

СОДЕРЖАНИЕ

Обзорные и проблемные статьи

Перспективы применения синтетических наночастиц в оптогенетическом протезировании сетчатки

А. Ю. Ротов, И. С. Романов, Я. В. Тараканчикова, Л. А. Астахова 1323

Экспериментальные статьи

Биоэлектрический импеданс миокарда и печени у крыс при хроническом воздействии доксорубицина

*Н. Л. Коломеец, О. В. Суслонина, С. Л. Смирнова,
Е. А. Пешкин, И. М. Рощевская* 1344

Пептид АКТГ₄₋₇-PGR корригирует поведение и уровень кортикостерона у крыс в условиях хронического стресса

*А. О. Ворвуль, И. И. Бобынцев, М. В. Свищева, О. А. Медведева,
А. Ю. Мухина, Л. А. Андреева* 1359

Роль сероводорода в релаксации капсулы лимфатических узлов при ЛПС-индуцированном воспалении

Г. И. Лобов 1372

Роль NO-синтазных путей в реализации влияния провоспалительных цитокинов на паттерн дыхания и вентиляционный ответ на гипоксию

А. А. Клиникова, Г. А. Данилова, Н. П. Александрова 1385

Перцептивный анализ взрослыми речи детей с расстройствами аутистического спектра, синдромом дауна, умственной отсталостью

Е. Е. Ляко, О. В. Фролова, А. С. Николаев, А. С. Григорьев 1395

Влияние метформиновой терапии на стимуляцию агонистами рецептора лютеинизирующего гормона продукции тестостерона и сперматогенеза у диабетических крыс

*А. А. Бахтюков, К. В. Деркач, А. М. Степочкина, В. Н. Сорокоумов,
Л. В. Баюнова, И. А. Лебедев, А. О. Шпаков* 1408

Анализ некоторых физиологических и биохимических показателей у больных пневмонией COVID-19 математическими методами

*М. С. Громов, С. М. Рогачева, М. А. Барулина, А. А. Решетников,
Д. А. Прохожев, А. Ю. Фомина* 1422

Возрастные изменения вклада NO и калиевых каналов в дилатацию пиллярных артериальных сосудов у крыс

В. Н. Шуваева, О. П. Горикова 1440

CONTENTS

Reviews

- Prospects of Synthetic Nanoparticles Application in Optogenetic Retinal Prosthetics
A. Yu. Rotov, I. S. Romanov, Y. V. Tarakanchikova, and L. A. Astakhova 1323
-

Experimental Articles

- Bioelectrical Impedance of the Myocardium and Liver in Rats under Chronic Exposure to Doxorubicin
N. L. Kolomeyets, O. V. Syslova, S. L. Smirnova, E. A. Peshkin, and I. M. Roshchevskaya 1344
- Peptide ACTH₄₋₇-PGP Ameliorates Behaviour and Stabilize Corticosterone Level in Rats Affected with Chronic Stress
A. O. Vorvul, I. I. Bobyntsev, M. V. Svishcheva, O. A. Medvedeva, A. Yu. Mukhina, and L. A. Andreeva 1359
- Role of Endogenous Hydrogen Sulfide in Relaxation of the Lymph Node Capsule in LPS-Induced Inflammation
G. I. Lobov 1372
- The Role of NO-Synthase Pathways in the Effects of Proinflammatory Cytokines on the Respiratory System during Normoxia and Hypoxia
A. A. Klinnikova, G. A. Danilova, and N. P. Aleksandrova 1385
- Perceptual Evaluation of Speech Production in Children with Autism Spectrum Disorders, Down Syndrome, and Intellectual Disabilities by Adults
E. E. Lyakso, O. V. Frolova, A. S. Nikolaev, and A. S. Grigorev 1395
- The Effect of Metformin Therapy on Luteinizing Hormone Receptor Agonists-Induced Stimulation of Testosterone Production and Spermatogenesis in Diabetic Rats
A. A. Bakhtyukov, K. V. Derkach, A. M. Stepochkina, V. N. Sorokoumov, L. V. Bayunova, I. A. Lebedev, and A. O. Shpakov 1408
- Analysis of Some Physiological and Biochemical Characteristics of Patients with Pneumonia COVID-19 Using Mathematical Methods
M. S. Gromov, S. M. Rogacheva, M. A. Barulina, A. A. Reshetnikov, D. A. Prokhozhev, and A. Yu. Fomina 1422
- Age Changes in the Contribution of NO and Potassium Channels to the Dilation of the Pial Arterial Vessels in Rats
V. N. Shuvaeva and O. P. Gorshkova 1440
-
-

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ НАНОЧАСТИЦ
В ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОМ ПРОТЕЗИРОВАНИИ СЕТЧАТКИ

© 2021 г. А. Ю. Ротов¹, *, И. С. Романов¹, Я. В. Тараканчикова^{2, 3}, Л. А. Астахова¹

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

²Университет Оулу, Оулу, Финляндия

³Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет
им. Ж.И. Алфёрова РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: rotovau@gmail.com

Поступила в редакцию 25.08.2021 г.

После доработки 09.09.2021 г.

Принята к публикации 09.09.2021 г.

Оптогенетическое протезирование представляет собой подход, направленный на возвращение зрительной функции при дегенеративных заболеваниях сетчатки. Оно заключается в доставке генов, кодирующих светочувствительные белки, в клетки сетчатки, пережившие дегенерацию, в первую очередь биполярные и ганглиозные. В результате они превращаются в “псевдофоторецепторы” и могут взять на себя функцию утерянных палочек и колбочек. Ключевым элементом в процессе оптогенетического протезирования является вектор, доставляющий экзогенную ДНК в ядро клетки. Существует две основные категории векторов: вирусные и синтетические. Последние включают в себя наночастицы на основе различных полимеров, липидов и инертных металлов. Ранее считалось, что вирусы трансфицируют живые клетки более эффективно, чем синтетические частицы за счет специализированных механизмов доставки переносимого генетического материала. Однако к настоящему времени разработаны наночастицы, способные эффективно проникать через тканевые барьеры, захватываться клетками и успешно доставлять в ядро молекулы нуклеиновых кислот. В рамках настоящего обзора описаны современные подходы к разработке наноносителей и сформулированы основные требования к их физико-химическим свойствам, обеспечивающим наиболее эффективную доставку генетического материала сквозь барьерные структуры глаза в биполярные и ганглиозные клетки. По результатам анализа актуальных данных литературы отобраны несколько типов наночастиц, наиболее перспективных для использования в рамках оптогенетического протезирования сетчатки.

Ключевые слова: сетчатка, внутриглазные инъекции, оптогенетическое протезирование, синтетические наночастицы, доставка ДНК

DOI: 10.31857/S086981392111008X

Оптогенетика – это подход, позволяющий регулировать физиологическую активность генетически модифицированных клеток с помощью световой стимуляции. Для ее реализации в клетки необходимо доставить экзогенную ДНК, кодирующую светочувствительный белок – ионный канал (бактериальные опсины) или метаболитный рецептор (опсины животных). Под воздействием света с определенными спектральными характеристиками у нейронов, экспрессирующих такие

белки, будет происходить гиперполяризация или деполяризация мембраны [1]. Изначально оптогенетика применялась как инструмент для фундаментальных исследований нейронной активности, поскольку она позволяет с высокой точностью и селективностью контролировать работу отдельных клеток и их популяций. Свою основную прикладную значимость этот подход приобрел в рамках терапии дегенеративных заболеваний сетчатки, таких как возрастная макулодистрофия или пигментный ретинит. В ходе их развития происходит гибель фоторецепторных клеток сетчатки – палочек и колбочек – либо в области желтого пятна (макулы), либо начиная с периферии [2]. Зачастую другие типы нейронов сетчатки (горизонтальные, биполярные, амакриновые и ганглиозные) сохраняются в течение длительного времени, однако в отсутствие фоторецепторов, преобразующих энергию света в электрический сигнал, теряется первое и основное звено в цепи световосприятия. Оптогенетика позволяет “протезировать” зрение, то есть наделять изначально не способные к фоторецепции клетки сетчатки светочувствительностью, превратив их в “псевдофоторецепторы”. Наиболее перспективными мишенями для оптогенетического протезирования являются биполярные и ганглиозные клетки, а также сохранившиеся сегменты фоторецепторов, поскольку именно через них нервный импульс напрямую передается к мозгу [3].

Доставка ДНК, кодирующей светочувствительные белки, в клетки сетчатки происходит с помощью специальных носителей – векторов. Методы доставки без участия векторов, такие как прямая инъекция ДНК и электропорация, либо не позволяют трансфицировать клетки сетчатки, либо имеют крайне низкую эффективность. Существует две основные категории носителей для доставки генов: вирусные и синтетические векторы. Вирусные векторы конструируются на основе лентивирусов, вируса бешенства, аденовирусов и, чаще всего, на основе аденоассоциированных вирусов. Невирусные векторы включают разнообразные частицы субмикронного размера, связывающиеся с молекулами ДНК. В качестве их основы могут выступать полимеры, липиды и металлические нанокристаллы [4]. Традиционно считается, что наночастицы трансфицируют живые клетки гораздо менее эффективно, чем вирусы, поскольку у них отсутствуют специальные механизмы проникновения в клетку и доставки генетического материала в ядро. Однако за последние годы понимание механизмов взаимодействия частиц с тканями глаза и с отдельными клетками значительно углубилось, и исследователи научились решать задачу по доставке генов за счет оптимизации физико-химических свойств отдельных компонентов и носителя в целом.

Синтетические векторы обладают рядом преимуществ по сравнению с вирусами, их синтез существенно проще и относительно дешевле, они обладают большей емкостью, особенно в сравнении с аденоассоциированным вирусом, который способен переносить фрагменты ДНК длиной не более 5 тыс. п.о., включая не только ген интереса, но и регуляторные последовательности, необходимые для экспрессии [5]. Наночастицы способны переносить полноценные плазмиды длиной до 20 тыс. п.о., что позволяет включать в последовательность дополнительные элементы, усиливающие экспрессию и ускоряющие транспорт плазмиды в ядро [4]. Несмотря на то, что глаз является иммунопривилегированным органом, введение в него вирусных векторов неизбежно вызывает иммунный ответ и синтез антител, блокирующих активность вирусов при повторных инъекциях [6]. В результате к настоящему времени синтетические наночастицы представляют собой широко распространенный и эффективный инструмент для трансфекции клеток сетчатки. Для более детального рассмотрения вопросов в этой области мы рекомендуем обратиться к недавним обзорным статьям [7, 8].

Следует отметить, что область применения синтетических наночастиц в доставке генетического материала в клетки сетчатки в настоящее время почти полностью

сводится к генной терапии фоторецепторов и клеток пигментного эпителия. На животных моделях отрабатывают множество подходов по введению здоровой копии гена, чья экспрессия нарушена, или малых РНК, блокирующих экспрессию патологического продукта, но имеются лишь единичные работы, в которых наночастицы применяются для модификации других клеток сетчатки путем придания им светочувствительности. Целью данного обзора является анализ современных разработок в области синтетических носителей ДНК и оценка возможности их применения для оптогенетического протезирования биполярных и ганглиозных клеток сетчатки. В заключении будет сделан вывод о том, могут ли наночастицы конкурировать с вирусами за роль средства доставки в рамках этой специфической терапии.

ДОСТАВКА ЧАСТИЦ К СЕТЧАТКЕ

При доставке наночастиц следует учитывать, что сетчатка всех позвоночных инвертирована. Это означает, что первыми на пути распространения света — и ближе всего к заполняющему большую часть объема глаза стекловидному телу — оказываются ганглиозные клетки. Затем свет проходит через слой внутренних нейронов (амакриновых, биполярных и горизонтальных клеток) и в итоге попадает на наружный слой фоторецепторов, обращенных к пигментному эпителию и сосудистой оболочке глаза. Доставка материала к клеткам сетчатки может достигаться разными путями. При системном введении на пути вводимых частиц встает гематоретинальный барьер, образованный плотными контактами между клетками эндотелия сосудов сетчатки и клетками пигментного эпителия [9]. Аналогичные трудности возникают при доставке наночастиц с помощью глазных капель — в этом случае барьером выступает роговица глаза. И хотя некоторым типам частиц удастся преодолеть данные барьеры и достичь сетчатки, очевидно, что более предпочтительным для данной цели является введение носителя непосредственно внутрь глаза. В настоящее время для введения как вирусных, так и невирусных векторов применяют главным образом интравитреальные и трансретинальные инъекции. Трансретинальное введение представляет собой сложную офтальмологическую операцию, проводимую глазным хирургом, в ходе которой проводится удаление части стекловидного тела (вitrektomia), затем в субретинальное (между сетчаткой и пигментным эпителием) пространство целевой области сетчатки вводится тонкая игла и выполняется инфузия небольшого объема изотонического солевого раствора. Вследствие этого под сетчаткой образуется пузырек, в который затем и вводится вектор через то же микроотверстие в сетчатке [10, 11]. Такой способ введения сопряжен со значительными сложностями и рисками, среди которых общие осложнения после витректомии, последующее истончение наружного ядерного слоя сетчатки, а также осложнения от общего наркоза. Дегенерирующая сетчатка, в которую требуется доставлять вещества при оптогенетическом протезировании, становится очень хрупкой, и прокол сетчатки иглой может в дальнейшем приводить к более крупным разрывам. Кроме того, процедура субретинального введения очень сложна технически и требует участия высококвалифицированных специалистов и применения специализированного оборудования.

