефнер за консультацию и помощь в использовании методов иммуногистохимии и конфокальной микроскопии при анализе транспортеров глюкозы в энтероцитах тонкой кишки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *McEwen B.S., Akil H.* Revisiting the stress concept: implications for affective disorders. J. Neurosci. 40(1): 12–21. 2020.
2. *Patterson Z.R., Abizaid A.* Stress induced obesity: lessons from rodent models of stress. Front. Neurosci. (7): 130. 2013.
3. *Shepherd E.J., Helliwell P.A., Mace O.J., Morgan E.L., Patel N., Kellett G.L.* Stress and glucocorticoid inhibit apical GLUT2-trafficking and intestinal glucose absorption in rat small intestine. J. Physiol. 560(Pt.1): 281–290. 2004.
4. *Garriga C., Hunter R.R., Amat C., Planas J.M., Mitchell M.A., Moretó M.* Heat stress increases apical glucose transport in the chicken jejunum. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 290(1): R195–R201. 2006.
5. *Boudry G., Cheeseman C.I., Perdue M.H.* Psychological stress impairs Na^+-dependent glucose absorption and increases GLUT2 expression in the rat jejunum brush-border membrane. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 292(2): R862–R867. 2007.
6. *Lee C.Y.* Chronic restraint stress induces intestinal inflammation and alters the expression of hexose and lipid transporters. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 40(6): 385–391. 2013.
7. *Toyoda A., Iio W., Matsukawa N., Tsukahara T.* Influence of chronic social defeat stress on digestive system functioning in rats. J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo). 61(3): 280–284. 2015.
8. *Li Y., Song Z., Kerr K.A., Moeser A.J.* Chronic social stress in pigs impairs intestinal barrier and nutrient transporter function, and alters neuro-immune mediator and receptor expression. PLoS One. 12(2): e01716. 2017. 2017.
9. *Громова Л.В., Дмитриева Ю.В., Грефнер Н.М., Алексеева А.С., Груздков А.А.* Функциональные показатели тонкой кишки крыс при имитации хронического стресса введением повышенных доз кортикостерона. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 104(7): 797–806. 2018. [*Gromova L.V., Dmitrieva Y.V., Grefner N.M., Aleksseva A.S., Gruzdkov A.A.* Functional indicators of the rat small intestine during imitation of chronic stress by introduction of high doses of corticosterone. Russ. J. Physiol. 104(7): 797–806. 2018. (In Russ)].
10. *Al-Zghoul M.B., Alliftawi A.R.S., Saleh K.M.M., Jaradat Z.W.* Expression of digestive enzyme and intestinal transporter genes during chronic heat stress in the thermally manipulated broiler chicken. Poult. Sci. 98(9): 4113–4122. 2019.
11. *Gruzdkov A.A., Dmitrieva Y.V., Alekseeva A.S., Polozov A.S., Gromova L.V.* Evaluation of glucose absorption level in the small intestine of different rat strains under natural conditions. J. Evol. Biochem. Phys. 54: 308-315. 2018.
12. *Grefner N.M., Gromova L.V., Gruzdkov A.A., Komissarchik Ya.Yu.* Interaction of glucose transporters SGLT1 and GLUT2 with cytoskeleton in enterocytes and Caco2 cells during hexose absorption. Cell Tissue Biol. 9(1): 45–52. 2015.
13. *Gregus A., Wintink A.J., Davis A.C., Kalynchuk L.E.* Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. Behav. Brain Res. 156(1): 105–114. 2005.
14. *Rabasa C., Delgado-Morales R., Muñoz-Abellán C., Nadal R., Armario A.* Adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and glucose to repeated immobilization or restraint stress is not influenced by associative signals. Behav. Brain Res. 217(1): 232–239. 2011.
15. *Ravussin Y., Xiao C., Gavrilova O., Reitman M.L.* Effect of intermittent cold exposure on brown fat activation, obesity, and energy homeostasis in mice. PLoS One. 9(1): e85876. 2014.
16. *Zhu P., Zhang Z.H., Huang X.F., Shi X.F., Khandekar N., Yang H.Q., Liang S.Y., Song ZLin S.* Cold exposure promotes obesity and impairs glucose homeostasis in mice subjected to a high-fat diet. Mol. Med. Rep. 18(4): 3923–3931. 2018.
17. *Wang X., Che H., Zhang W., Wang J., Ke T., Cao R., Meng S., Li D., Weiming O., Chen J., Luo W.* Effects of Mild Chronic Intermittent Cold Exposure on Rat Organs. Int. J. Biol. Sci. 11(10): 1171–1180. 2015.
18. *Chagra S.L., Zavala J.K., Hall M.V., Gosselink K.L.* Acute and repeated restraint differentially activate orexigenic pathways in the rat hypothalamus. Regul. Pept. 167(1): 70–78. 2011.
19. *Kusek M., Tokarska A., Siwiec M., Gadek-Michalska A., Szewczyk B., Hess G., Tokarski K.* Nitric oxide synthase inhibitor attenuates the effects of repeated restraint stress on synaptic transmission in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. Front. Cell Neurosci. 11: Article 127. 2017.
20. *Eshkevari L., Permaul E., Mulroney S.E.* Acupuncture blocks cold stress-induced increases in the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in the rat. J. Endocrinol. 217(1): 95–104. 2013.
21. *Blondin D.P., Daoud A., Taylor T., Tingelstad H., Bézaire V., Richard D., Carpentier A.C., Taylor A.W., Harper M.E., Aguer C., Haman F.* Four-week cold acclimation in adult humans shifts uncoupling thermogenesis from skeletal muscles to brown adipose tissue. J. Physiol. 595(6): 2099–2113. 2017.

22. *Gasparetti A.L., de Souza C.T., Pereira-da-Silva M., Oliveira R.L., Saad M.J., Carneiro E.M., Velloso L.A.* Cold exposure induces tissue-specific modulation of the insulin-signalling pathway in *Rattus norvegicus*. J. Physiol. 552(Pt. 1): 149–162. 2003

23. *Hao Q., Yadav R., Basse A.L., Petersen S., Sonne S.B., Rasmussen S., Zhu Q., Lu Z., Wang J., Audouze K., Gupta R., Madsen L., Kristiansen K., Hansenet J.B.* Transcriptome profiling of brown adipose tissue during cold exposure reveals extensive regulation of glucose metabolism. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 308(5): E380–E392. 2015.

Membrane Hydrolysis of Carbohydrates and Glucose Absorption in the Rat Small Intestine under Chronic Immobilization Stress

L. V. Gromova[a], *, E. V. Savochkina[a], A. S. Alekseeva[a], Y. V. Dmitrieva[a], and A. A. Gruzdkov[a]

[a] *Pavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg, Russia*

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

Chronic stress, as an integral attribute of human and animal life, often leads to the development of pathological conditions, the severity of which depends on its nature, degree and duration. The aim of the work was to study the adaptation of a number of physiological parameters of the small intestine to a moderate stress at daily 3-hours immobilization of rats during 3–16 days at room temperature (21 ± 2°C), and to an analogous, but more severe, stress at a lowed (5 ± 1°C) temperature. We studied glucose absorption in the small intestine under conditions as close as possible to physiological ones (without anesthesia and surgery), the content of glucose transporters SGLT1 and GLUT2 in the enterocytes and the activities of membrane intestinal carbohydrases. It was found that after 3 days of moderate stress at room temperature the glucose absorption in the small intestine and the content of GLUT2 in the apical membrane of enterocytes in jejunum increased ($p < 0.05$) compared with the control (no stress), but after 10 and 16 days did not differ from the control. The activities of glucoamylase and maltase after 3, 10 and 16 days of moderate stress remained at the control levels. More severe stress (daily immobilization of rats at a lowed temperature) after 3, 10 and 16 days led to a significant increase of glucose absorption compared with the control ($p < 0.001$). Along with this, the content of SGLT1 and GLUT2 in the enterocytes of the jejunum did not change after 3 and 10 days, but was higher than in the control after 16 days ($p < 0.05$ for SGLT1). Enzyme activities after 3 and 10 days of chronic rat immobilization in the cold increased markedly, but after 16 days they returned to the control values. Since cold exposure enhances thermogenesis, one may conclude that the combination of chronic immobilization of rats with a lowed temperature significantly slows down adaptation of the glucose absorption system in the small intestine, and membrane carbohydrases to the stressor.