Интравитреальные инъекции являются более простым и доступным способом доставки целевых веществ к сетчатке. Процедура проводится под местной анестезией, часто в амбулаторных условиях, и материал вводится непосредственно в полость стекловидного тела. В этом случае сетчатка не отслаивается от пигментного эпителия, а доставляемый материал подходит к сетчатке со стороны внутренних слоев, встречая на своем пути сначала ганглиозные, а затем биполярные клетки, которые и являются основными мишенями при оптогенетическом протезировании. Интравитреальный способ введения широко применяется для доставки терапевтических агентов, подавляющих эндотелиальные факторы роста, антибиотиков

и глюкокортикоидов, а также вирусных векторов [12, 13]. При оценке способности вирусных или невирусных векторов достигать клеток сетчатки важно учитывать свойства барьеров, через которые им предстоит пройти на пути из стекловидного тела к ганглиозным и биполярным клеткам. Первым этапом прохождения частиц после интравитреальной инъекции является перемещение в самом стекловидном теле. Так, в работе Хи с соавт. [14] исследовалась способность частиц из полистирола проходить через эту структуру в зависимости от их размера и заряда поверхностных функциональных групп. Было показано, что частицы диаметром более 500 нм имеют весьма ограниченную подвижность, а среди более мелких частиц преимущественно при перемещении обладают нейтрально и отрицательно заряженные, поскольку они не связываются с отрицательно заряженными остатками гликозаминогликанов, образующих матрикс стекловидного тела.

Основной барьер на пути наночастиц — это внутренняя пограничная мембрана (ВПМ), выстилающая сетчатку с внутренней стороны и прилегающая к кортексу стекловидного тела. ВПМ — это базальная мембрана, которая представляет собой слой внеклеточного матрикса, состоящего из высокомолекулярных белков, среди которых ламинин, коллаген IV типа, нидоген-/энтактин-1 и -2, а также протеогликанов — перлекана, агрина и коллагена VIII типа [15]. Протеогликаны обладают высокой степенью гликозилирования, и боковые цепи образующих их гликозаминогликанов обуславливают высокий отрицательный заряд мембраны [16]. По-видимому, эту особенность следует принимать во внимание при разработке невирусных векторов для доставки в сетчатку со стороны стекловидного тела, поскольку нейтральный или отрицательный заряд не позволит частицам связаться с мембраной для дальнейшего преодоления, а слишком высокий положительный — полностью иммобилизует их в ее толще.

К настоящему времени нет исчерпывающих данных о том, каков предельный размер частиц, проникновение которых возможно через ВПМ. Имеются данные о том, что ряд моноклональных антител, белков и пептидов массой до 150 кДа способны проникать через нее [17]. Также было показано, что для вирусных векторов ВПМ является как физическим, так и биологическим барьером. Гепарансульфат, который является компонентом входящих в состав данной мембраны протеогликанов, связывается с аденоассоциированными вирусами 2-го и 3-го серотипа, что позволяет им накапливаться на поверхности между стекловидным телом и сетчаткой — именно это делает возможной трансдукцию сетчатки этими вирусами, в отличие от других серотипов [18, 19]. Хотя такой специфический механизм взаимодействия вирусов с ВПМ не должен иметь значения для проникновения невирусных векторов, однако этот пример показывает, что свойства отдельных компонентов данной мембраны могут оказывать существенное влияние на прохождение через нее наночастиц.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ С КЛЕТКАМИ

Захват клетками частиц из внеклеточной среды происходит за счет фагоцитоза или эндоцитоза [20]. Реализация того или иного механизма связана как с физико-химическими свойствами частиц — их размером, зарядом, формой, наличием специфических поверхностных групп, так и с типом захватывающей их клетки [21, 22]. Например, среди клеток сетчатки лишь пигментный эпителий и глиальные (мюллеровские) клетки способны к фагоцитозу и выполняют, по сути, роль макрофагов, удаляя фрагменты наружных сегментов фоторецепторов или клеток в состоянии апоптоза [23, 24]. Эта особенность позволяет им успешно захватывать достаточно крупные объекты, такие как бактерии, дрожжи и даже водоросли (диаметр 1–8 мкм) [25]. Однако в возбудимых клетках сетчатки, представляющих основной интерес в качестве мишеней для оптогенетического протезирования — фоторецеп-

торах, биполярных и ганглиозных клетках — основным путем входа частиц в клетку является эндоцитоз, и они способны захватывать частицы диаметром до 250 нм [26–29]. Ряд исследований показывает, что оптимальный размер частиц для их наиболее быстрой и эффективной интернализации в клетку составляет около 50 нм [30, 31].

В зависимости от участвующих белков и липидов, а также морфологии образующихся мембранных структур, выделяют несколько типов эндоцитоза (см. обзор [20]). Основными являются эндоцитоз, опосредованный клатрином или кавеолином, но и другие клатрин/кавеолин-независимые механизмы также вносят вклад в захват внеклеточных частиц. Кавеолин-зависимый эндоцитоз регулируется белками семейства кавеолинов, и в большинстве типов клеток за образование везикул в первую очередь отвечает изоформа кавеолина-1. В сетчатке эта изоформа наиболее активно экспрессируется в мюллеровских клетках, клетках сосудов и в пигментном эпителии, а в фоторецепторах и других нейронах сетчатки обнаруживается лишь в небольшом количестве [32]. Таким образом, маловероятно, что наночастицы, предназначенные для трансдукции возбудимых клеток, будут захватываться по кавеолин-опосредованному типу. Клатрин-зависимый путь запускается либо при взаимодействии частиц со специфическими рецепторами на поверхности клетки (рецептор-опосредованный эндоцитоз), либо при возникновении ионных или диполь-дипольных взаимодействий частиц с плазматической мембраной (рецептор-независимый эндоцитоз) [33]. В обоих случаях образование везикул опосредуется комплексами белка клатрина, которые образуются на внутриклеточной стороне плазматической мембраны и совместно с рядом адаптерных белков образуют корзинообразную структуру вокруг наночастицы. В итоге частица заключается в мембранный пузырек (эндосому), который затем интернализуется во внутриклеточное пространство.

Для того, чтобы наночастица с большей вероятностью была поглощена путем рецептор-опосредованного эндоцитоза, ее поверхность можно конъюгировать с лигандами мембранных рецепторов, такими как лактоферрин или фолат [34, 35]. Для этой же цели наночастицы могут быть покрыты специфическими антителами, которые связываются с рецепторами на клетке-мишени [36]. Немодифицированные наночастицы, как правило, проникают в клетку путем рецептор-независимого эндоцитоза за счет ионных взаимодействий между плазматической мембраной клетки и собственным поверхностным зарядом. Поскольку участки фосфолипидов, образующие поверхность мембраны, имеют отрицательный заряд, то положительно заряженные (катионные) частицы более эффективно подвергаются эндоцитозу по сравнению с анионными или нейтральными [37, 38]. Однако поглощение большого количества положительно заряженных частиц может приводить к нарушению целостности клеточной мембраны и вызывать токсический эффект или даже приводить к гибели клетки [39, 40]. Следует также отметить, что отрицательно заряженные наночастицы эффективнее проникают в клетку, чем нейтральные [41].

Захваченные в ходе клатрин-зависимого эндоцитоза частицы, как правило, разрушаются по мере созревания эндосом и их слияния с лизосомами, под действием гидролаз, функционирующих в кислой среде (pH 4.5–6). Поэтому при создании наноносителей следует предусматривать способы, которыми частица сможет покинуть эндосому (см. обзор [42]). Так, например, некоторые типы липидных и полимерных наночастиц способны сливаться с мембраной эндосомы, высвобождая свое содержимое в цитозоль [43, 44]. Наиболее распространенный механизм выхода из эндосомы связан с разрушением ее мембраны за счет повышения внутреннего давления, и ранее предполагалось, что это явление связано с т.н. “эффектом протонной губки”. Согласно этой гипотезе, входящие в состав ряда частиц полимеры с высокой буферной емкостью могут подавлять снижение pH в эндосоме, что

вынуждает клетку продолжать закачку в нее протонов и, вместе с ними, хлорид-анионов и молекул воды, повышая ее внутреннее давление [45]. Однако ряд экспериментальных работ показал, что такая модель не всегда точно предсказывает поведение частиц различного состава в клетке, это говорит о том, что если данный эффект и существует, его роль в разрушении эндосомы не ведущая [46, 47]. В качестве альтернативных путей рассматривается распад полимерных частиц на большое количество олигомеров, приводящий к скачку осмотического давления в эндосоме [48]; увеличение размеров частиц в условиях пониженного значения pH [49]; прямое разрушение мембраны эндосомы некоторыми полимерными компонентами частицы [50]. Механизмы, лежащие в основе выхода из эндосомы, могут оказаться токсичными для клетки, если они будут воздействовать на ее плазматическую мембрану. Для того, чтобы этого избежать, следует использовать в составе наночастиц полимеры, провоцирующие разрушение мембраны только в кислой среде, типичной для созревающих эндосом и эндолизосом. Если наночастице удастся высвободиться из эндолизосомы, то плазмидная ДНК оказывается в цитозоле. Однако прежде чем сможет произойти экспрессия переносимого ею гена, ДНК должна оказаться в ядре клетки. Поскольку нейроны сетчатки являются зрелыми постмитотическими клетками, проникновение ДНК в ядро является критическим этапом, который существенно влияет на эффективность экспрессии светочувствительного белка (см. обзор [51]). Исследования показали, что лишь короткие фрагменты ДНК (200–300 п.о.) способны самостоятельно проникать через ядерные поры [52], однако при участии транспортных белков, цитозольных гистонов и шаперонов могут транспортироваться и более длинные фрагменты [53, 54]. Улучшить способность доставленной наночастицами экзогенной ДНК к проникновению в ядро возможно путем встраивания в ее нуклеотидную последовательность сигналов ядерной локализации, которые узнаются клеточными транскрипционными факторами. Например, энхансер вируса SV40, обычно используемый в составе плазмид для усиления экспрессии генов, содержит сигнал ядерной локализации, распознаваемый сразу несколькими транскрипционными факторами (AP-1, 2, 3, Tef- 1, 2, Oct1, NFκB) [55]. Комплекс фактора транскрипции с плазмидой затем распознается белками-импортинами, которые связываются с ним и доставляют к ядерным порам. Показано, что плазмиды без сайтов, узнаваемых транскрипционными факторами, не перемещаются в ядро, а остаются в цитозоле [56]. Таким образом, конструкция плазмидной ДНК не менее важна для эффективной трансдукции клеток, чем состав и строение носителей – наночастиц.

ВИДЫ НАНОЧАСТИЦ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ДОСТАВКИ ДНК В КЛЕТКИ СЕТЧАТКИ

В следующих подразделах будут рассмотрены нанокapsулы на основе трех типов веществ: полимерных молекул (наиболее гетерогенная группа), липидов и инертных металлов (см. рис. 1). Для каждого будут приведены характерные особенности, определяющие способ их применения, и описаны экспериментальные работы, в которых этот тип частиц использовался для трансфекции клеток сетчатки или других тканей глаза.

ПОЛИМЕРНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ

Полипептиды

Желатин представляет собой частично гидролизованный коллаген и отличается высокой биосовместимостью, биodeградируемостью и возможностью присоединения разнообразных активных групп для направленной доставки. Благодаря этим свойствам он стал применяться при синтезе наночастиц для доставки лекарственных

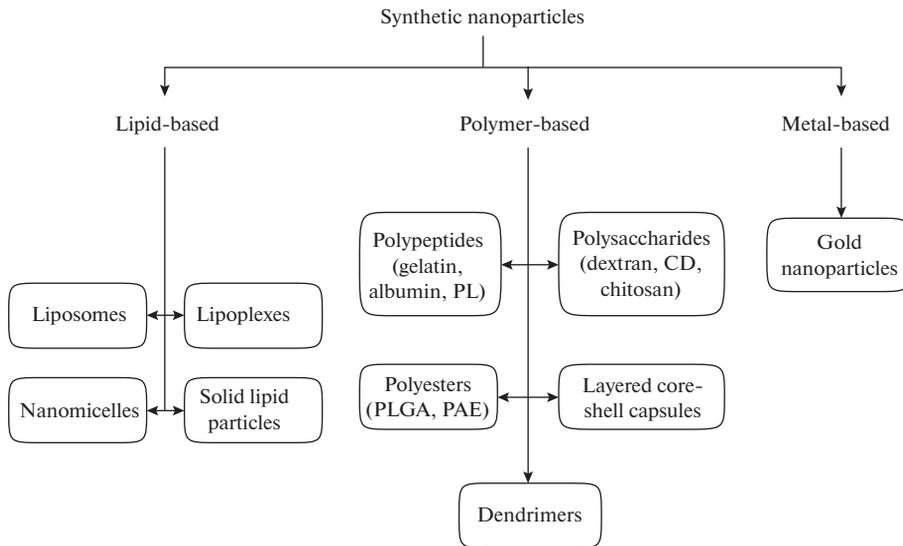


Рис. 1. Типы синтетических векторов, используемых для доставки нуклеиновых кислот в сетчатку. PL – полилизин, CD – циклодекстрины, PLGA – поли(лактид-гликолид), PAE – полиаминоэфир.

ных препаратов и генов в ткани человека и животных. Желатин представляет собой особый полипептид, в составе которого катионные, анионные и гидрофобные группы представлены в соотношении 1 : 1 : 1 [57]. Наночастицы из чистого желатина нестабильны и склонны к агрегации, поэтому их, как правило, модифицируют путем сшивки с другими соединениями, такими как альдегиды, микробная трансглутаминаза и др. Для связывания с анионной плазмидной ДНК благоприятным фактором является положительный заряд, которым характеризуются наночастицы из желатина типа А, но в то же время наночастицы с высоким положительным зарядом часто оказываются токсичными для клеток. Компромиссное решение было предложено Zorzi с соавт. [58], в работе которых были разработаны гибридные наночастицы из катионизированного желатина и полианионов декстрана сульфата и хондроитина сульфата. Такие частицы связываются с плазмидной ДНК, защищая ее от действия ДНКаз, проявляют пониженную токсичность в экспериментах *in vitro* и способны доставлять ДНК в клетки роговицы человека (*ex vivo*) и мышцы (*in vivo*) [59].

Альбумин также является белковым носителем, который применяется для получения нетоксичных, неиммуногенных, биосовместимых и биodeградируемых наночастиц. Такие наночастицы обладают высокой связывающей способностью и хорошим профилем безопасности и переносимости. Первичная структура альбумина хорошо охарактеризована, и высокое содержание заряженных аминокислот позволяет связываться лекарственным веществам с положительным или отрицательным зарядом без вспомогательного участия других соединений [60]. Из альбумина можно синтезировать наночастицы относительно небольших размеров (50–300 нм). Поскольку альбумин имеет в своем составе широкий спектр функциональных групп, это позволяет проводить разные поверхностные модификации альбуминовых наночастиц, например, путем ковалентного связывания с поверхностно-активными веществами, полилизинном, полиэтиленгликолем (ПЭГ), трансферрином, моноклональными антителами и др. За последние годы опубликованы лишь работы, где с помощью альбуминовых наночастиц в сетчатку доставляют белки и лекарственные препараты [61, 62]. Первая и к настоящему времени единственная

опубликованная попытка доставить генетический материал в ткани глаза при помощи таких частиц была совершена в 2007 г. [63], и в данной работе было показано, что наночастицы из сывороточного альбумина человека размером 120 нм успешно доставляют плазмиды с геном Cu, Zn-супероксиддисмутазы в клетки сетчатки мышей после интравитреальной инъекции, что подтверждает вестерн-блоттинг.

Среди пептидных полимеров, используемых для доставки различных веществ в ткани глаза выделяется СК30-ПЭГ. Он представляет собой 30 аминокислотных остатков лизина, дающих положительный заряд для связывания ДНК, к которым через остаток цистеина пришит ПЭГ, обеспечивающий стабильность структуры и улучшающий захват частицы клетками [64]. Поскольку у такой наночастицы оказывается большое количество катионных групп, она способна почти полностью (более чем на 90%) компенсировать отрицательный заряд крупной молекулы плазмидной ДНК, в результате чего та самопроизвольно конденсируется в компактную наноструктуру, устойчивую к ДНКазам. Показано, что частицы на основе СК30-ПЭГ при захвате клеткой немедленно транспортируются в ядро, избегая захвата в эндосому [65]. Это происходит за счет образования комплексов с ядерным белком нуклеолином, который в некотором количестве присутствует и на плазматической мембране. Впоследствии комплекс нуклеолина с наночастицей перемещается по микротрубочкам непосредственно в ядрышко, и плазмидная ДНК начинает экспрессию входящих в ее состав генов. Показано, что в сетчатке мышей нуклеолин экспрессируется во всех клеточных слоях, это позволяет предположить, что с помощью частиц на основе СК30-ПЭГ можно эффективно трансфицировать как ганглиозные, так и биполярные клетки [64]. Эксперимент по интравитреальному введению наночастиц, несущих плазмиду, кодирующую флуоресцентный маркер под неспецифичным промотором, подтвердил это предположение, поскольку экспрессия зеленого флуоресцентного белка (GFP) наблюдалась прежде всего в ганглиозных клетках [66]. Частицы на основе СК30-ПЭГ многократно использовались для проведения генной терапии у мышей с нарушениями экспрессии таких генов, как *Rds*, *Rpr65* и *Abca4* и приводили к значительному улучшению состояния сетчатки по сравнению с контролем [67–69]. Количественная оценка эффективности таких частиц также показала, что они способны приводить к сопоставимому с вирусными векторами уровню экспрессии целевого белка [70].

Полисахариды

Полисахариды являются биоразлагаемыми, биосовместимыми и неиммуногенными полимерами, их мономеры связаны друг с другом посредством гликозидных связей. Наиболее часто для создания носителей применяются декстран, хитозан и гиалуроновая кислота [71], однако последняя, ввиду отрицательного заряда при физиологических значениях рН, плохо связывает нуклеиновые кислоты и используется для их транспортировки только в комбинации с другими полимерами [72]. Декстран представляет собой полимер, состоящий из остатков глюкозы, и в нормальных условиях не имеет заряда. В результате эффективность связывания ДНК существенно снижается, и для переноса плазмид в декстрановые частицы необходимо включать дополнительные катионные компоненты. Так, способность успешно проникать в клетки и доставлять генетический материал была продемонстрирована для декстрановых частиц, модифицированных диэтиламиноэтилом, спермином и полиэтиленамином [73–75]. Несмотря на широкую распространенность как инструмента для трансфекции, декстрановые частицы до сих пор не применялись для тканей глаза. Родственная группа полимеров на основе остатков глюкозы – циклодекстрины – обладают рядом преимуществ по сравнению с декстраном: они легко приобретают положительный заряд за счет химических модификаций, ускоряют прохождение частиц через клеточную мембрану и способны образовывать комплексы включения,

инкапсулируя переносимую молекулу в собственной полости [76]. Циклодекстрины обычно применяются в качестве носителей для доставки лекарственных препаратов в различные ткани глаза в составе капель, наносимых на роговицу [77, 78]. Однако недавние исследования показывают, что некоторые из модифицированных форм этих полимеров оказывают токсический эффект на клетки сетчатки [79], что ограничивает возможность их применения для доставки генетического материала.

Хитозан состоит из мономеров N-ацетил-D-глюкозамина и содержит большое количество аминогрупп, что обуславливает его положительный заряд при физиологических значениях pH. Это свойство делает наночастицы из хитозана крайне привлекательными для переноса плазмидной ДНК, однако их применение ограничивает низкая буферная емкость, не позволяющая частице покидать эндосому по механизму “протонной губки” [80]. Отчасти данная проблема решается введением в полимер дополнительных аминогрупп – в результате в эксперименте усиливается экспрессия белка, кодируемого доставляемой ДНК по сравнению с наночастицами из немодифицированного хитозана [81, 82]. Mitra с соавт. [83] выявили другую проблему, снижающую эффективность хитозановых частиц в роли вектора: оказавшись в стекловидном теле, полимеры на основе хитозана образуют вязкий гель, затрудняющий распространение частиц и соответственно ДНК по всему объему глаза. В результате экспрессия белка в сетчатке ограничивается небольшой областью вблизи места инъекции, что не позволит создать достаточно широкое поле зрения при оптогенетическом протезировании. Улучшить ситуацию может добавление в состав наночастиц дополнительных катионных полимеров, которые будут препятствовать образованию геля. Следует отметить, что Mitra с соавт. [83] также показали, что наночастицы на основе хитозана, модифицированного добавлением этиленгликоля, успешно трансфицируют клетки пигментного эпителия после субретинальной инъекции, не нарушая морфологию и функциональность сетчатки. Другие исследования показали возможность интравитреальной доставки генов (плазминогена и GFP) в ганглиозные клетки сетчатки, а также клетки внутреннего ядерного слоя с помощью частиц на основе коротких олигомеров хитозана и гибридных частиц, содержащих дополнительно поли(лактид-гликолид) [84, 85]. Таким образом, модифицированный хитозан является наиболее привлекательным полисахаридом, выступающим в роли основы для генетических векторов. Более подробно о факторах, влияющих на трансфекцию полиплексов на основе хитозана и его производных, можно ознакомиться в обзоре [86].

Другие типы полимеров

Поли(лактид-гликолид) (ПЛГ) – это полимер, состоящий из остатков молочной и гликолевой кислот, обе из которых являются типичными внутриклеточными метаболитами, что обеспечивает частицам на основе ПЛГ высокую биосовместимость и биоразлагаемость. Соотношение лактида и гликолида может варьировать вплоть до использования наночастиц из чистого полимера молочной кислоты, которые будут наиболее устойчивыми к разложению в условиях эндолизосомы [87]. Безопасность применения частиц на основе ПЛГ проверялась в различных экспериментах *in vivo* и их токсичность оказалась очень низкой [88]. Однако Thackaberry с соавт. [89] показали, что токсичность ПЛГ по отношению к тканям глаза может сильно варьировать в зависимости от формы наночастиц, оказываясь наименьшей для палочкоподобной формы. Одним из недостатков ПЛГ как потенциального средства доставки ДНК является нейтральный заряд при физиологических значениях pH, что ухудшает связывание с ним плазмидной ДНК. Поэтому обычно частицы конструируются с добавлением другого полимера, имеющего положительный заряд, например, хитозана или ПЭГ [90, 91]. С другой стороны, в кислой среде внутри эндолизосомы промежуточные продук-

ты гидролиза ПЛГ приобретают положительный заряд, который возрастает по мере разрушения наночастицы. Эта особенность позволяет частицам эффективно покидать эндосомы, поскольку накапливающийся заряд приводит к их дестабилизации [92]. Несмотря на популярность в роли носителей лекарственных препаратов, частицы на основе ПЛГ применялись для доставки генетического материала в клетки сетчатки лишь в ограниченном числе экспериментальных работ. Помимо упомянутого выше исследования частиц, содержащих хитозан и ПЛГ, также следует отметить работу Zhang с соавт. [93], которые использовали наночастицы из немодифицированного ПЛГ для доставки плазмиды, кодирующей малую шпилечную РНК против регулятора транскрипции NIF-1 α (важный участник процесса ангиогенеза при повреждениях сетчатки) и GFP. При интравитреальном введении наночастиц крысам с индуцированной неоваскуляризацией сосудистой оболочки глаза GFP экспрессировался в фоторецепторах, а также в клетках пигментного эпителия. Родственные ПЛГ соединения, полиаминоэфир-ы также используются в качестве основы для наноносителей и имеют преимущество в связывании ДНК за счет катионных аминогрупп [94].

Дендримеры являются уникальным классом наночастиц, которые представляют собой расходящиеся от центральной молекулы ветвящиеся цепи мономеров [95]. В результате они имеют вид разветвленной сферической структуры с внутренними полостями, которые могут удерживать различные макромолекулы, включая плазмидную ДНК. Наиболее популярными для транспортировки ДНК являются дендримеры полиамидоамина (ПАА), имеющие большое количество положительно заряженных аминогрупп, но также используются полиэтиленимин (ПЭИ) и полилизин [96]. Дендримеры обычно имеют размер от 1 до 100 нм (в зависимости от размера ветвящихся цепей), поглощаются клеткой путем клатрин-опосредованного эндоцитоза, а затем покидают эндосому за счет эффекта “протонной губки” [97]. В исследованиях *in vivo* дендримеры ПАА и ПЭИ показали высокую эффективность, однако с увеличением размера они становились токсичными для клеток за счет большого положительного заряда [98, 99]. Также дендримеры ПЭИ применялись для интравитреальной доставки в ганглиозные клетки сетчатки плазмиды, кодирующей малую шпилечную РНК [100].

Еще одним перспективным типом полимерного носителя являются многослойные нанокапсулы. Для их синтеза необходимо жесткое ядро – в его роли обычно выступают нанокристаллы ватерита (одна из полиморфных модификаций CaCO₃), на которое поочередно слоями наносятся катионный (полиаргинин/полилизин) и анионный (декстран сульфат) полимеры [101]. Транспортируемые нуклеиновые кислоты образуют комплекс с самым первым положительно заряженным слоем и высвобождаются после разрушения полимерной оболочки во внутриклеточном пространстве. Для предотвращения токсического эффекта, связанного с повышением внутриклеточной концентрации ионов Ca²⁺ после разрушения ватеритового ядра, оно может быть удалено из капсул заранее с помощью хелатирующего агента (этилендиаминтетраацетат натрия). Важными преимуществами таких носителей являются повышенная стабильность и емкость. В ряде работ была показана эффективность нанокапсул для доставки мРНК, мРНК и плазмидной ДНК в клеточные культуры различных типов [102, 103]. Также мы получили предварительные результаты, согласно которым капсулы диаметром 50 нм успешно доставляют мРНК в клетки сетчатки мышей после интравитреальной инъекции [104], локализуясь преимущественно в фоторецепторах. Дополнительные модификации, направленные на повышение селективности таких частиц к биполярным и ганглиозным клеткам, могут сделать этот тип носителя пригодным для использования в оптогенетическом протезировании.

ЛИПИДНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ

Липосомы представляют собой сферические частицы, состоящие по меньшей мере из одного липидного бислоя, внутри которого заключена гидрофильная (водная) фаза. Бислои образованы преимущественно фосфолипидами и стеролами, аналогично клеточным мембранам. Липосомы могут выступать в качестве средства транспортировки для гидрофильных, гидрофобных и амфифильных соединений [105], к их преимуществам можно отнести отсутствие токсичности и слабые антигенные свойства, возможность точно контролировать при синтезе их размер, липидный состав и электрический заряд, а также возможность модифицировать их поверхность полимерами и антителами [106]. Частицы на основе катионных липидов способны не только эффективно захватываться клеткой путем эндоцитоза, но также сливаться с отрицательно заряженной мембраной эндосомы, высвобождая ДНК в цитозоль. Применение липосом для доставки лекарственных препаратов в глаз, в том числе в сетчатку, насчитывает уже несколько десятилетий. Липосомы служили средством доставки путем интравитреальных инъекций для таких соединений, как антибиотики [107], противовирусные препараты [108, 109], препараты, подавляющие ангиогенез [110]. Возможность использования липосом для доставки генов в клетки пигментного эпителия была продемонстрирована *in vivo* в исследовании Lajunen с соавт. [111], где плазмидная ДНК эффективно доставлялась в клетки пигментного эпителия посредством липосом, меченных трансферрином; такой препарат применялся на крысах в форме глазных капель. Кроме того, было показано, что при внутриглазных инъекциях липосом с плазмидной ДНК, кодирующей ген галактозидазы, происходила ее успешная доставка в ганглиозные клетки сетчатки и пигментный эпителий [112].

Наномицеллы представляют собой самособирающиеся липидные частицы, в отличие от липосом они образованы липидным монослоем, и в них выделяют гидрофобное ядро и гидрофильную оболочку. Наномицеллы обладают низкой токсичностью для тканей глаза что, например, было показано для носителей, состоящих из полиоксиэтилен-гидрогенизированного касторового масла 40 и октосинола 40 [113], и для комплексных носителей из октосинола 40 и токоферола-ПЭГ-сукцината, применяемых для доставки к тканям глаза рапамицина [114]. И хотя данные факты говорят о привлекательности липидных наномицелл как средства доставки генов в клетки сетчатки, однако к настоящему времени не опубликованы исследования, где изучалась бы их способность к транспортировке ДНК в ткани глаза.

Еще одной перспективной разновидностью транспортных наночастиц на основе липидов являются липоплексы. Под этим термином понимают компактные структуры, которые образуются при взаимодействии положительно заряженных за счет наличия дополнительных химических групп “головок” фосфолипидов с отрицательно заряженными молекулами нуклеиновых кислот. В таком комплексе нуклеиновые кислоты получают защиту от деградации [115]. В литературе описаны попытки использовать липоплексы для доставки малых интерферирующих РНК (миРНК) в ткани глаза. В одном из таких исследований оценивалось влияние поверхностного заряда ПЭГилированных липоплексов с миРНК на их проникновение и распределение в сетчатке при интравитреальных инъекциях мышам, и было показано, что оптимальными для данной цели являются положительно заряженные липоплексы [116]. В работе Amadio с соавт. [117] миРНК против антигена R человека (белка из семейства ELAV – embryonic lethal, abnormal vision) доставлялась при помощи липоплексов, вводимых интравитреально крысам с модельной диабетической ретинопатией. Липоплексы с указанной миРНК продемонстрировали успешную трансфекцию, и их введение привело к снижению уровня антигена R человека. В другом исследовании [118] на модели *ex vivo* (изолированные глаза быка, культура клеток пигментного эпителия человека) было показано, что покрытие липоплексов с плазмидной ДНК гиалуроновой кислотой приводит к заметному

повышению эффективности интернализации и трансфекции, а также повышается подвижность таких липоплексов в матриксе стекловидного тела. Весьма многообещающие результаты также были получены в одной из недавних работ [119], где покрытые гиалуроновой кислотой липоплексы после интравитреальной инъекции крысам доставляли миРНК против каспазы-3 (активирующейся при дегенерации сетчатки) в различные клетки сетчатки, оказывая тем самым нейротропное действие. Кроме того, в данной работе отдельно ретинографически оценивалась потенциальная ретинотоксичность таких частиц и было показано, что они не демонстрируют никаких токсических эффектов.

В наночастицах на основе твердых липидов выделяют ядро из таких липидов, как октадециламин, диолеил-3-триметиламмония пропан, диолеил-фосфатидилэтаноламин, которое стабилизируется поверхностно-активными веществами в водной суспензии. В таких частицах существенно снижена подвижность доставляемого лекарственного вещества, и его высвобождение может быть более контролируемым [120]. Наночастицы из твердых липидов разделяют с жидколипидными частицами их низкую токсичность, но при этом имеют и ряд преимуществ, в частности, они представляются перспективным средством доставки для макромолекул. К настоящему времени уже опубликовано несколько работ, которые посвящены применению наночастиц на основе твердых липидов для доставки генетического материала в ткани глаза. Так, Torrecilla с соавт. [121] оценивали способность наночастиц на основе твердых липидов к доставке в культуры клеток эпителия роговицы человека малых шпилечных РНК, предназначенных для борьбы с неоваскуляризацией, и результаты были положительными. В другом исследовании [122] наночастицы на основе твердых липидов, покрытых гиалуроновой кислотой, были применены для доставки гена ретиношизина модельным мышам с ювенильным ретиношизисом. Уровень трансфекции в результате введения таких частиц путем интравитреальной инъекции был наиболее высоким в фоторецепторных клетках, но трансфекция также была отмечена и в ганглиозных клетках.

Обобщая описанные в данном разделе результаты, следует отметить, что особо перспективным средством доставки нуклеиновых кислот в клетки сетчатки видится сочетание липидной основы с покрытием полимерами. Опубликованные к настоящему времени данные по таким формам частиц кажутся весьма многообещающими, и было бы целесообразно применять их для доставки конструкторов для оптогенетического протезирования сетчатки.

НАНОЧАСТИЦЫ ИЗ ИНЕРТНЫХ МЕТАЛЛОВ

Еще одним из направлений разработки наночастиц для доставки лекарственных препаратов и генетического материала является создание наночастиц из инертных металлов. Такие частицы являются потенциально нетоксичными, биосовместимыми, и существуют широкие возможности по их модификации с применением других материалов (полимеров, антител и др.). Еще одним преимуществом является относительная простота синтеза таких частиц. Среди инертных металлов наиболее широкое применение при изготовлении наночастиц для биомедицинских целей получило золото. Механизм интернализации золотых наночастиц зависит от характеристик поверхности, таких как заряд и размер, и чаще всего это эндоцитоз. В том случае, если наночастицы золота покрывают антителами, они входят в клетку по механизму рецептор-опосредованного эндоцитоза [123]. Наночастицы золота успешно справляются с задачей доставки крупных пептидов и нуклеиновых кислот, и каких-либо серьезных ограничений на размер переносимых молекул не накладывается [124]. Разработаны рецептуры, в которых частицы золота связываются с плазмидной ДНК посредством нековалентных электростатических взаимодействий, при этом происходит защита ДНК от расщепления ферментами [125, 126].

Необходимо отметить, что это подразумевает дополнительную функционализацию поверхности частиц золота лигандами, содержащими кватернизованные аминокислоты, ПЭИ и др. Альтернативный путь – модификация нитей нуклеиновых кислот таким образом, чтобы они ковалентно соединялись с поверхностью наночастиц. Для этой цели нуклеиновые кислоты модифицируются тиольными группами и в таком виде присоединяются к наночастицам золота, покрытым катионным полимером, и, например, в случае мРНК это приводило к эффективной трансфекции клеток в культуре [127]. Кроме того, наночастицы золота можно конъюгировать с разными лигандами, включая трансферрин и антитела, обеспечивающими адресную доставку [128, 129].

Исследований по доставке генетического материала наночастицами золота в ткани глаза, к настоящему времени опубликовано немного. В одном из них Sharma с соавт. [130] показали, что наночастицы золота, покрытые ПЭИ, способны переносить плазмидную ДНК в клетки роговицы в модели *in vitro* (роговица человека), а также не проявляют токсичность в отношении роговицы кролика в экспериментах *in vivo*. Недавно был предложен способ доставки золотыми наночастицами плазмидной ДНК с целью оптогенетического протезирования сетчатки [131]. В качестве носителя выступали нанопалочки (nanorods) из золота, конъюгированные с антителом, либо к РКСа (протеинкиназа С-альфа, белок, специфично экспрессируемый биполярными клетками сетчатки), либо к Thy1 (белок, специфично экспрессируемый ганглиозными клетками), что позволило добиться адресной доставки. Кроме того, наночастицы различались максимумом поверхностного плазмонного резонанса – 780 нм для наночастиц, предназначенных для доставки гена в ганглиозные клетки, и 850 нм – для частиц, направляемых в биполярные клетки. Далее интернализация наночастиц после интравиреальной инъекции мышам инициировалась путем воздействия лазера с одной или другой длиной волны, чтобы инициировать вход частиц в нужные клетки. В данной работе золотые наночастицы продемонстрировали селективную трансфекцию и, что не менее важно, превосходный профиль безопасности (потенциальные токсические эффекты оценивались ретинографически, методом оптической когерентной томографии на предмет целостности структур глаза после воздействия и иммуногистохимически). На данный момент работа Vatabyal с соавт. [131] – единственный опубликованный эксперимент по оптогенетическому протезированию сетчатки с применением синтетических векторов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из свойств барьеров внутри глаза, которые должен преодолеть синтетический вектор, прежде чем достигнет сетчатки, и механизмов его взаимодействия с клетками-мишенями, можно сделать вывод о его оптимальных параметрах. Успешнее всего преодолевают стекловидное тело и захватываются клетками сетчатки сравнительно небольшие наночастицы диаметром не более 100–150 нм. Наиболее благоприятный заряд этих частиц сложно определить ввиду следующей противоречивой ситуации: при отрицательном заряде частица хуже захватывается клетками и связывается с ДНК, при положительном заряде – сильнее задерживается стекловидным телом и имеет потенциально большую токсичность. Таким образом, для эффективной частицы допустим лишь небольшой положительный или отрицательный заряд, либо она должна быть вообще не заряженной. При этом в каждом случае возможны различные модификации, позволяющие нивелировать недостатки заряда того или иного знака. Например, скомпенсировать низкую эффективность эндоцитоза анионных частиц можно за счет добавления поверхностных лигандов и увеличения шансов на захват по пути рецептор-опосредованного эндоцитоза.

Анализ опубликованных за последние годы исследований наночастиц для доставки генов в клетки сетчатки показал, что в настоящее время большинство таких

носителей ориентированы на нужды генной терапии. Они преимущественно трансфицируют фоторецепторы и клетки пигментного эпителия, то есть типы клеток, в которых чаще всего происходят мутации, приводящие к гибели светочувствительного звена и, как следствие, потере зрения [132]. В то же время оптогенетическое протезирование применяется при клинической картине, соответствующей поздней стадии дегенерации сетчатки, когда фоторецепторы уже полностью погибли, и генная терапия по устранению пагубного действия той или иной мутации уже не даст никакого положительного эффекта. Для такой терапии необходима разработка носителей, способных доставлять гены светочувствительных белков во внутренние слои сетчатки, к биполярным и ганглиозным клеткам.

Из рассмотренных в рамках данного обзора наночастиц в качестве наиболее перспективных можно выделить полимерные частицы СК30-ПЭГ и на основе ПЛГ-хитозана, липоплексы, покрытые гиалуроновой кислотой и частицы золота, поверхностно модифицированные антителами. Для них всех показана способность успешно доставлять нуклеиновые кислоты (ДНК или РНК) как минимум в ганглиозные клетки после интравитреального введения. Несмотря на это, они, как и прочие рассмотренные типы наночастиц, требуют дополнительных исследований и проведения модификаций, прежде чем их можно будет считать специализированными векторами для оптогенетического протезирования сетчатки.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликты интересов, связанные с публикацией данной статьи, отсутствуют.

ВКЛАД АВТОРОВ

Написание текста рукописи – А.Ю.Р., И.С.Р., Л.А.А., анализ публикаций по теме статьи – А.Ю.Р., И.С.Р., Л.А.А., Я.В.Т., редактирование текста – А.Ю.Р., Я.В.Т.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90182.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kirpichnikov MP, Ostrovsky MA (2019) Optogenetics and Vision. *Her Russ Acad Sci* 89: 34–38. <https://doi.org/10.1134/S1019331619010039>
2. Duncan JL, Pierce EA, Laster AM, Daiger SP, Birch DG, Ash JD, Iannaccone A, Flannery JG, Sahel JA, Zack DJ, Zarbin MA (2018) Inherited retinal degenerations: current landscape and knowledge gaps. *Transl Vis Sci Technol* 7(4): 6–16. <https://doi.org/10.1167/tvst.7.4.6>
3. Фирсов МЛ (2017) Перспективы оптогенетического протезирования сетчатки. *Журн высш нерв деят им ИП Павлова* 67(5): 53–62. [Firsov ML (2017) Prospects of optogenetic prosthetics of a retina. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* 67(5): 53–62. (In Russ)]. <https://doi.org/10.7868/S0044467717050069>
4. Planul A, Dalkara D (2017) Vectors and Gene Delivery to the Retina. *Annu Rev Vis Sci* 1(3): 121–140. <https://doi.org/10.1146/annurev-vision-102016-061413>
5. Tornabene P, Trapani I, Minopoli R, Centrulo M, Lupo M, de Simone S, Tiberi P, Dell'Aquila F, Marrocco E, Iodice C, Iuliano A, Gesualdo C, Rossi S, Giaquinto L, Albert S, Hoyng CB, Polishchuk E, Cremers FPM, Surace EM, Simonelli F, De Matteis MA, Polishchuk R, Auricchio A (2019) Intein-mediated protein trans-splicing expands adeno-associated virus transfer capacity in the retina. *Sci Transl Med* 11(492): eaav4523. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aav4523>
6. Li Q, Miller R, Han PY, Pang J, Dinculescu A, Chiodo V, Hauswirth WW (2008) Intraocular route of AAV2 vector administration defines humoral immune response and therapeutic potential. *Mol Vis* 14: 1760–1769.