Keywords: chronic stress, cold exposure, adaptation, glucose absorption in small intestine, transporters SGLT1 and GLUT2, membrane digestive enzymes

ЦИТИРОВАТЬ:

Громова Л.В., Савочкина Е.В., Алексеева А.С., Дмитриева Ю.В., Груздков А.А. Мембранный гидролиз углеводов и всасывание глюкозы в тонкой кишке крыс при хроническом иммобилизационном стрессе. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(11): 1421–1435.

DOI: 10.31857/S0869813920100040

TO CITE THIS ARTICLE:

Gromova L.V., Savochkina E.V., Alekseeva A.S., Dmitrieva Y.V., Gruzdkov A.A. Membrane Hydrolysis of Carbohydrates and Glucose Absorption in the Rat Small Intestine under Chronic Immobilization Stress. Russian Journal of Physiology. 106(11): 1421–1435.

DOI: 10.31857/S0869813920100040

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 11, с. 1436–1450

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИННЕРВАЦИИ НАДПОЧЕЧНИКА КРЫСЫ

© 2020 г. Е. И. Чумасов[1, 2, *], Е. С. Петрова[1], Д. Э. Коржевский[1]

[1]Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

[2]Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, Санкт-Петербург, Россия

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

Поступила в редакцию 13.06.2020 г.
После доработки 10.07.2020 г.
Принята к публикации 26.07.2020 г.

Целью исследования явилось изучение иннервации коркового и мозгового вещества надпочечника крысы с использованием иммуногистохимических методов. С помощью иммуногистохимического выявления белка PGP 9.5, синаптофизина, тирозингидроксилазы, периферина и серотонина получены оригинальные данные о топографических и нейрохимических особенностях иннервации коркового и мозгового вещества надпочечника половозрелых крыс линии Вистар ($n = 8$). Установлено, что все зоны коры (гломерулярная, пучковая и сетчатая) иннервируются нервными волокнами различной медиаторной природы. В коре наиболее выражена иннервация гломерулярной зоны, где обнаружено густое терминальное сплетение из варикозных аксонов вокруг островков эндокриноцитов, артериол и групп нервных клеток. В мозговом веществе преобладают парасимпатические нервные аппараты: широкопетлистое сплетение из претерминальных нервных волокон и основная узкопетлистая терминальная синаптическая сеть, состоящая из варикозных аксонов, окружающих группы нейроэндокринных клеток и синусоидные капилляры. В мозговом веществе надпочечника обнаружены парасимпатические и симпатические интрамуральные ганглии, а также хромаффинные клетки с иммунореактивностью к различным катехоламинам и серотонину. Выяснена природа нервных волокон, участвующих в иннервации железы. Сделано предположение о разных источниках симпатической иннервации органа: от нейронов *truncus sympathicus* (симпатического ствола) и от собственных нейронов, локализующихся в мозговом веществе, что имеет важное значение для регуляции местного кровообращения. Полученные результаты дополняют имеющиеся в литературе данные и могут быть применены как в научных исследованиях, так и для диагностики заболеваний надпочечников.

Ключевые слова: иннервация надпочечника, белок PGP 9.5, синаптофизин, тирозингидроксилаза, серотонин, периферин, иммуногистохимия

DOI: 10.31857/S0869813920100039

Надпочечник – один из важнейших парных органов эндокринной системы животных и человека, состоящий из двух частей: мозгового и коркового вещества, которые различаются по происхождению, строению и функциям [1–3]. В корковом веществе локализуется так называемая интерреналовая ткань, которая в онтогенезе образуется из мезодермы. Клетки мозгового вещества надпочечника (супрареналовая ткань) происходят из клеток нервного гребня и относятся к симпато-адрена-

ловой системе. Симпато-адреналовая система включает в себя нервное звено, состоящее из структур симпатической нервной системы, и гормональное звено – из клеток мозгового вещества надпочечников и параганглиев, вырабатывающих катехоламины [1, 4–8]. Клетки мозгового вещества входят в состав APUD-системы и обозначаются как нейроэндокринные. В надпочечнике они локализуются в центре органа и образуют неправильной формы тяжи и "глобулы", располагающиеся вокруг кровеносных сосудов. В цитоплазме этих клеток имеются гранулы, которые при обработке хромовой кислотой или солями хрома окрашиваются в коричневый цвет, в связи с этой особенностью их называют хромаффинными клетками (ХК). В 70-е годы с помощью применения гистохимических методов и электронной микроскопии среди клеток мозгового вещества надпочечника были дифференцированы адреналин- и норадреналин-продуцирующие хромаффинные клетки [1, 6, 9–11].

Иннервация надпочечников изучалась ранее с применением классических нейрогистологических и гистохимических методов исследования, а также электронной микроскопии. Было показано, что мозговое вещество надпочечников и параганглии обильно иннервируются ветвями блуждающего ствола, частично нейронами спинномозговых и чревных ганглиев. На хромаффинных клетках обнаружены различного типа синаптические аппараты, образованные преганглионарными – эфферентными и сенсорными – афферентными парасимпатическими нервными волокнами [6, 12–15]. Имеются данные о том, что помимо функции выработки гормонов клетки мозгового вещества надпочечника обладают также сенсорной функцией [16]. В последние годы наиболее информативными методами для изучения иннервации различных органов и тканей считаются иммуногистохимические методы выявления специфических нейральных белков, нейропептидов, нейротрансмиттеров и медиаторов. Применительно к надпочечникам такие исследования немногочисленны [17–22].

Цель настоящего исследования – используя ряд иммуногистохимических маркеров, изучить иннервацию коркового и мозгового вещества, а также определить биохимическую природу нервных аппаратов надпочечника крысы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена на половозрелых крысах линии Вистар массой 200–250 г ($n = 8$). Животных содержали в стандартных условиях вивария ФГБНУ "ИЭМ" при свободном доступе к корму и воде, соблюдая "Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных" (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977г.). Исследование было одобрено ЛЭК ФГБНУ "ИЭМ" (протокол № 3 от 30.11.2017). Фиксацию надпочечников крыс вместе с окружающей их жировой клетчаткой осуществляли в растворе цинк-этанол-формальдегида в течение суток [23]. После обезвоживания в спиртах возрастающей концентрации и ксилоле материал заливали в парафин. Срезы толщиной 5 мкм изготавливали на ротационном микротоме фирмы Pfm Rotary 3003 (PFM, Германия). Часть срезов окрашивали толуидиновым синим по Нисслю и астровым синим по общепринятым методикам. Иммуногистохимическое выявление антигенов осуществляли на парафиновых срезах по протоколам, описанным ранее [23]. В работе применяли следующие первичные антитела: поликлональные кроличьи антитела к ферменту биосинтеза катехоламинов тирозингидроксилазе (ТН) (Abcam, Великобритания), поликлональные кроличьи антитела к серотонину (Leica-Novocastra, Великобритания), поликлональные кроличьи антитела к белку PGP 9.5 (Spring Bioscience, США) [24], поликлональные кроличьи антитела к синаптофизину (СФ) (MONOSAN, Нидерланды) [25], кроличьи поликлональные антитела к периферину (Dako, Дания; сейчас Agilent, США). Для выявления альфа-актина использовали моноклональные

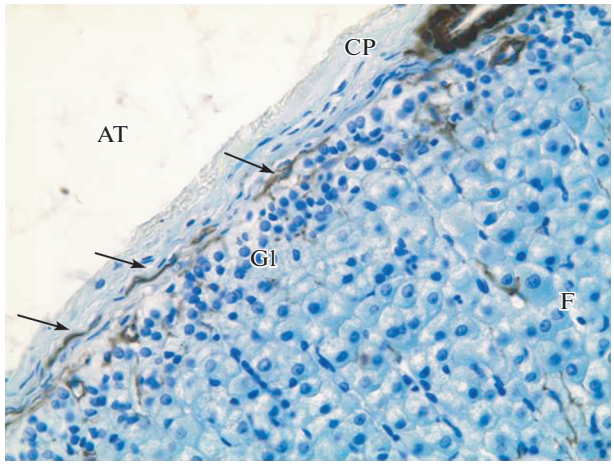


Рис. 1. Капсула и гломерулярная зона коры надпочечника крысы. CP – капсула, Gl – гломерулярная зона, F – пучковая зона, AT – жировая клетчатка, стрелки – гладкомышечные клетки. Иммуногистохимическая реакция на альфа-актин. Докраска толуидиновым синим. ×400. Масштабный отрезок равен 50 мкм.

Fig. 1. Capsule and glomerular zone of the rat adrenal cortex. CP – capsule, Gl – glomerular zone, F – zona fasciculata, AT – adipose tissue, arrows – smooth muscle cells. Immunohistochemical reaction to alpha-actin, toluidine blue counterstaining. ×400. Scale 50 μm.

мышиные антитела (клон 1A4, Dako, Дания; сейчас Agilent, США). Вторичными реагентами служили реактивы из наборов Reveal Polyvalent HRP/DAB Detection System kit (Spring Bioscience, США) и EnVision + System Labbeled Polymer-HRP Anti-Mouse (K4001) (Dako, Дания; сейчас Agilent, США). Для осуществления отрицательного контроля иммуногистохимических реакций на часть срезов вместо раствора первичных антител наносили их разбавитель (Dako, Дания; сейчас Agilent, США). Анализ гистологических препаратов осуществляли с помощью микроскопа Leica DM 750 (Leica, Германия) и цифровой камеры Leica ICC 50 (Leica, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С помощью применения иммуногистохимических методов в разных отделах надпочечника обнаружены различные нервные аппараты.

Снаружи надпочечник покрыт соединительнотканной оболочкой и жировой клетчаткой. Оболочка органа относительно тонкая, состоит из волнообразно расположенных пучков коллагеновых волокон и редких пучков свободных гладкомышечных клеток, избирательно выявляющихся на альфа-актин (рис.1).

В области ворот надпочечника обнаружены нервные стволики (диаметром от 30 до 50 мкм) и сопровождающие их магистральные кровеносные сосуды, объединенные в нервно-сосудистый комплекс, имеющий вид тяжа. С помощью применения иммуногистохимических реакций на белок PGP 9.5 и на периферин внутри нервных стволиков и между сопровождающими сосудами обнаруживаются небольшие группы хромаффинных клеток (параганглии) (рис. 2).

Нервно-сосудистые стволики проходят через жировую клетчатку в корковое вещество, под оболочкой органа делятся и образуют в клубочковой зоне коры густое нервное сплетение. Часть нервных пучков продолжают путь следования через всю кору и вступают в мозговое вещество надпочечника (МВН) (рис. 3).

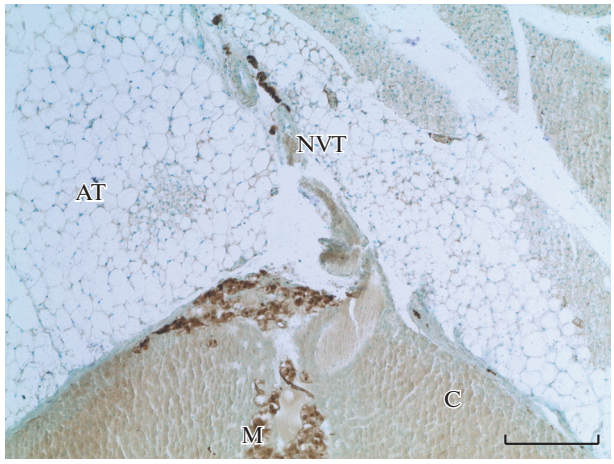


Рис. 2. Вход нервно-сосудистых стволиков в корковое вещество надпочечника. AT – жировая клетчатка, NVT – нервно-сосудистый пучок, C – корковое вещество, M – мозговое вещество надпочечника. Иммуногистохимическая реакции на белок PGP 9.5. × 100. Масштабный отрезок равен 200 мкм.
Fig. 2. The entry of neurovascular trunks into the adrenal cortex. AT – adipose tissue, NVT – neurovascular bundle, C – cortical substance, M – adrenal medulla. Immunohistochemical reaction to PGP 9.5. × 100. Scale 200 μm.

Гломерулярная зона представлена округлыми эпителиальными клетками, располагающимися в виде арок, петель или клубочков, и составляет около 10-15% объема коркового вещества. В ней присутствуют мелкие артериальные и венозные сосуды, артериолы, венулы и капилляры. Как показали иммуногистохимические методы, клубочковая (гломерулярная) зона хорошо иннервирована. В ней выявляется узкопетлистая PGP 9.5^{+} сеть терминальных варикозных аксонов, которые образуют вокруг арок кортикоцитов, артериальных и венозных сосудов густое терминальное нервное сплетение (рис. 4*A*). В сплетении иногда выявляются диффузно расположенные мелкие (от 2–4) группы нервных клеток (рис. 4*B*).

Пучковая зона занимает 75% объема всей коры и состоит из эндокриноцитов кубической формы, располагающихся радиальными колонками, разделенными синусоидными капиллярами. Особенности иннервации этой зоны связаны со спецификой ее структурной организации. Между длинными балками кортикоцитов и параллельно идущими синусоидными капиллярами располагаются тонкие безмиелиновые нервные волокна. Их варикозные аксоны, начинающиеся от поверхностного клубочкового сплетения, следуют в радиальном направлении к МВН. Они не формируют классического сплетения и располагаются в виде перевернутого веера, лучи которого достаточно разреженно располагаются друг от друга.

На некоторых срезах с помощью иммуногистохимических реакций к белку PGP 9.5 (рис. 3*A*) и СФ (3*B*) можно видеть, как радиальные варикозные аксоны на значительном протяжении следуют вдоль сопровождающих синусоидных капилляров пучковой зоны и затем переходят в нервно-сосудистое сплетение сетчатой зоны на границе с МВН.

Сетчатая зона значительно тоньше пучковой (рис. 3) и состоит из многочисленных групп мелких кортикоцитов, прилежащих к синусоидным капиллярам. В этой переходной зоне наблюдается объединение клеточных, сосудистых и нервных элементов кортикальной ткани с клетками, сосудами и нервными сплетениями МВН,

резкое повышение плотности клеточных и нервно-волокнистых структур по сравнению с другими зонами кортекса. Благодаря гистологической окраске и избирательности иммунных реакций на белок PGP 9.5 и СФ, в этой зоне выявляются особенно тесные нервно-тканевые взаимоотношения между клетками коры и хромаффинными клетками. Здесь обращает на себя внимание также общность кровообращения: видно, что синусоидные капилляры из коркого вещества переходят, не прерываясь, в густую сеть синусоидов МВН.

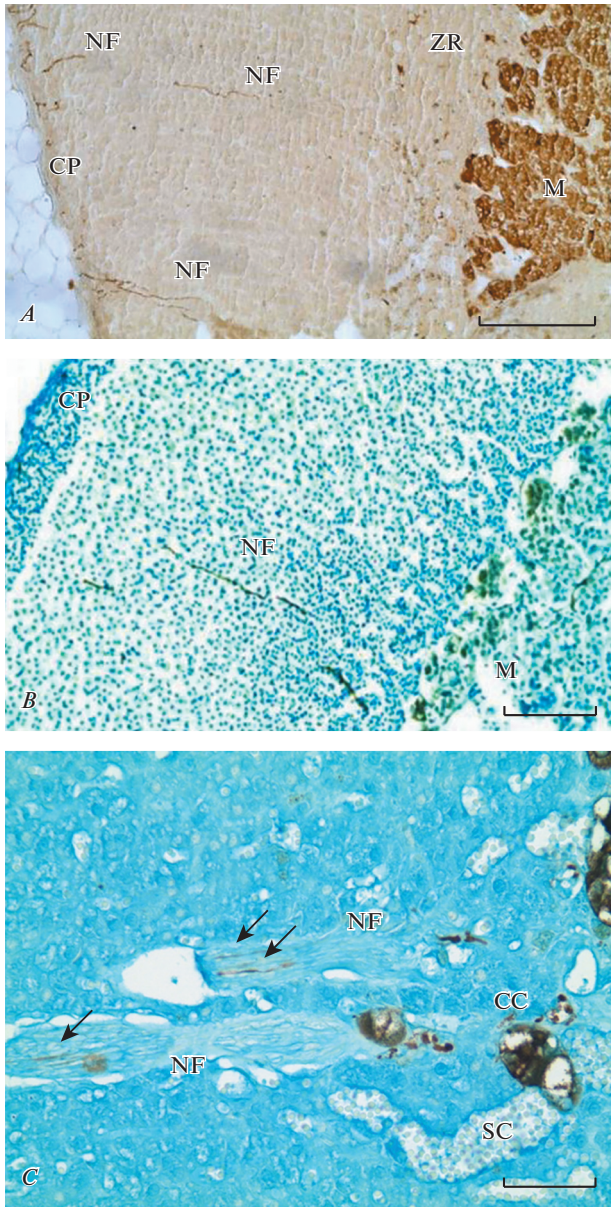
Наряду с морфологическимим данными, с помощью методов иммуногистохимии удалось установить также биохимическую принадлежность нервных аппаратов коры надпочечника крысы. Нервные стволики, пучки нервных волокнон, составляющие сплетения клубочковой, пучковой и сетчатой зон, а также стенок артериальных и венозных сосудов, как оказалось, состоят из смешанных парасимпатических и симпатических нервных волокон. Сравнительный морфологический анализ, проведенный с помощью методов выявления PGP 9.5 и ТН позволил нам дифференцировать среди нервных волокон холинергические и катехоламинергические аксоны и однозначно высказать мнение о преобладании во всех зонах коры надпочечника крысы парасимпатических нервных аппаратов над симпатическими (рис. 3*C*). Последние выявляются, главным образом, вокруг артериальных и венозных сосудов клубочковой зоны, единичные радиальные аксоны встречаются в нервных тяжах пучковой зоны. Немногочисленные нервные клетки микроганглиев, обнаруженные в клубочковой зоне, являются PGP 9.5^+ и имеют парасимпатическую природу.