7. *Adijanto J, Naash MI* (2015) Nanoparticle-based technologies for retinal gene therapy. *Eur J Pharm Biopharm* 95: 353–367.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.12.028>
8. *Scheive M, Yazdani S, Hajrasouliha AR* (2021) The utility and risks of therapeutic nanotechnology in the retina. *Ther Adv Ophthalmol* 13: 25158414211003381.
<https://doi.org/10.1177/25158414211003381>
9. *Streilein JW* (2003) Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature. *Nat Rev Immunol* 3: 879–889.
<https://doi.org/10.1038/nri1224>
10. *Fischer MD, Hickey DG, Singh MS, MacLaren RE* (2016) Evaluation of an optimized injection system for retinal gene therapy in human patients. *Hum Gene Ther Methods* 27: 150–158.
<https://doi.org/10.1089/hgtb.2016.086>
11. *Ochakovski GA, Bartz-Schmidt KU, Fischer MD* (2017) Retinal gene therapy: surgical vector delivery in the translation to clinical trials. *Front Neurosci* 11:174.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00174>
12. *Du L, Peng H, Wu Q, Zhu M, Luo D, Ke X, Yang P, Lei B* (2015) Observation of total VEGF level in hyperglycemic mouse eyes after intravitreal injection of the novel anti-VEGF drug conbercept. *Mol Vis* 21: 185–193.
13. *Dalkara D, Byrne LC, Klimczak RR, Visel M, Yin L, Merigan WH, Schaffer DV* (2013) In vivo-directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous. *Sci Transl Med* 5: 189
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005708>
14. *Xu Q, Boylan NJ, Suk JS, Wang YY, Nance EA, Yang JC, Hanes J* (2013) Nanoparticle diffusion in, and microrheology of, the bovine vitreous ex vivo. *J Control Release* 167(1): 76–84.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.01.018>
15. *Candiello J, Balasubramani M, Schreiber EM, Cole GJ, Mayer U, Halfter W, Lin H* (2007) Bio-mechanical properties of native basement membranes. *FEBS J* 274(11): 2897–2908.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05823.x>
16. Halfter W, Sebag J, Cunningham ET (2014) II. E. Vitreoretinal interface and inner limiting membrane. In: *Vitreous: in Health and Disease* 165–191. Springer Science NY & Business Media New York.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1086-1_11
17. *Halfter W, Winzen U, Bishop PN, Eller A* (2006) Regulation of eye size by retinal basement membrane and vitreous body. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(8): 3586–3594.
18. *Dalkara D, Byrne LC, Klimczak RR, Visel M, Yin L, Merigan WH, Flannery JG, Schaffer DV* (2013) In vivo-directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous. *Sci Transl Med* 5: 189ra76.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005708>
19. *Boye SL, Bennett A, Scalabrino ML, McCullough KT, Van Vliet K, Choudhury S, Boye SE* (2016) Impact of heparan sulfate binding on transduction of retina by recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol* 90(8): 4215–4231.
<https://doi.org/10.1128/JVI.00200-16>
20. *Doherty GJ, McMahon HT* (2009) Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* 78: 857–902.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540>
21. *Verma A, Stellacci F* (2010) Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small* 6: 12–21.
<https://doi.org/10.1002/sml.200901158>
22. *Hillaireau H, Couvreur P* (2009) Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell mol life Sci* 66: 2873–2896.
<https://doi.org/10.1007/s00018-009-0053-z>
23. *Bejarano-Escobar R, Sánchez-Calderón H, Otero-Arenas J, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J* (2017) Müller glia and phagocytosis of cell debris in retinal tissue. *J Anat* 231(4): 471–483.
<https://doi.org/10.1111/joa.12653>
24. *Finnemann SC, Bonilha VL, Marmorstein AD, Rodriguez-Boulan E* (1997) Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires alpha(v)beta5 integrin for binding but not for internalization. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 12932–12937.
<https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.12932>
25. *Mayerson PL, Hall MO* (1986) Rat retinal pigment epithelial cells show specificity of phagocytosis in vitro. *J Cell Biol* 103: 299–308.
<https://doi.org/10.1083/jcb.103.1.299>
26. *Hollyfield JG, Rayborn ME* (1987) Endocytosis in the inner segment of rod photoreceptors: analysis of *Xenopus laevis* retinas using horseradish peroxidase. *Exp Eye Res* 45: 703–719.
https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9441-0_7
27. *Jockusch WJ, Praefcke GJ, McMahon HT, Lagnado L* (2005) Clathrin-dependent and clathrin-independent retrieval of synaptic vesicles in retinal bipolar cells. *Neuron* 46(6): 869–878.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.05.004>

28. *Butowt R, von Bartheld CS* (2001) Sorting of internalized neurotrophins into an endocytic transcytosis pathway via the Golgi system: ultrastructural analysis in retinal ganglion cells. *J Neurosci* 21(22): 8915–8930.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-22-08915.2001>
29. *Chithrani BD, Chan WC* (2007) Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett* 7(6): 1542–1550.
<https://doi.org/10.1021/nl070363y>
30. *Jin H, Heller DA, Sharma R, Strano MS* (2009) Size-dependent cellular uptake and expulsion of single-walled carbon nanotubes: single particle tracking and a generic uptake model for nanoparticles. *ACS Nano* 3(1): 149–158.
<https://doi.org/10.1021/nn800532m>
31. *Wang S-H, Lee C-W, Chiou A, Wei P-K* (2010) Size-dependent endocytosis of gold nanoparticles studied by three-dimensional mapping of plasmonic scattering images. *J Nanobiotechnol* 8(1):33.
<https://doi.org/10.1186/1477-3155-8-33>
32. *Li X, McClellan ME, Tanito M, Garteiser P, Towner R, Bissig D, Berkowitz BA, Fliesler SJ, Woodruff ML, Fain GL, Birch DG, Khan MS, Ash JD, Elliott MH* (2012) Loss of caveolin-1 impairs retinal function due to disturbance of subretinal microenvironment. *J Biol Chem* 287: 16424–16434.
<https://doi.org/10.1016/j.jabpath.2013.10.022>
33. *McMahon HT, Boucrot E* (2011) Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 517–533.
<https://doi.org/10.1038/nrm3151>
34. *Xu S, Olenyuk BZ, Okamoto CT, Hamm-Alvarez SF* (2013) Targeting receptor-mediated endocytotic pathways with nanoparticles: rationale and advances. *Adv Drug Deliv Rev* 65: 121–138.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.041>
35. *Moradi E, Vllasaliu D, Garnett M, Falcone F, Stolnik S* (2012) Ligand density and clustering effects on endocytosis of folate modified nanoparticles. *R Soc Chem Adv* 2(7): 3025–3033.
<https://doi.org/10.1039/c2ra01168a>
36. *Cardoso MM, Peca IN, Roque AC* (2012) Antibody-conjugated nanoparticles for therapeutic applications. *Curr Med Chem* 19: 3103–3127.
<https://doi.org/10.2174/092986712800784667>
37. *Cho EC, Xie J, Wurm PA, Xia Y* (2009) Understanding the role of surface charges in cellular adsorption versus internalization by selectively removing gold nanoparticles on the cell surface with a 12/KI etchant. *Nano letters* 9: 1080–1084.
<https://doi.org/10.1021/nl803487r>
38. *Marano F, Hussain S, Rodrigues-Lima F, Baeza-Squiban A, Boland S* (2011) Nanoparticles: molecular targets and cell signalling. *Arch Toxicol* 85(7): 733–741
<https://doi.org/10.1007/s00204-010-0546-4>
39. *Dawson KA, Salvati A, Lynch I* (2009) Nanotoxicology: nanoparticles reconstruct lipids. *Nat Nanotechnol* 4(2): 84–85
<https://doi.org/10.1038/nnano.2008.426>
40. *Hoffmann F, Cinatl J, Kabičková H, Kreuter J, Stieneker F* (1997) Preparation, characterization and cytotoxicity of methylmethacrylate copolymer nanoparticles with a permanent positive surface charge. *Int J Pharm* 157(2): 189–198.
[https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(97\)00242-1](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(97)00242-1)
41. *Patil S, Sandberg A, Heckert E, Self W, Seal S* (2007) Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. *Biomaterials* 28(31): 4600–4607.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.029>
42. *Smith SA, Selby LI, Johnston AP, Such GK* (2018) The endosomal escape of nanoparticles: toward more efficient cellular delivery. *Bioconj Chem* 30(2): 263–272.
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00732>
43. *Mout R, Ray M, Tay T, Sasaki K, Yesilbag Tonga G, Rotello VM* (2017) General Strategy for Direct Cytosolic Protein Delivery via Protein-Nanoparticle Co-engineering. *ACS Nano* 11: 6416–6421.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.7b02884>
44. *Kono K, Torikoshi Y, Mitsutomi M, Itoh T, Emi N, Yanagie H, Takagishi T* (2001) Novel gene delivery systems: complexes of fusigenic polymer-modified liposomes and lipoplexes. *Gene Ther* 8: 5–12.
<https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301365>
45. *Vermeulen LMP, De Smedt SC, Remaut K, Braeckmans K* (2018) The proton sponge hypothesis: Fable or fact? *Eur J Pharm Biopharm* 129: 184–190.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.05.034>
46. *Funhoff AM, van Nostrum CF, Koning GA, Schuurmans-Nieuwenbroek NM, Crommelin DJ, Hennink WE* (2004) Endosomal escape of polymeric gene delivery complexes is not always enhanced by polymers buffering at low pH. *Biomacromolecules* 5: 32–39.
<https://doi.org/10.1021/bm034041+>
47. *Benjaminsen RV, Mattehbjerg MA, Henriksen JR, Moghimi SM, Andresen TL* (2013) The Possible “Proton Sponge” Effect of Polyethylenimine (PEI) Does Not Include Change in Lysosomal

- pH. *Mol Ther* 21: 149–157.
<https://doi.org/10.1038/mt.2012.185>
48. *Massignani M, Canton I, Sun T, Hearnden V, Macneil S, Blanazs A, Armes SP, Lewis A, Battaglia G* (2010) Enhanced fluorescence imaging of live cells by effective cytosolic delivery of probes. *PLoS One* 5(5): e10459.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010459>
 49. *You J-O, Auguste DT* (2009) Nanocarrier cross-linking density and pH sensitivity regulate intracellular gene transfer. *Nano Lett* 9: 4467–4473.
<https://doi.org/10.1021/nl902789s>
 50. *Tran KK, Zhan X, Shen H* (2014) Polymer Blend Particles with Defined Compositions for Targeting Antigen to Both Class I and II Antigen Presentation Pathways. *Adv Healthcare Mater* 3: 690–702.
<https://doi.org/10.1002/adhm.201300306>
 51. *Durymanov M, Reineke J* (2018) Non-viral delivery of nucleic acids: insight into mechanisms of overcoming intracellular barriers. *Front Pharmacol* 9: 971.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00971>
 52. *Ludtke JJ, Zhang G, Sebestyén MG, Wolff JA* (1999) A nuclear localization signal can enhance both the nuclear transport and expression of 1 kb DNA. *J Cell Sci* 112(12): 2033–2041.
<https://doi.org/10.1242/jcs.112.12.2033>
 53. *Dhanoya A, Wang T, Keshavarz-Moore E, Fassati A, Chain BM* (2013) Importin-7 mediates nuclear trafficking of DNA in mammalian cells. *Traffic* 14:165–175.
<https://doi.org/10.1111/tra.12021>
 54. *Lachish-Zalait A, Lau CK, Fichtman B, Zimmerman E, Harel A, Gaylord MR, Forbes DJ, Elbaum M* (2009) Transportin mediates nuclear entry of DNA in vertebrate systems. *Traffic* 10: 1414–1428.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00968.x>
 55. *Lam AP, Dean DA* (2010) Progress and prospects: nuclear import of nonviral vectors. *Gene Ther* 17: 439–447.
<https://doi.org/10.1038/gt.2010.31>
 56. *Dean DA, Dean BS, Muller S, Smith LC* (1999) Sequence requirements for plasmid nuclear import. *Exp Cell Res* 253: 713–722.
<https://doi.org/10.1006/excr.1999.4716>
 57. *Elzoghby AO* (2013) Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: reviewing three decades of research. *J Control Release* 172(3):1075–1091.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.09.019>
 58. *Zorzi GK, Parraga JE, Seijo B, Sanchez A* (2011) Hybrid nanoparticle design based on cationized gelatin and the polyanions dextran sulfate and chondroitin sulfate for ocular gene therapy. *Macromol Biosci* 11: 905–913.
<https://doi.org/10.1002/mabi.201100005>
 59. *Contreras-Ruiz L, Zorzi GK, Hileeto D, Lopez-Garcia A, Calonge M, Seijo B, Sanchez A, Diebold Y* (2013) A nanomedicine to treat ocular surface inflammation: performance on an experimental dry eye murine model. *Gene Ther* 20: 467–477.
<https://doi.org/10.1038/gt.2012.56>
 60. *Elzoghby AO, Samy WM, Elgindy NA* (2012) Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *J Control Release* 157(2): 168–182.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.031>
 61. *Mo Y, Barnett ME, Takemoto D, Davidson H, Kompella UB* (2007) Human serum albumin nanoparticles for efficient delivery of Cu, Zn superoxide dismutase gene. *Mol Vis* 13: 746–757.
 62. *Huang D, Chen YS, Rupenthal ID* (2017) Hyaluronic acid coated albumin nanoparticles for targeted peptide delivery to the retina. *Mol Pharm* 14(2): 533–545.
<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b01029>
 63. *Tzameret A, Ketter-Katz H, Edelshtain V, Sher I, Corem-Salkmon E, Levy I, Last D, Guez D, Mardor Y, Margel S, Rotenstrich Y* (2019) In vivo MRI assessment of bioactive magnetic iron oxide/human serum albumin nanoparticle delivery into the posterior segment of the eye in a rat model of retinal degeneration. *J Nanobiotechnology* 17(1): 3.
<https://doi.org/10.1186/s12951-018-0438-y>
 64. *Conley SM, Naash MI* (2010) Nanoparticles for retinal gene therapy. *Prog Retin Eye Res* 29(5): 376–397.
<https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2010.04.004>
 65. *Chen X, Kube DM, Cooper MJ, Davis PB* (2008) Cell surface nucleolin serves as receptor for DNA nanoparticles composed of pegylated polylysine and DNA. *Mol Ther* 16(2): 333–342.
<https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300365>
 66. *Farjo R, Skaggs J, Quiambao AB, Cooper MJ, Naash MI* (2006) Efficient non-viral ocular gene transfer with compacted DNA nanoparticles. *PloS One* 1(1): e38
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000038>
 67. *Koirala A, Conley SM, Makkia R, Liu Z, Cooper MJ, Sparrow JR, Naash MI* (2013) Persistence of non-viral vector mediated RPE65 expression: case for viability as a gene transfer therapy for RPE-based diseases. *J Control Release* 172: 745–752.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.08.299>