Мозговое вещество или медулла, как отмечалось ранее, занимает в надпочечнике центральное положение. На светооптических препаратах, окрашенных толуидиновым синим, хорошо различима характерная цитоархитектоника МВН. Паренхима мозгового вещества состоит из относительно крупных эндокриноцитов или хромаффинных клеток овальной, призматической, полигональной или неправильной формы размерами от 9 до 20 мкм. Клетки плотно прилежат друг к другу и образуют различных размеров глобулы, островки и сети из трабекул, окруженных сильно уплощенными клетками – сателлитами. Они находятся в тесных взаимоотношениях с синусоидными капиллярами, которые формируют сеть, связанную с центральной веной. Этот основной кровеносный сосуд МВН имеет довольно широкий просвет (от 100 до 350 мкм), выстлан одним тонким слоем эндотелиоцитов и в него, как известно, по системе синусоидных капилляров собирается обогащенная нейрогормонами венозная кровь.

С помощью применения антител к ТН в мозговом веществе надпочечника обнаружена различной выраженности положительная реакция на катехоламины со сто-

Рис. 3. Нервные волокна в коре надпочечника крысы. *A*, *B* – общий вид; *C* – два ТН-иммунонегативных (парасимпатических) нервных стволика, внутри которых видны единичные тонкие пучки симпатических $ТН^+$ аксонов (стрелки) и группы хромаффинных клеток на границе с мозговым веществом. СР – капсула, С – корковое вещество, МВН – мозговое вещество надпочечника, NF – пучки нервных волокон, zR– сетчатая зона, СС – хромаффинные клетки, SC – синусоидные капилляры. Иммуногистохимическая реакция на белок PGP 9.5 (*A*); СФ (*B*); ТН (*C*). Докраска толуидиновым синим (*B*) и астровым синим (*C*). Масштабный отрезок равен 200 (*A*, *B*) и 50 мкм (*C*).

Fig. 3. Nerve fibers in the rat adrenal cortex. *A*, *B* – general view; *C* – two TH-immunonegative (parasympathetic) nerve trunks, inside of which single thin bundles of sympathetic TH^+ axons (arrows) and a group of chromaffin cells at the border with the brain substance are visible. CP – capsule, C – cortical substance, M – adrenal medulla, NF – bundles of nerve fibers, zR – zona reticularis, CC – chromaffin cells, SC – sinusoidal capillaries. Immunohistochemical reaction to PGP 9.5 (*A*); synaptophysin (*B*); tyrosine hydroxylase (*C*). Toluidine blue counterstaining (*B*) and astra blue counterstaining (*C*). Scale 200 (*A*, *B*) and 50 μm (*C*).



роны популяции хромаффинных клеток (рис. 5*А*). Визуально выделялись клетки с интенсивной реакцией и со слабо выраженной реакцией. Наблюдались и "переходные" варианты. По нашему предположению, наиболее выраженная реакция у норадренергических хромаффинных клеток, менее выраженная – у адренергических хромаффинных клеток, меньшинство составляет смешанный тип с "переходными" формами. Норадренергические хромаффинные клетки (НА-ХК) локализуются в виде многочисленных островков по периферии МВН, на границе с сетчатой зоной коры, и мелких групп в глубине паренхимы. Подобные скопления хромаффинных клеток были отмечены в нервных стволиках в области ворот, в неболь-

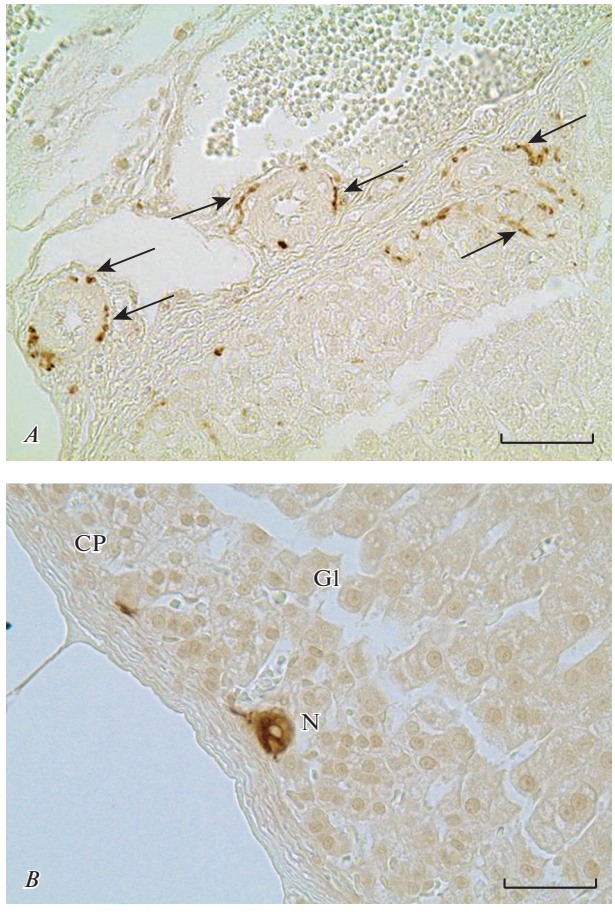


Рис. 4. Нервные аппараты в гломерулярном слое коры надпочечника крысы. *A* – иннервация сосудов гломерулярного слоя коры; *B* – нервные клетки в поверхностной области гломерулярной зоны коры вблизи капсулы. N – нервные клетки, Gl – гломерулярная зона, CP – капсула, стрелки – нервные терминали. Иммуногистохимическая реакция на СФ (*A*) и белок PGP 9.5 (*B*). Масштабный отрезок равен 50 мкм.

Fig. 4. Nerve apparatus in the glomerular layer of the rat adrenal cortex. *A* – innervation of the vessels of the cortex glomerular layer; *B* – neurons in the glomerular zone surface area of the adrenal cortex near the capsule. N – neurons, Gl – glomerular zone, CP – capsule, arrows – nerve terminals. Immunohistochemical reaction to synaptophysin (*A*), to protein PGP 9.5 (*B*). Scale 50 μm.

ших параганглиях на периферии коркового вещества, под капсулой и в жировой клетчатке органа. Основная масса адренергических хромаффинных клеток (А-ХК) компактно располагалась внутри медуллы в виде оформленных и неоформленных различных размеров глобул.

Для выявления в МВН серотонин-синтезирующих клеток мы использовали реакцию на 5-НТ (серотонин). Результаты показали, что селективная иммуногистохимическая реакция наблюдалась в клетках глобул, расположенных, главным образом, на периферии МВН. Эти эндокриноциты имеют типичные для НА-ХК морфологические характеристики. Округлую, треугольную или полигональную

форму, окрашенное в голубой цвет пузырьковидное ядро и мелко гранулярную цитоплазму, окрашивающуюся в желто-зеленый цвет (рис. 5*B*). Обращает на себя внимание, что в расположенных по соседству гломерулах хромаффинные клетки (А-ХК) имеют негативную реакцию на серотонин. По морфологическим признакам, по локализации, наличию положительной реакции на ТН содержащие серотонин клетки соответствуют катехоламинергическим элементам НА-ХК. Обнаружение в них наряду с катехоламинами серотонина остается пока непонятным фактом.

С помощью иммуногистохимических реакций на PGP 9.5 и периферин в паренхиме МВН выявляется густое нервное сплетение из тонких миелинизированных и немиелизированных пучков нервных волокон и их претерминальных и терминальных ветвящихся варикозных аксонов, которые направляются к глобулам, островкам и группам хромаффинных клеток, участвуя в их иннервации. В основном сплетении МВН с помощью иммуногистохимического выявления периферина были обнаружены также диффузно расположенные одиночные нервные клетки и микроганглии из 2–3-х нейроцитов (рис. 6).

Эти нейроны имеют относительно мелкие размеры: от 20 до 35 мкм, треугольную, грушевидную или веретеновидную форму тела, светлое ядро. От перикариона отходят немногочисленные отростки. Эта разновидность иммунореактивных нейронов, по нашему мнению, относится к парасимпатическому отделу автономной нервной системы, так как после реакции на ТН (на катехоламины) не выявляются, т.е. остаются негативными к данному маркеру.

С помощью иммуногистохимической реакции на ТН в двух случаях в МВН были выявлены катехоламинергические или симпатические нейроны. Одно из таких скоплений из 10–20 рыхло расположенных нервных клеток встретилось на периферии МВН, ближе к границе медуллы и сетчатой зоны коры (рис. 7*A*).

Морфологически эти ТН+ клетки отличаются от более мелких парасимпатических нейроцитов. Они имеют мультиполярную форму, размеры от 30 до 45 мкм, перикарионы окружены сателлитами и соединительной тканью, отростки их в пределах ганглия очень слабо выявляются. Между симпатическими нейронами и вокруг них на границе с кортикоцитами сетчатой зоны коры находятся элементы соединительной ткани, а также обменные и синусоидные капилляры. Вблизи ганглия на том же самом материале выявились фрагменты нервного сплетения из ТН+ варикозных симпатических аксонов, источником которых, по нашему мнению, являются представленные симпатические нейроны МВН. Терминальные веточки $ТН^{+}$ аксонов этого сплетения распространяются частично в сетчатую и пучковую зоны коры и находятся в тесной связи с кортикоцитами. Эти результаты свидетельствуют о том, что часть кортикоцитов и сосудов коры надпочечника крысы, наряду с парасимпатической, получают и симпатическую иннервацию от нейронов местного симпатического ганглия.

Проведенное иммуногистохимическое исследование с использованием антител к СФ-специфическому маркеру для выявления синаптических аппаратов МВН, показало избирательную выявляемость нервных окончаний на перикарионах хромаффинных клеток. С помощью данного маркера удалось выявить большое количество синаптофизин-положительных терминалей, имеющих вид отдельных крупных бутонов, пуговчатых структур, последовательно расположенных гранул и фрагментов, принадлежащих терминальным аксонам (рис. 7*B*).

По нашим наблюдениям, синаптические структуры находятся преимущественно, на телах и отростках определенного морфологического типа клеток, а именно, на хромаффинных клетках норадренергической принадлежности (НА-ХК) и отсутствуют на хромаффинных клетках адренергической природы (А-ХК).

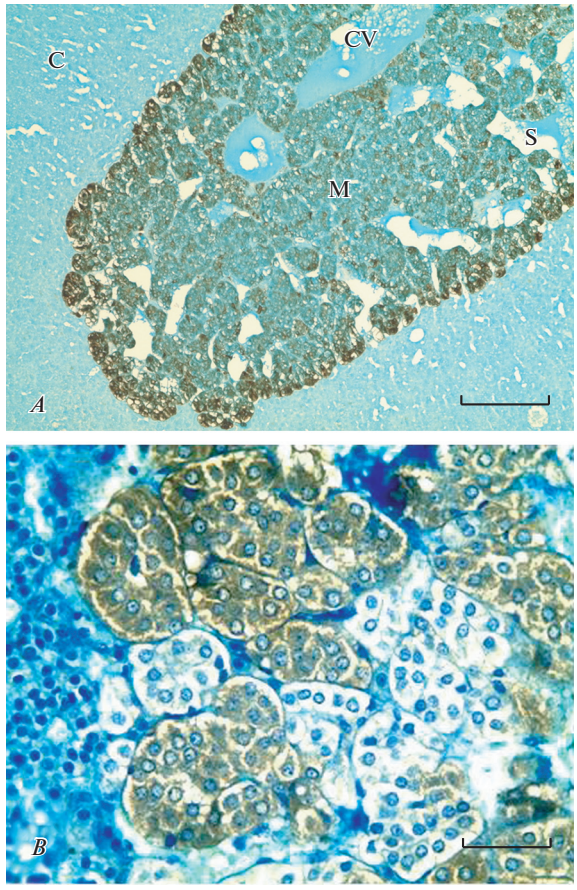


Рис. 5. Общий вид (*A*) и хромаффинные клетки мозгового вещества надпочечника (*B*). C – кора, M – мозговое вещество надпочечника, CV – центральная вена, S – синусоид. Иммуногистохимическая реакции на TH (*A*) и серотонин (*B*). Докраска астровым синим (*A*) и толуидиновым синим (*B*). Масштабный отрезок равен 200 (*A*) и 50 мкм (*B*).

Fig. 5. General view (*A*) and chromaffin cells of the adrenal medulla (*B*). C – the cortex, M – the adrenal medulla, CV – the central vein, S – the sinusoid. Immunohistochemical reaction to TH (*A*), to serotonin (*B*). Astra blue counterstaining (*A*) and toluidine blue counterstaining (*B*). Scale 200 (*A*) and 50 μm (*B*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как уже отмечалось, надпочечники имеют различные источники иннервации как со стороны центральной, так и периферической нервной системы. В первую очередь они иннервируются ветвями ваго-симпатического нервного ствола, по которым в эмбриогенезе происходит миграция симпатоадреналовых предшественников, врастающих в фетальную кору, позже к ним присоединяются экстрамуральные нервные стволики и узлы вегетативного сплетения, включая чревные ганглии [6]. Кроме того, в иннервации МВН принимают участие ганглии спинномозговых нервов. Несмотря на различные источники иннервации, большинство авторов считает, что функции МВН и системы хромаффинных параганглиев, а по нашим

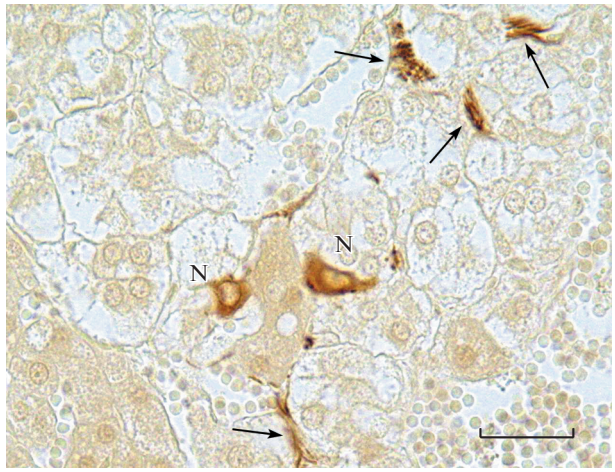


Рис. 6. Фрагменты нервных сплетений в мозговом веществе надпочечника крысы (стрелки) и нейроны (N) в нервном сплетении мозгового вещества. Иммуногистохимическая реакция на периферин. Масштабный отрезок равен 50 мкм.

Fig. 6. Fragments of the nerve plexuses in the medulla of the rat adrenal gland (arrows) and nerve cells (N) found in the nerve plexus of the medulla. Immunohistochemical reaction to peripherin. Scale 50 μm.

данным и эндокриноцитов коры НП млекопитающих, регулируются, в основном, парасимпатическими нервными волокнами [6, 15, 16].

В настоящей работе были подтверждены данные литературы о преимущественной парасимпатической иннервации тканей НП. С помощью сравнительного анализа с использованием иммуногистохимических реакций на PGP 9.5 и ТН установлено, что нервные сплетения трех зон коры, медуллярной ткани, а также периваскулярные сплетения вокруг артериальных сосудов представлены, главным образом, парасиматическими и в меньшей степени симпатическими нервными волокнами. Разница объясняется тем, что парасимпатические нервные волокна берут начало от топографически разных источников, в то время как основная масса постганглионарных симпатических волокон поступает в надпочечник извне, исключительно от экстрамуральных симпатических ганглиев.