68. Han Z, Conley SM, Makkia RS, Cooper MJ, Naash MI (2012) DNA nanoparticle-mediated ABCA4 delivery rescues Stargardt dystrophy in mice. *J Clin Invest* 122: 3221–3226. <https://doi.org/10.1172/JCI64833>
69. Cai X, Conley SM, Nash Z, Fliesler SJ, Cooper MJ, Naash MI (2010) Gene delivery to mitotic and postmitotic photoreceptors via compacted DNA nanoparticles results in improved phenotype in a mouse model of retinitis pigmentosa. *FASEB J* 24: 1178–1191. <https://doi.org/10.1096/fj.09-139147>
70. Han Z, Conley SM, Makkia R, Guo J, Cooper MJ, Naash MI (2012) Comparative analysis of DNA nanoparticles and AAVs for ocular gene delivery. *PLoS One* 7(12): e52189 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052189>
71. Dubashynskaya N, Poshina D, Raik S, Urtti A, Skorik YA (2020) Polysaccharides in ocular drug delivery. *Pharmaceutics* 12(1): 22. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12010022>
72. Oliveira AV, Marcelo A, da Costa AM, Silva GA (2016) Evaluation of cystamine-modified hyaluronic acid/chitosan polyplex as retinal gene vector. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 58: 264–272. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.047>
73. Abdullah S, Wendy-Yeo WY, Hosseinkhani H, Hosseinkhani M, Masrawa E, Ramasamy R, Rosli R, Rahman SA, Domb AJ (2010) Gene transfer into the lung by nanoparticle dextran-spermine/plasmid DNA complexes. *J Biomed Biotechnol* 2010: 284840. <https://doi.org/10.1155/2010/284840>
74. Onishi Y, Eshita Y, Murashita A, Mizuno M, Yoshida J (2007) Characteristics of DEAE-dextran-MMA graft copolymer as a nonviral gene carrier. *Nanomedicine* 3(3): 184–191. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2007.07.002>
75. Kasper JC, Schaffert D, Ogris M, Wagner E, Friess W (2011) Development of a lyophilized plasmid/LPEI polyplex formulation with long-term stability – A step closer from promising technology to application. *J Control Release* 151(3): 246–255. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.01.003>
76. Raemdonck K, Martens TF, Braeckmans K, Demeester J, De Smedt SC (2013) Polysaccharide-based nucleic acid nanoformulations. *Adv Drug Deliv Rev* 65(9): 1123–1147. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.05.002>
77. Loftsson T, Stefánsson E (2017) Cyclodextrins and topical drug delivery to the anterior and posterior segments of the eye. *Int J Pharm* 531(2): 413–423. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.04.010>
78. Tanito M, Hara K, Takai Y, Matsuoka Y, Nishimura N, Jansook P, Loftsson T, Stefánsson E, Ohira A (2011) Topical dexamethasone-cyclodextrin microparticle eye drops for diabetic macular edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52(11): 7944–7948. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-8178>
79. Prajapati M, Christensen G, Paquet-Durand F, Loftsson T (2021) Cytotoxicity of β -Cyclodextrins in Retinal Explants for Intravitreal Drug Formulations. *Molecules* 26(5): 1492. <https://doi.org/10.3390/molecules26051492>
80. Mao S, Sun W, Kissel T (2010) Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Adv Drug Deliv Rev* 62(1): 12–27. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.08.004>
81. Roy K, Ghosn B, Kasturi SP (2008) Enhancing polysaccharide-mediated delivery of nucleic acids through functionalization with secondary and tertiary amines. *Curr Top Med Chem* 8(4): 331–340. <https://doi.org/10.2174/156802608783790947>
82. Badazhkova VD, Raik SV, Polyakov DS, Poshina DN, Skorik YA (2020) Effect of Double Substitution in Cationic Chitosan Derivatives on DNA Transfection Efficiency. *Polymers* 12(5): 1057. <https://doi.org/10.3390/polym12051057>
83. Mitra RN, Han Z, Merwin M, Al Taai M, Conley SM, Naash MI (2014) Synthesis and characterization of glycol chitosan DNA nanoparticles for retinal gene delivery. *ChemMedChem* 9(1): 189. <https://doi.org/10.1002/cmde.201300371>
84. Jin J, Zhou KK, Park K, Hu Y, Xu X, Zheng Z, Tyagi P, Kompella UB, Ma JX (2011) Anti-inflammatory and antiangiogenic effects of nanoparticle-mediated delivery of a natural angiogenic inhibitor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52(9): 6230–6237. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-6229>
85. Puras G, Zarate J, Diaz-Tahoces A, Marcelino AT, Fernández E, Pedraz JL (2013) Oligochitosan polyplexes as carriers for retinal gene delivery. *Eur J Pharm Sci* 48(1–2): 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.11.009>
86. Критченков АС, Andranovits S, Skorik ЮА (2017) Хитозан и его производные: векторы в генной терапии. *Успехи химии* 86(3): 231–239. [Kritchenkov AS, Andranovits S, Skorik YuA (2017) Chitosan and its derivatives: vectors in gene therapy. *Russ Chem Rev* 86(3): 231–239. (In Russ)]. <https://doi.org/10.1070/RCR4636>
87. Makadia HK, Siegel SJ (2011) Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers* 3(3): 1377–1397. <https://doi.org/10.3390/polym3031377>

88. *Semete B, Booyesen L, Lemmer Y, Kalombo L, Katata L, Verschoor J, Swai HS* (2010) In vivo evaluation of the biodistribution and safety of PLGA nanoparticles as drug delivery systems. *Nanomedicine* 6(5): 662–671.
<https://doi.org/10.1016/j.nano.2010.02.002>
89. *Thackaberry EA, Farman C, Zhong F, Lorget F, Staflin K, Cercillieux A, Miller PE, Schuetz C, Chang D, Famili A, Daugherty AL, Rajagopal K, Bantsev V* (2017) Evaluation of the toxicity of intravitreally injected PLGA microspheres and rods in monkeys and rabbits: effects of depot size on inflammatory response. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 58(10): 4274–4285.
<https://doi.org/10.1167/jovs.16-21334>
90. *Kim IS, Lee SK, Park YM, Lee YB, Shin SC, Lee KC, Oh IJ* (2005) Physicochemical characterization of poly (L-lactic acid) and poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles with poly-ethylenimine as gene delivery carrier. *Int J Pharm* 298(1): 255–262.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.04.017>
91. *Tahara K, Sakai T, Yamamoto H, Takeuchi H, Kawashima Y* (2008) Establishing chitosan coated PLGA nanosphere platform loaded with wide variety of nucleic acid by complexation with cationic compound for gene delivery. *Int J Pharm* 354(1-2): 210–216.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.11.002>
92. *Panyam J, Zhou WZ, Prabha S, Sahoo SK, Labhasetwar V* (2002) Rapid endo-lysosomal escape of poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. *FASEB J* 16(10): 1217–1226.
<https://doi.org/10.1096/fj.02-0088com>
93. *Zhang C, Wang Y-S, Wu H, Zhang Z-X, Cai Y, Hou H-Y, Zhao W, Yang X-M, Ma J-X* (2010) Inhibitory efficacy of hypoxia-inducible factor 1 α short hairpin RNA plasmid DNA-loaded poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles on choroidal neovascularization in a laser-induced rat model. *Gene Ther* 17(3): 338–351.
<https://doi.org/10.1038/gt.2009.158>
94. *Shen J, Kim J, Tzen SY, Ding K, Hafiz Z, Long D, Wang J, Gree JJ, Campochia PA* (2020) Suprachoroidal gene transfer with nonviral nanoparticles. *Sci Adv* 6(27): eaba1606.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.aba1606>
95. *Chaplot SP, Rupenthal ID* (2014) Dendrimers for gene delivery—a potential approach for ocular therapy? *J Pharm Pharmacol* 66(4): 542–556.
<https://doi.org/10.1111/jphp.12104>
96. *Eichman JD, Bielinska AU, Kukowska-Latallo JF, Baker JR Jr* (2000) The use of PAMAM dendrimers in the efficient transfer of genetic material into cells. *Pharm Sci Technol Today* 3: 232–245.
[https://doi.org/10.1016/s1461-5347\(00\)00273-x](https://doi.org/10.1016/s1461-5347(00)00273-x)
97. *Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP* (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7297–7301.
<https://doi.org/10.1073/pnas.92.16.7297>
98. *Albertazzi L, Gherardini L, Brondi M, Sulis Sato S, Bifone A, Pizzorusso T, Ratto GM, Bardi G* (2013) In vivo distribution and toxicity of PAMAM dendrimers in the central nervous system depend on their surface chemistry. *Mol Pharm* 10: 249–260.
<https://doi.org/10.1021/mp300391v>
99. *Rudolph C, Lausier J, Naundorf S, Muller RH, Rosenecker J* (2000) In vivo gene delivery to the lung using polyethylenimine and fractured polyamidoamine dendrimers. *J Gene Med* 2: 269–278.
<https://doi.org/10.2147/ijn.s4937>
100. *Liao HW, Yau KW* (2007) In vivo gene delivery in the retina using polyethylenimine. *Biotechniques* 42(3): 285–288.
<https://doi.org/10.2144/000112404>
101. *Tarakanchikova Y, Muslimov A, Sergeev I, Lepik K, Yolshin N, Goncharenko A, Vasilyev K, Eliseev I, Bukatin A, Sergeev V, Pavlov S, Popov A, Meglinski I, Afanasiev B, Parakhonskiy B, Sukhorukov G, Gorin D* (2020) A highly efficient and safe gene delivery platform based on polyelectrolyte core–shell nanoparticles for hard-to-transfect clinically relevant cell types. *J Mater Chem B* 8(41): 9576–9588.
<https://doi.org/10.1039/d0tb01359e>
102. *Tarakanchikova Y, Alzubi J, Pennucci V, Follo M, Kochergin B, Muslimov A, Skovorodkin I, Vainio S, Antipina MN, Atkin V, Popov A, Meglinski I, Cathomen T, Cornu TI, Gorin DA, Sukhorukov GB, Nazarenko I* (2020) Biodegradable nanocarriers resembling extracellular vesicles deliver genetic material with the highest efficiency to various cell types. *Small* 16(3): 1904880.
<https://doi.org/10.1002/smll.201904880>
103. *Brodskaya AV, Timin AS, Gorshkov AN, Muslimov AR, Bondarenko AB, Tarakanchikova YV, Zbrodskaya YA, Baranovskaya IL, Il'inskaja EV, Sakhenberg EI, Sukhorukov GB, Vasin AV* (2018) Inhibition of influenza A virus by mixed siRNAs, targeting the PA, NP, and NS genes, delivered by hybrid microcarriers. *Antiviral Res* 158: 147–160.
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.08.003>
104. *Rotov AY, Sitnikova VS, Tarakanchikova YV, Muslimov AR, Firsov ML* (2020) Polymer nanocapsules as an instrument for targeted delivery into retinal cells. *Int Conference “Optogenet-*