В специальной литературе, посвященной иннервации надпочечника, продолжает обсуждаться вопрос о том, имеются ли в МВН симпатические нейроны. Долгое время существовало представление, что в надпочечнике животных и человека встречаются только интрамуральные парасимпатические микроганглии. В 1991 г. Oomori с соавт. [21] удалось продемонстрировать симпатические нервные клетки с помощью иммуногистохимического маркера на ТН и на электронномикроскопическом уровне. В настоящем исследовании мы подтвердили эти данные. В двух случаях с помощью иммуногистохимической реакции на ТН была выявлена небольшая группа из симпатических нейронов (от 10 до 20) в МВН, на границе коры и медуллы. Возможно, эти симпатические клетки еще в эмбриональном периоде, в качестве симпатобластов, вместе с хромаффинобластами мигрируют по вагосимпатическому пути краниального отдела из нервного гребня в формирующееся МВН и остаются в нем на все время постнатальной жизни животного. Нами установлено, что отростки этих симпатических нейронов образуют локальное нервное сплетение, которое, по нашему предположению, имеет важное значение для мест-

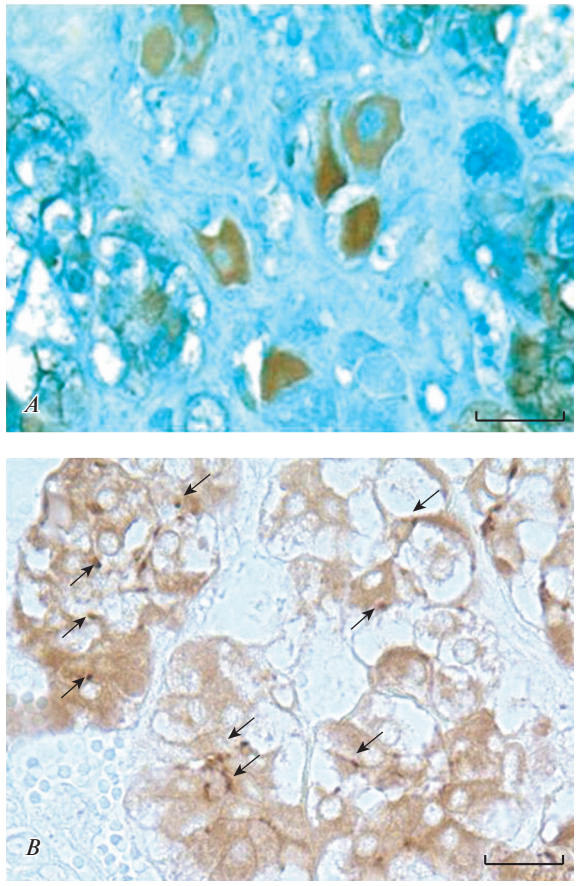


Рис. 7. Симпатические нейроны (*A*) и синаптофизин-положительные терминали (стрелки) (*B*) в мозговом веществе надпочечника крысы. Иммуногистохимическая реакция на ТН (а) и СФ (*B*). Докраска астровым синим (*A*). Масштабный отрезок равен 50 мкм.

Fig. 7. Sympathetic neurons (*A*) and synaptic terminals (arrows) (*B*) in the medulla of the rat adrenal gland. Immunohistochemical reaction to tyrosine hydroxylase (*A*), to synaptophysin (*B*). Astra blue counterstaining (*A*). Scale 50 μm.

ной иннервации кровеносных сосудов, частично сетчатой зоны коры и медуллярной ткани МВН.

В литературе встречаются отдельные работы, посвященные наличию в МВН и параганглиях, кроме катехоловых, также индольных аминов, в частности, серотонина [26]. Авторами установлено, что в МВН крысы в процессе пренатального развития, начиная с 16–17.5 сут, все адреналин-содержащие хромаффинные клетки (А-ХК) постоянно обнаруживают 5-НТ иммунореактивность, в то время, как НА-содержащие – были иммунонегативны к ней. Предполагается, что 5-НТ иммунореактивность проявляется вместе с началом синтеза катехоламинов и обнаруживается раньше иммунореактивности к дофамину и ферменту ТН. Считается, что экспрессия иммунореактивности к серотонину регулируется независимо и не связана с синтезом катехоламинов. Это обстоятельство побудило нас проверить эти данные. При использовании иммуногистохимической реакции на серотонин в мозговом ве-

ществе надпочечника крысы нами были выявлены две разновидности эндокриноцитов. В одних глобулах, соответствующих (НА-ХК), находились клетки с четко выраженной иммунореактивностью к серотонину, в то время как в других она отсутствовала. Полученные результаты указывают на возможность наличия в МВН крысы бифенотипической популяции хромаффинных клеток, вырабатывающих кроме катехоламинов и серотонин. Можно предполагать, что серотонин, экспрессируемый в цитоплазме хромаффинных клеток, по своей природе сходен с таковым нейронов ядер шва (Raphe nuclei) головного мозга. Вопрос о функциональном значении таких хромаффинных клеток требует дальнейшего изучения.

Кратко следует остановиться на иннервации самих хромаффинных клеток. Несмотря на то, что с помощью электронной микроскопии имеющиеся на хромаффинных клетках синапсы описаны в научной литературе [6, 13, 15, 27], многие вопросы синаптогенеза остаются неизученными. Например, вопрос о том, на каких хромаффинных клетках (адренергических или норадреналинергических) локализуются синапсы. Существуют противоречивые данные о типе синапсов, количестве и природе их нейротрансмиттеров [6]. Нами было установлено, что в паренхиме МВН находится густое парасимпатическое нервное сплетение из тончайших нервных пучков, тяжей и отдельных ветвящихся терминальных варикозных аксонов, которые направляются к глобулам, островкам и группам хромаффинных клеток и в различной степени участвуют в их иннервации. При этом выяснилось, что наибольшее количество синаптических терминалей наблюдается на норадренергических клетках (НА-ХК), расположенных по периферии МВН, и значительно реже на популяции адренергических (А-ХК), локализующихся в широкой области вокруг центральной вены.

Дискуссионным остается вопрос об афферентных чувствительных нервных окончаниях в надпочечнике. Ранее были представлены доказательства их присутствия в МВН на светооптическом [28] и электронномикроскопическом уровнях [6, 15]. Недавно появилась работа, в которой изучались рецепторные окончания в мозговом веществе надпочечника крысы [16]. В этой работе был применен новый иммуногистохимический метод определения афферентных или рецепторных чувствительных нервных окончаний с помощью периферической холинацетилтрансферазы (pChAT). Авторы продемонстрировали в паренхиме МВН большую плотность арборизаций нервных волокон и наличие кустиковидных и диффузных чувствительных рецепторных окончаний и, таким образом, подтвердили данные исследования российского нейрогистолога А.С. Догеля [29], выполненного еще в девятнадцатом столетии с помощью суправитальной окраски тканей МВН метиленовым синим. Эти данные свидетельствуют о том, что МВН помимо основной гормональной функции выполняет и хеморецепторную функцию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью используемых нейральных иммуногистохимических маркеров получены оригинальные данные о морфологических особенностях иннервации тканей коры и мозгового вещества надпочечника половозрелой крысы. Часть имеющихся в литературе фактов нами подтверждена. Установлено, что все зоны коры (гломерулярная, пучковая и сетчатая) иннервируются парасимпатическими и симпатическими нервными волокнами, которые образуют различной плотности терминальные сплетения из варикозных аксонов. Последние представлены “дистантными синапсами”, находящимися в тесной связи с телами кортикоцитов, эндотелием капилляров и гладкомышечными клетками артерий и артериол. Наиболее выражена иннервация гломерулярной зоны и менее – пучковой и сетчатой зон.

В сплетении гломерулярной зоны иногда встречаются группы парасимпатических нейроцитов.