- ics+ 2020” and the workshop on advanced methods of noninvasive control of neuronal activity: abstracts 49–51.
105. *Allen TM, Cullis PR* (2004) Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science* 303(5665): 1818–1822.
<https://doi.org/10.1126/science.1095833>
 106. *Honda M, Asai T, Oku N, Araki Y, Tanaka M, Ebihara N* (2013) Liposomes and nanotechnology in drug development: focus on ocular targets. *Int J Nanomed* 8: 495.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S30725>
 107. *Fishman PH, Peyman GA, Lesar T* (1986) Intravitreal liposome-encapsulated gentamicin in a rabbit model. Prolonged therapeutic levels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27(7): 1103–1106.
 108. *Peyman GA, Khoobehi B, Tawakol M, Schulman JA, Mortada HA, Alkan H, Fiscella R* (1987) Intravitreal injection of liposome-encapsulated ganciclovir in a rabbit model. *Retina* 7(4): 227–229.
<https://doi.org/10.1097/00006982-198707040-00005>
 109. *Akula SK, Ma PE, Peyman GA, Rahimy MH, Hyslop NE, Janney A, Ashton P* (1994) Treatment of cytomegalovirus retinitis with intravitreal injection of liposome encapsulated ganciclovir in a patient with AIDS. *Br J Ophthalmol* 78(9): 677–680.
<https://doi.org/10.1136/bjo.78.9.677>
 110. *Honda M, Asai T, Umamoto T, Araki Y, Oku N, Tanaka M* (2011) Suppression of choroidal neovascularization by intravitreal injection of liposomal SU5416. *Arch Ophthalmol* 129(3): 317–321.
<https://doi.org/10.1001/archophthalmol.2011.12>
 111. *Lajunen T, Hisazumi K, Kanazawa T, Okada H, Seta Y, Yliperttula M, Takashima Y* (2014) Topical drug delivery to retinal pigment epithelium with microfluidizer produced small liposomes. *Eur J Pharm Sci* 62: 23–32.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.04.018>
 112. *Masuda I, Matsuo T, Yasuda T, Matsuo N* (1996) Gene transfer with liposomes to the intraocular tissues by different routes of administration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37(9): 1914–1920.
 113. *Mandal A, Cholkar K, Khurana V, Shah A, Agrahari V, Bisht R, Pal D, Mitra AK* (2017) Topical formulation of self-assembled antiviral prodrug nanomicelles for targeted retinal delivery. *Mol Pharm* 14(6): 2056–2069.
<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00128>
 114. *Cholkar K, Gunda S, Earla R, Pal D, Mitra AK* (2015) Nanomicellar topical aqueous drop formulation of rapamycin for back-of-the-eye delivery. *AAPS PharmSciTech* 16(3): 610–622.
<https://doi.org/10.1208/s12249-014-0244-2>
 115. *Sahu B, Chug I, Khanna H* (2021) The Ocular Gene Delivery Landscape. *Biomolecules* 11(8): 1135.
<https://doi.org/10.3390/biom11081135>
 116. *Huang X, Chau Y* (2019) Investigating impacts of surface charge on intraocular distribution of intravitreal lipid nanoparticles. *Exp Eye Res* 186: 107711.
<https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.107711>
 117. *Amadio M, Pascale A, Cupri S, Pignatello R, Osera C, Leggio GM, Bucolo C* (2016) Nanosystems based on siRNA silencing HuR expression counteract diabetic retinopathy in rat. *Pharmacol Res* 111: 713–720.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.07.042>
 118. *Martens TF, Peynshaert K, Nascimento TL, Fattal E, Karlstetter M, Langmann T, Picaud S, De-meester J, De Smedt SC, Remaut K, Braeckmans K* (2017) Effect of hyaluronic acid-binding to lipoplexes on intravitreal drug delivery for retinal gene therapy. *Eur J Pharm Sci* 103: 27–35.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.02.027>
 119. *Ribeiro MC, de Miranda MC, Cunha PD, Andrade GF, Fulgêncio GD, Gomes DA, Fialho SL, Pittella F, Charrueau C, Escriou V, Silva-Cunha A* (2021) Neuroprotective Effect of siRNA Entrapped in Hyaluronic Acid-Coated Lipoplexes by Intravitreal Administration. *Pharmaceutics* 13(6): 845.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060845>
 120. *Jain AK, Gupta U* (2020) Nanomaterials Used for Delivery of Bioactives. In: *Nanomaterials and Environmental Biotechnology* 381–406. Springer Nature Switzerland AG.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-34544-0_19
 121. *Torrecilla J, Gómez-Aguado I, Vicente-Pascual M, del Pozo-Rodríguez A, Solinís MÁ, Rodríguez-Gascón A* (2019) MMP-9 downregulation with lipid nanoparticles for inhibiting corneal neovascularization by gene silencing. *Nanomaterials* 9(4): 631.
<https://doi.org/10.3390/nano9040631>
 122. *Apaolaza PS, del Pozo-Rodríguez A, Solinís MA, Rodríguez JM, Friedrich U, Torrecilla J, Weber BH, Rodríguez-Gascón A* (2016) Structural recovery of the retina in a retinoschisin-deficient mouse after gene replacement therapy by solid lipid nanoparticles. *Biomaterials* 90: 40–49.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.03.004>
 123. *Tkachenko AG, Xie H, Coleman D, Glomm W, Ryan J, Anderson MF, Feldheim DL* (2003) Multifunctional gold nanoparticle-peptide complexes for nuclear targeting. *J Am Chem Soc* 125(16): 4700–4701.
<https://doi.org/10.1021/ja0296935>

124. Ghosh P, Han G, De M, Kim CK, Rotello VM (2008) Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv Drug Deliv Rev* 60(11): 1307–1315. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.016>
125. McIntosh CM, Esposito EA, Boal AK, Simard JM, Martin T, Rotello VM (2001) Inhibition of DNA transcription using cationic mixed monolayer protected gold clusters. *J Am Chem Soc* 123(31): 7626–7629. <https://doi.org/10.1021/ja015556g>
126. Han G, Martin CT, Rotello VM (2006) Stability of gold nanoparticle bound DNA toward biological, physical, and chemical agents. *Chem Biol Drug Des* 67(1): 78–82. <https://doi.org/10.1021/ja015556g>
127. Oishi M, Nakaogami J, Ishii T, Nagasaki Y (2006) Smart PEGylated gold nanoparticles for the cytoplasmic delivery of siRNA to induce enhanced gene silencing. *Chem Lett* 35(9): 1046–1047. <https://doi.org/10.1246/cl.2006.1046>
128. Yang PH, Sun X, Chiu JF, Sun H, He QY (2005) Transferrin-mediated gold nanoparticle cellular uptake. *Bioconjug Chem* 16(3): 494–496. <https://doi.org/10.1021/bc049775d>
129. Kumar S, Aaron J, Sokolov K (2008) Directional conjugation of antibodies to nanoparticles for synthesis of multiplexed optical contrast agents with both delivery and targeting moieties. *Nat Protoc* 3(2): 314–320. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.1>
130. Sharma A, Tandon A, Tovey JC, Gupta R, Robertson JD, Fortune JA, Klibanov AM, Cowden JW, Rieger FG, Mohan RR (2011) Polyethylenimine-conjugated gold nanoparticles: Gene transfer potential and low toxicity in the cornea. *Nanomedicine* 7(4): 505–513. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.01.006>
131. Batabyal S, Kim S, Wright W, Mohanty S (2021) Layer-specific nanophotonic delivery of therapeutic opsin-encoding genes into retina. *Exp Eye Res* 205: 108444. <https://doi.org/j.exer.2021.108444>
132. Verbakel SK, van Huet RA, Boon CJ, den Hollander AI, Collin RW, Klaver CC, Hoyng CB, Roepman R, Klevering BJ (2018) Non-syndromic retinitis pigmentosa. *Prog Retin Eye Res* 66: 157–186. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2018.03.005>

Prospects of Synthetic Nanoparticles Application in Optogenetic Retinal Prosthetics

A. Yu. Rotov^{a, *}, I. S. Romanov^a, Y. V. Tarakanchikova^{b, c}, and L. A. Astakhova^a

^a *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, Saint-Petersburg, Russia*

^b *University of Oulu, Oulu, Finland*

^c *Alferov Saint-Petersburg National Research Academic University, Saint-Petersburg, Russia*

*e-mail: rotovau@gmail.com

Optogenetic prosthetics is an approach to restore the visual function in degenerative retina. It implies the delivery of genes encoding light-sensitive proteins to retinal cells that have survived degeneration, primarily bipolar and ganglion cells. As a result, they turn into “pseudophotoreceptors” and can take on the function of rods and cones that have been lost during disease. The key element in the optogenetic prosthetics procedure is a vector that delivers exogenous DNA to the retinal cells’ nucleus. There are two main categories of vectors: viral and synthetic ones. The latter include nanoparticles based on various polymers, lipids and metals. It was previously suggested that viruses transfect living cells more efficiently than synthetic particles through specialized delivery mechanisms for genetic material transfer. However, to date, there have been developed nanoparticles that can effectively penetrate tissue barriers, enter intracellular space and successfully deliver nucleic acid molecules to the cell nucleus. This review describes modern approaches to the development of nanocarriers, and formulates the main requirements for their physicochemical properties which provide the most efficient delivery of genetic material through the intraocular barrier structures into bipolar and ganglion cells. Based on the literature data, several types of nanoparticles were selected that are most promising for use in the optogenetic retinal prosthetics.

Keywords: retina, intraocular injections, optogenetic prosthetics, synthetic nanoparticles, DNA delivery

БИОЭЛЕКТРИЧЕСКИЙ ИМПЕДАНС МИОКАРДА И ПЕЧЕНИ У КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ДОКСОРУБИЦИНА

© 2021 г. Н. Л. Коломеец¹, *, О. В. Сулонова¹, С. Л. Смирнова¹,
Е. А. Пешкин¹, И. М. Рощевская²

¹Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук, Сыктывкар, Россия

²Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова, Москва, Россия

*e-mail: kolomeec@frc.komisc.ru

Поступила в редакцию 29.06.2021 г.

После доработки 26.07.2021 г.

Принята к публикации 26.07.2021 г.

Выявлены изменения биоэлектрического импеданса миокарда и печени у самцов крыс линии Вистар при хроническом воздействии доксорубицина. Многочастотные биоимпедансные и эхокардиографические исследования проведены до и спустя два месяца после первой инъекции доксорубицина (кумулятивная доза 10 мг/кг, разделенная на 4 инъекции в течение 4-ех недель) или физиологического раствора; гистологические исследования миокарда левого желудочка сердца и печени – в конце эксперимента. Спустя два месяца после первой инъекции доксорубицина у 56% животных наблюдали снижение фракции выброса левого желудочка сердца на $13 \pm 2\%$. В миокарде левого желудочка сердца у 33% крыс, получавших доксорубицин, гистологически выявлены кровоизлияние, внутри- и межклеточная вакуолизация. Показаны морфологические изменения печени у всех крыс, подверженных хроническому воздействию доксорубицина. У крыс, получавших доксорубицин, изменение зависимости активного сопротивления биоэлектрического импеданса сердца и печени от частоты тока, статистически значимое уменьшение отношения сопротивлений при низкой и высокой частоте в сравнении с контрольными животными указало на накопление межклеточной жидкости, вызванное нарушением микроциркуляции, повреждениями клеточных мембран сосудов. Морфологические изменения миокарда и печени (гистологически подтвержденные) привели к меньшим абсолютным значениям фазового угла (миокарда и печени) и реактивного сопротивления (печени) биоэлектрического импеданса по сравнению с контрольными животными. Обнаружена статистически значимая зависимость между фазовым углом биоэлектрического импеданса миокарда при высоких частотах тока и толщиной свободной стенки левого желудочка сердца. Меньшее внеклеточное сопротивление биоэлектрического импеданса печени у крыс, получавших доксорубицин, по сравнению с контрольными животными свидетельствует о расширении пространства между гепатоцитами, разрушении клеток.

Ключевые слова: доксорубицин, биоэлектрический импеданс печени и миокарда

DOI: 10.31857/S0869813921110054

Антрациклины считаются важным классом лекарств при лечении рака, включая лейкоз, лимфому и рак молочной железы, но также остаются проблемными химиотерапевтическими средствами, учитывая их кардиотоксические эффекты. Одним из факторов, определяющих развитие сердечной недостаточности, является куму-

лятивная доза лекарства [1]. На результаты лечения пациентов в онкологическом отделении значительное влияние также оказывает дисфункция печени [2]. Для снижения риска кардио- и гепатоксичности, вызванной антрациклинами, необходимо тщательное наблюдение за пациентами. Необходимо изучение механизмов развития дисфункции печени и нарушения деятельности сердца в эксперименте на животных.

Биоимпедансные обследования онкологических пациентов использовали для быстрой оценки изменения параметров состава тела (выраженности отека, количества жировой и мышечной ткани) в динамике химиотерапии [3], прогноза выживаемости [4]. У пациентов на поздней стадии сердечной недостаточности применение биоимпедансного метода не вызвало нарушения ритма сердца во время измерений, что позволило предположить его безопасность [5].

Неинвазивное измерение биоэлектрического импеданса тела человека и животных имеет ограничения в диагнозе патологических изменений. Прямое измерение электрического сопротивления ткани миокарда [6], печени [7] поможет оценить морфофункциональные изменения при развитии патологических процессов.

Поскольку доксорубин вызывает токсическое повреждение клеток миокарда, сосудов, печени [8–11], можно предполагать изменение компонентов биоэлектрического импеданса живой ткани, характеризующих кровоснабжение ткани и состояние клеточных и внутриклеточных мембран.

Цель работы – исследовать показатели биоэлектрического импеданса миокарда и печени крыс при хроническом воздействии доксорубина в эксперименте, выявить зависимость биоэлектрических показателей от морфофункционального состояния органов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на самцах крыс линии Вистар (14 особей) массой тела 335.6 ± 21.6 г, в возрасте 4-ех месяцев, полученных из питомника лабораторных животных (Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар, Россия). Животных содержали в условиях свободного доступа к водопроводной питьевой воде и корму в помещении с естественно-искусственным освещением. Крысы находились в вентилируемых клетках группами по 2–3 особи при температуре 20–22°C на подстилке из древесных стружек.