Наиболее интенсивная иннервация обнаружена в МВН. В медуллярном веществе находится густая сеть из варикозных аксонов, которые локализуются вокруг мелких групп и гломерул нейроэндокриноцитов, прилежащих к ним синусоидных капилляров. Иммуногистохимически подтверждено наличие в паренхимие МВН крысы двух основных типов хромаффинных клеток (А-ХК и НА-ХК), двух типов нервных волокон (постганглионарных парасимпатических и симпатических) и, соответственно, двух типов нейронов в микроганглиях. Выяснилось, что парасимпатические нервные аппараты в коре и МВН у крысы преобладают над симпатическими. Предполагаются два источника происхождения постганглионарных симпатических волокон НП: внешний – от экстрамуральных нейронов симпатической цепочки и внутренний – от собственных симпатических нейронов микроганглия в МВН, что имеет важное значение для регуляции сосудистого кровообращения надпочечника. На телах и отростках хромаффинных клеток выявлены перицеллюлярные синаптические аппараты холинергических нервных волокон. По мнению авторов, представленный в работе подбор специальных маркеров (PGP 9.5, СФ, ТН и 5-НТ) имеет определяющее значение для селективного выявления нейротрансмиттеров, нейромедиаторов и нейрогормонов МВН не только в норме и при патологии, но и для экспресс-диагностики в клинике и судебной медицине.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Институт экспериментальной медицины”. Конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Смиттен Н.А.* Симпато-адреналовая система в фило- и онтогенезе позвоночных. М.Наука. 1972. [*Smitten N.A.* Simpato-adrenalovaya sistema v filo- i ontogeneze pozvonochny`x. [Sympatho-adrenal system in vertebrate phylogenesis and ontogenesis] M. Nauka. 1972. (In Russ)].
2. *Кацнельсон З.С., Стабровский Е.М.* Гистология и биохимия хромаффинной ткани надпочечников. М. Медицина. 1975. [*Katsnelson Z.S., Stabrovsky E.M.* Gistologiya i bioximiya xromaffinnoj tkani nadpochechnikov. [Histology and biochemistry of chromaffin adrenal gland tissue] Moscow. Medicina. 1975. (In Russ)].
3. *Поленов А. Л., Кулаковский Э. Е.* Происхождение и эволюция нейроэндокринных клеток и нейрогормональной регуляции у Metazoa. В кн.: Нейроэндокринология. СПб. Наука. 13–30. 1993. [*Polenov A.L., Kulakovsky E.E.* Proisxozhdenie i e`volyuciya nejroe`ndokrinny`x kletok i nejrogormonal`noj regulyacii u Metazoa. Nejroe`ndokrinologiya. [Origin and evolution of neuroendocrine cells and neurohormonal regulation in Metazoa. In: Neuroendocrinology. St. Petersburg. Nauka. 13–30. 1993. (In Russ)].
4. *Пальцев М.А., Кветной И.М.* Руководство по нейроиммуноэндокринологии. Москва. Шико. 2014. [*Pal'tcev M.A., Kvetnoi I.M.* Rukovodstvo po nejroimmunoe`ndokrinologii. [Manual on Neuroimmunoendocrinology]. Moscow. Shiko. 2014. (In Russ)].
5. *Карлсон Б.* Основы эмбриологии по Пэттену. М. Мир. 1983. [*Carlson B.* Osnovy` e`mbriologii po Pe`ttenu. [Patten,s foundations of embryology] Moscow. Mir. 1983. (In Russ)].
6. *Coupland R.E.* The natural history of the chromaffin cell-twenty-five years on the beginning. Arch. Histol. Cytol. 52: 331–341. 1989. https://doi.org/10.1679/aohc.52.suppl_331
7. *Folligan K., Bouvier R., Targe F., Morel Y., Trouillas J.* Development of the human adrenal glands. Ann. Endocrinol. (Paris). 66(4): 325–332. 2005. https://doi.org/10.1016/s0003-4266(05)81789-5
8. *Соколов В.И., Чумасов Е.И., Атагимов М.З.* Гистогенез интерреналовой закладки надпочечника свиньи (*Sus domestica*). Морфология. 129(3): 59–62. 2006. [*Sokolov V.I., Chumasov E.I., Atagimov M.Z.* Histogenesis of the interrenal primordium of the pig adrenal gland (*Sus domestica*). Morfologija. 129 (3): 59–62. 2006. (In Russ)].

9. *Чумасов Е.И., Рейдлер Р.М.* Морфология хромаффинных клеток околосердечных паранглиев кошки (люминесцентномикроскопическое исследование). Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. 64(2): 68–74. 1973. [*Chumasov E.I., Reidler R.M.* Morphology of chromaffin cells of the pericardial paraganglia of a cat (luminescent microscopic examination).Archive of Anat., Histol. and Embryology. 64(2): 68–74. 1973. (In Russ)].
10. *Говырин В.А., Леонтьева Г.Р.* Медиаторные механизмы регуляции кровеносных сосудов. В кн.: Физиология кровообращения. Регуляция кровообращения. Л. Наука. 154–185. 1985. [*Govyrin V.A., Leontieva G.R.* Mediatorny`e mexanizmy` regulyacii krovenosny`x sosudov. Fiziologiya krovoobrashheniya. Regulyaciya krovoobrashheniya. [Mediatory mechanisms of regulation of blood vessels. In: Physiology of blood circulation. Blood circulation regulation] Leningrad. Nauka. 154–185.1985. (In Russ)].
11. *Чумасов Е.И., Атагимов М.З., Соколов В.И., Селиверстова В.Г.* Развитие хромаффинной ткани надпочечника. Морфология. 123(3): 68–73. 2003. [*Chumasov E.I., Atagimov M.Z., Sokolov V.I., Seliverstova V.G.* The development of chromaffin adrenal gland tissue. Morphologija. 123(3): 68–73. 2003. (In Russ)].
12. *Pelto-Hujkko M., Salminen T.* Localization of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in chromaffin cells and nerve terminals in adrenal medulla. In: Histochemical and cell biology of autonomic neurons and paraganglia. Berlin. Plenup Press. 73–77. 1987.
13. *Mohamed A.A., Parker T.L., Coupland R.E.* The innervation of the adrenal gland. II. The source of spinal afferent nerve fibres to the guinea-pig adrenal gland. J. Anat. 160: 51–58. 1988.
14. *Charlton B.G., Nkomazana O.F., McGadey J., Neal D.E.* A preliminary study of acetylcholinesterase-positive innervation in the human adrenal cortex. J. Anat. 76: 99–104. 1991.
15. *Ноздрачев А.Д., Чумасов Е.И.* Периферическая нервная система. СПб. Наука. 1999. [*Nozdrachev A.D., Chumasov E.I.* Perifericheskaya nervnaya sistema [Peripheral nervous system]. St. Petersburg. Nauka. 1999. (In Russ)].
16. *Elnasharty M.A., Sayed-Ahmed A.* Expression and localization of pChAT as a novel method to study cholinergic innervation of rat adrenal gland. Acta Histochem. 116(8): 1382–1389. 2014.
17. *Heym C., Colombo-Benckmann M., Mayer B.* Immunohistochemical demonstration of the synthesis enzyme for nitric oxide and of comediators in neurons and chromaffin cells of the human adrenal medulla. Ann. Anat. 176 (1): 11–16. 1994.
https://doi.org/10.1016/s0940-9602(11)80406-1
18. *Järvi R., Helén P., Pelto-Huikko M., Hervonen A.* Neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in rat sympathetic neurons and small granule-containing cells. Neurosci. Lett. 67(2): 223–227. 1986.
19. *Kent C., Coupland R.E.* Localisation of chromogranin A and B, met-enkephalin-arg6-gly7-leu8 and PGP9.5-like immunoreactivity in the developing and adult rat adrenal medulla and extra-adrenal chromaffin tissue. J. Anat. 166: 213–225. 1989.
20. *Murabayashi H., Kuramoto H., Kawano H., Sasaki M., Kitamura N., Miyakawa K., Tanaka K., Oomori Y.* Immunohistochemical features of substance P-immunoreactive chromaffin cells and nerve fibers in the rat adrenal gland. Arch. Histol. Cytol. 70(3): 183–196. 2007.
https://doi.org/10.1679/aohc.70.183
21. *Oomori Y., Okuno S., Fujisawa H., Ono K.* Immunoelectron microscopic study of tyrosine hydroxylase immunoreactive nerve fibers and ganglion cells in the rat adrenal gland. Anat. Rec. 229 (3): 407–414. 1991.
https://doi.org/10.1002/ar.1092290313
22. *Timokhina E.P., Nazimova S.V., Tsomartova D.A., Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Yaglov V.V.* Morphological and cytophysiological changes in the adult rat adrenal medulla after prenatal and postnatal exposure to endocrine-disrupting DDT. Sovremennye tehnologii v medicine. 12(2): 50–55. 2020.
https://doi.org/10.17691/stm2020.12.2.06
23. *Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Петрова Е.С.* Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии (руководство). СПб. СпецЛит. 2014. [*Korzhevskii D.E., Kirik O.V., Petrova E.S.* [et al.]. Teoreticheskie osnovy` i prakticheskoe primenenie metodov immunogistoximii (rukovodstvo) [Theoretical foundations and practical application of immunohistochemistry methods]. St. Petersburg. SpetsLit. 2014. (In Russ)].
24. *Коржевский Д.Э., Колос Е.А.* Белок PGP 9.5 и его использование в качестве функционального маркера в нейроморфологии. Мед. акад. журн. 13(4): 29–35. 2013. [*Korzhevskii D.E., Kolos E.A.* Protein PGP 9.5 and its use as a functional marker in neuromorphology. Med. Acad. J. 13 (4): 29–35. 2013. (In Russ)].
25. *Колос Е.А., Григорьев И.П., Коржевский Д.Э.* Маркер синаптических контактов – синаптофизин. Морфология. 147(1): 78–82. 2015. [*Kolos E.A., Grigoriev I.P., Korzhevskii D.E.* Synaptic contacts marker – synaptophysin. Morphologiia. 147(1): 78–82. 2015. (In Russ)].
26. *Soinila S., Ahonen M., Lahtinen T., Häppölä O.* Developmental changes in 5-hydroxytryptamine immunoreactivity of sympathetic cells. Int. J. Dev. Neurosci. 7(5): 553–563. 1989.
https://doi.org/10.1016/0736-5748(89)90014-2

27. *Scheuermann D.W.* Comparative morphology, cytochemistry and innervation of chromaffin tissue in vertebrates. J. Anat. 183(2): 327–342. 1993.

28. *Ильина В.И.* Чувствительная иннервация мозгового вещества надпочечника. В кн.: Морфология чувствительной иннервации внутренних органов. М. Изд-во АМН СССР. 135–148. 1948. [*Ilyina V.I.* Chuvstvitel`naya innervaciya mozgovogo veshhestva nadpochechnika. Morfologiya chuvstvitel`noj innervacii vnutrennix organov [Sensitive innervation of the adrenal medulla. In: Morphology of the sensitive innervation of internal organs] Moscow. Publ. House of the USSR Acad. of Sci. 135–148. 1948. (In Russ)].

29. *Dogiel A.S.* Ueber den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Säugethiere. Arch. Anat. Physiol., Anat. Abth.: 130-158. 1899.

Immunohistochemical Study of Rat Adrenal Gland Innervation

E. I. Chumasov[a, b, *], E. S. Petrova[a], and D. E. Korzhevskii[a]

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

[b] *St.Petersburg State University of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russia*

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

The aim of the study was to study the innervation of the cortical part and medulla of the rat adrenal gland using neuroimmunohistochemical markers. Original data on the innervation of the rat Wistar ($n = 8$) adrenal cortex and medulla were obtained using immunohistochemical detection of the PGP 9.5 protein, synaptophysin, tyrosine hydroxylase, peripherin and serotonin. It was established that all zones of the cortex (glomerular, bundle, and reticular) are innervated by nerve fibers of various neurotransmitter identity. In the cortex, the innervation of the glomerular zone is most pronounced. A thick terminal plexus of varicose axons around islets of endocrinocytes, arterioles and nerve cells was detected in this zone. Cholinergic nerve structures (plexus of preterminal nerve fibers and the terminal synaptic network, which consists of varicose parasympathetic axons located around groups of neuroendocrine cells and sinusoidal capillaries) prevail in the medulla. Parasympathetic and sympathetic intramural ganglia were found in the medulla. Chromaffin cells immunoreactive to various catecholamines and serotonin were found in the adrenal medulla. It was assumed that different sources of sympathetic innervation of the organ are present. These are the medulla's own neurons and sympathetic trunk neurons. Such innervation is important for the regulation of local blood circulation.The results obtained in this study can be used both in scientific research and in the diagnosis of adrenal diseases.

Keywords: rat adrenal gland, innervation, PGP 9.5 protein, synaptophysin, serotonin, tyrosine hydroxylase, immunohistochemistry

ЦИТИРОВАТЬ:

Чумасов Е.И., Петрова Е.С., Коржевский Д.Э. Иммуногистохимическое исследование иннервации надпочечника крысы. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(11): 1436–1450.

DOI: 10.31857/S0869813920100039

TO CITE THIS ARTICLE:

Chumasov E.I., Petrova E.S., Korzhevskii D.E. Immunohistochemical Study of Rat Adrenal Gland Innervation. Russian Journal of Physiology. 106(11): 1436–1450.

DOI: 10.31857/S0869813920100039

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 11, с. 1451–1452

ПОПРАВКА

ПОПРАВКА

DOI: 10.31857/S0869813920110084

Исправления к статье:

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

DOI: 10.31857/S0869813920090034

Рисунки 3 и 4 отобразились некорректно. Автор предоставил исправленную версию.

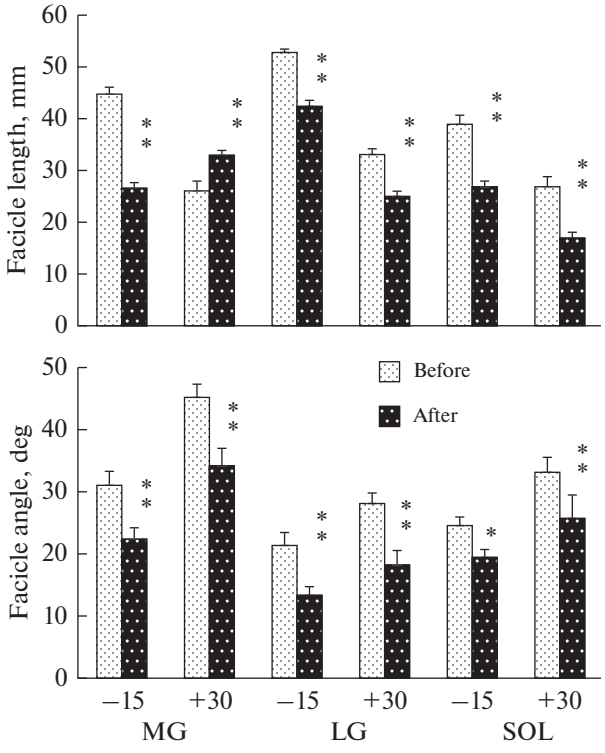


Рис. 3. Изменение длины (L_B) и угла (Θ_B) наклона волокон МИМ (MG), ЛИМ (LG) и КМ (SOL), как функция угла в голеностопном суставе под влиянием продолжительного космического полета. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Fig. 3. Changes in the fiber length (**L**f) and pennation angle (Θf) as functions of the ankle joint angle in the MG, LG, and SOL as a result of a long-term SF. MG – medialis gastrocnemius; LG – lateralis gastrocnemius; SOL – soleus * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

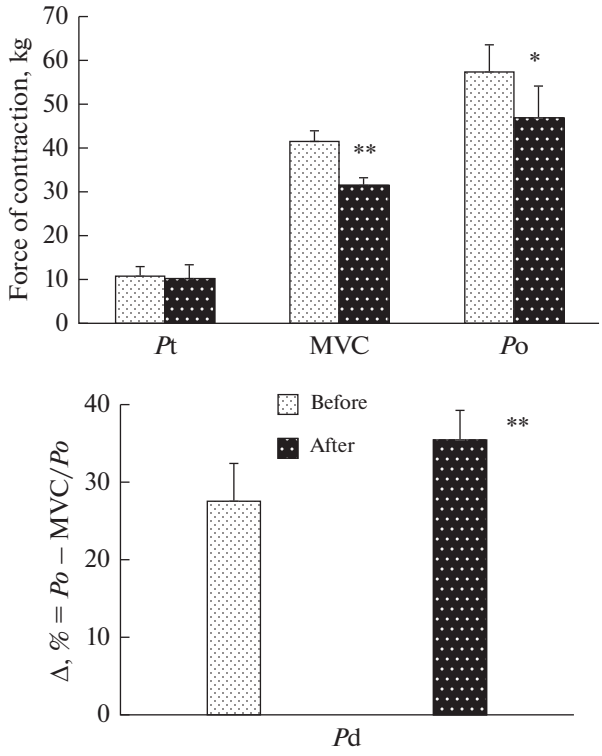


Рис. 4. Изменение силы одиночного сокращения (P_{oc}; P_t), максимальной произвольной силы (МПС; MVC), максимальной электрически вызванной тетанической силы сокращения (P_o; частота 150 имп/с) (**верхняя панель**) и силового дефицита (Pd) ТМГ (**нижняя панель**) под влиянием продолжительного космического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

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