Все процедуры, выполненные в исследовании, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям комиссии по биоэтике Отдела сравнительной кардиологии Федерального исследовательского центра “Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук”.

Первую группу (опытную) составили 9 животных, которым внутрибрюшинно вводили доксорубинор (Teva, Россия) в кумулятивной дозе 10 мг/кг, растворенной в физиологическом растворе (0.9%-ный раствор NaCl, 5 мл/кг), разделенной на 4 инъекции в течение 4-ех недель. Крысам второй группы (контрольной, $n = 5$) вводили аналогичную дозу физиологического раствора.

До (исходное состояние) и спустя два месяца после первой инъекции препарата проводили эхокардиографическое исследование (ЭхоКГ), измерения биоэлектрического импеданса тела крыс тетраполярным методом.

Для седации при ЭхоКГ, при исследовании и измерении биоэлектрического импеданса тела использовали золетил (Zoletil, Вирбак, Франция, 3.5 мг/100 г массы тела, внутримышечно). При проведении острого эксперимента со вскрытием грудной клетки животного использовали наркоз с сочетанием золетила (3.5 мг/100 г массы тела, внутримышечно) и уретана (650 мг/кг массы тела, внутрибрюшинно).

Крысам перед вскрытием грудной клетки проводили трахеотомию, и переводили животных на искусственное дыхание с использованием аппарата SAR-830/AP (CWE Inc., США). Частота дыхания составляла 60 дыханий в мин, дыхательный объем подбирали индивидуально.

Измеряли длину тела крыс без хвоста (L) в см. Индекс массы тела вычисляли как отношение массы тела (г) к квадрату длины тела L (см²). Массу тела крыс определяли с помощью лабораторных электронных весов EK 2000i (AND, Япония, точность 0.1 г).

ЭхоКГ-исследование проводили с использованием ультразвуковой системы Logiq Pro (General Electric, США) с линейным датчиком 10 МГц в М-режиме. Показатель сократимости левого желудочка сердца – фракцию выброса – высчитывали по формуле Тейхольца [12].

Многочастотный биоэлектрический импеданс органов и тканей тела измеряли при помощи анализатора физических свойств материалов и веществ 126094W (Solartron Analytical, Великобритания). Полученные измерения отражали усредненную во времени (в течение 4-ех с) характеристику электрического сопротивления.

Биоэлектрический импеданс тела измеряли при помощи игольчатых электродов из нержавеющей стали, которые размещали согласно рекомендациям [13], предложенным для оценки состава тела у крысы. Расстояние между измеряющими электродами составило 11 см.

Измерение электрического импеданса тканей и органов проводили на эпикарде в медиальной части вентральной поверхности свободной стенки левого желудочка сердца; на поверхности печени спустя два месяца после первой инъекции препарата. Использовали датчик с медными электродами (диаметр 0.1 мм, длина контакта ~1 мм), расстояние между измеряющими электродами 1.5 мм, токовыми – 4.5 мм.

При значительном расстоянии между электродами в сравнении с толщиной миокарда электрический ток охватывает существенную долю толщины стенки левого желудочка сердца, минимизируется влияние анизотропии ткани (ориентации волокон в слоях миокарда) на измерения сопротивления миокарда [14].

По окончании эксперимента сердце и печень вырезали. Массу органов определяли с помощью лабораторных электронных весов EK 2000i (AND, Япония, точность 0.1 г).

Вычисляли изменение фракции выброса левого желудочка сердца относительно исходного значения по формуле: $100 \times (EF_1 - EF_0)/EF_0$, где EF_0 – исходное значение фракции выброса, EF_1 – значение спустя два месяца после первой инъекции доксорубина.

Сравнивали изменения компонентов биоэлектрического импеданса тела крыс опытной и контрольной групп: активного (R/L) и реактивного сопротивления (Im/L), амплитуды (Z/L), нормированных на длину тела, фазового угла (ϕ) при девяти частотах тока в диапазоне от 10 до 200 кГц относительно исходных значений.

Сравнивали значения компонентов биоэлектрического импеданса миокарда и печени у крыс опытной и контрольной групп при восьми частотах тока в диапазоне от 10 до 150 кГц.

Выбранный частотный диапазон (из диапазона β -дисперсии) характеризуется резким частотным градиентом, свойственным живым тканям [15], используется при измерениях импеданса для оценки гемодинамики, изменения объема внеклеточной жидкости [16]. Нарушение целостности клеток при введении кумулятивной дозы доксорубина может привести к изменению частотной зависимости биоэлектрического импеданса миокарда и печени.

Вычисляли отношение биоэлектрического импеданса миокарда и печени, измеренных при двух частотах: $Z_{30} \setminus Z_{100}$, $R_{10} \setminus R_{20}$ и $R_{10} \setminus R_{100}$, характеризующего крутизну

дисперсии сопротивления (уменьшения сопротивления с увеличением частоты тока) живой ткани.

Используя алгоритм аппроксимации данных (годографа) дугой окружности [17], вычисляли параметры модели Коула: внеклеточное ($R_e = R_0$) и внутриклеточное сопротивление ($R_i = R_0 R_\infty / (R_0 - R_\infty)$). Определяли оценки суммарного объема воды и объема внеклеточной жидкости тела крыс согласно рекомендациям [18].

Изготавливали поперечные гистологические срезы миокарда и печени толщиной 7 мкм на санном микротоме МС-2, срезы окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике и фотографировали цифровой камерой-окуляром (DCM500, Бельгия). По гистологическим срезам оценивали толщину свободной стенки левого желудочка сердца в медиальной ее части.

Статистическая обработка проведена с помощью пакета программ статистического анализа Statistica 10.0. Для проверки нормальности распределения количественных признаков использовали критерий Шапиро–Уилка. Равенство дисперсий распределений признаков в группах проверяли по критерию Левена. Нормально распределенные количественные признаки представлены как среднее арифметическое \pm стандартное отклонение. При распределении, не соответствующем нормальному, величины описаны при помощи медианы Me и межквартильного размаха ($Q1-Q3$). Уровень значимости различий принимали равным 0.05. Сравнения двух групп из совокупностей с нормальным распределением проводили с помощью t -критерия Стьюдента, отличающихся от нормального распределения – по критерию Манна–Уитни или Вилкоксона. Для выявления различия биоэлектрического импеданса сердца и печени на множестве частот тока использовали однофакторный дисперсионный анализ для повторных измерений или многомерный дисперсионный анализ (критерий Пиллая) с последующей процедурой апостериорного сравнения средних (по критерию Бонферрони или Тьюки в зависимости от числа сравнений) или критерий Манна–Уитни с корректировкой уровня статистической значимости при множественных сравнениях по формуле $p = 1 - 0.95^{1/n}$. Для анализа воздействия доксорубина на изменение массы тела опытных крыс проводили дисперсионный анализ для повторных измерений. Корреляционный анализ (для всей выборки крыс) проводили по критерию Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изменения функции левого желудочка сердца

У крыс, получавших доксорубин, наблюдали статистически значимое уменьшение фракции выброса левого желудочка сердца (рис. 1) с 91.5 (91.0, 92.1)% до 82.8 (78.5, 87.0)% ($T = 3$, $Z = 3.0$, $p = 0.003$, критерий Вилкоксона). У крыс контрольной группы фракция выброса левого желудочка сердца практически не изменилась и составила исходно 91.1 (90.3, 94.1)% и в конце эксперимента – 89.5 (89.1, 91.1)%.

У 44% крыс опытной группы изменение фракции выброса левого желудочка сердца относительно исходного значения статистически значимо не отличалось от такового у крыс контрольной группы ($-3 \pm 5\%$ и $-2 \pm 4\%$ соответственно). У 56% крыс опытной группы фракция выброса левого желудочка сердца статистически значимо уменьшилась с 91.7 (91.0, 92.1)% до 78.5 (77.8, 80.5)% ($T = 0$, $Z = 2.0$, $p = 0.043$, критерий Вилкоксона); изменение фракции выброса левого желудочка сердца относительно исходного значения по сравнению с контрольными животными статистически значимо больше ($-13 \pm 2\%$ и $-2 \pm 4\%$ соответственно, $t = 5.2$, $ss = 7$, $p = 0.001$).

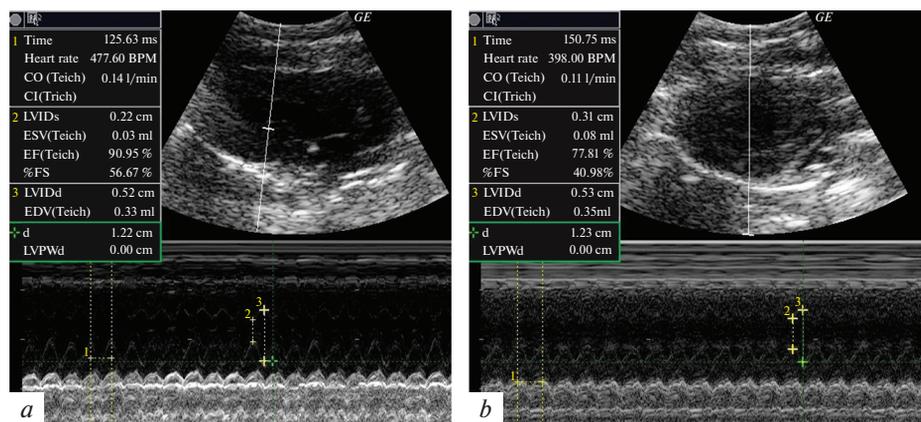


Рис. 1. ЭхоКГ сердца в М-режиме у крысы (№ 9, подгруппа 56%) из опытной группы в начале (а) и в конце (б) эксперимента.

Масса тела, сердца, печени

На массу тела крыс оказывал влияние временной фактор ($F_{1,11} = 66.5, p < 0.001$) и сочетание временного изменения и воздействия доксорубицина ($F_{1,11} = 7.9, p = 0.017$). У крыс опытной группы масса тела за период эксперимента статистически значительно увеличилась с 334.7 ± 22.1 до 366.8 ± 18.5 г ($p = 0.003$, критерий Бонферрони), у контрольных крыс – с 335.8 ± 26.3 до 401.5 ± 22.4 г ($p < 0.001$, критерий Бонферрони). Выявлены значимые межгрупповые различия в изменении массы ($U = 4.0, Z = -2.1, p = 0.037$) и длины тела ($t = -3.1, ss = 11, p = 0.01$), обхвата грудной клетки ($t = -3.7, ss = 11, p = 0.004$) у крыс контрольной (на 20 (18, 22)%, $9 \pm 2\%$ и $9 \pm 3\%$ соответственно) и опытной (на 9 (5, 14)%, $1 \pm 5\%$ и $-3 \pm 6\%$ соответственно) групп относительно исходного значения.

Масса сердца у контрольных и опытных животных не различалась (1.1 (1.1, 1.2) г). Выявлена большая масса печени у опытных крыс (14.1 ± 1.9 г) по сравнению с контрольными животными (11.0 ± 0.3 г; $t = 3.2, ss = 11, p = 0.008$). Относительные массы сердца, печени у опытных крыс были статистически значительно больше, чем у контрольных животных (табл. 1).

Результаты биоимпедансного исследования

Выявлены статистически значимые различия ($F_{4,7} = 8.5, p = 0.028$) фазового угла биоэлектрического импеданса миокарда (при частотах 10, 15, 20, 30, 50, 100 и

Таблица 1. Относительные массы сердца и печени у опытных и контрольных животных

Наименование показателя	Значение показателя, г/кг		Значение статистического теста и достигнутого уровня статистической значимости
	опытная группа	контрольная группа	
Относительная масса сердца	3.1 ± 0.1	2.9 ± 0.2	$t = 2.3, ss = 11, p = 0.042$
Относительная масса печени	38.6 ± 5.5	27.5 ± 1.7	$t = 3.8, ss = 11, p = 0.003$

Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Указаны статистически значимые различия показателей у опытных и контрольных крыс.

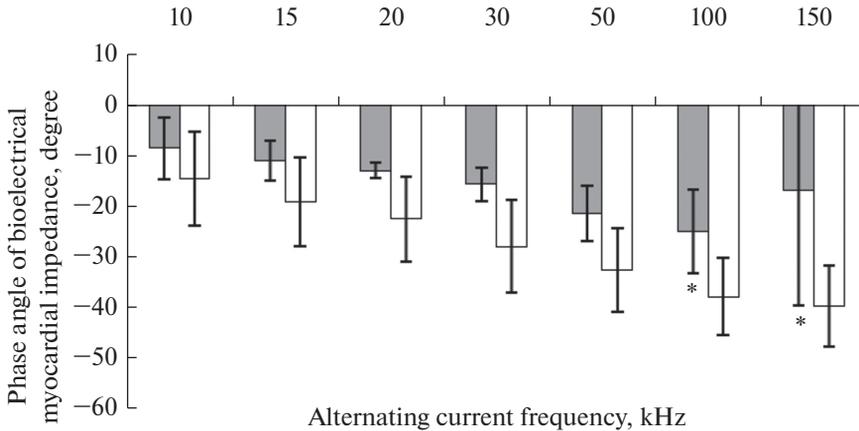


Рис. 2. Фазовый угол биоэлектрического импеданса миокарда у крыс опытной (серые столбики) и контрольной (белые столбики) групп. * – $p < 0.05$.

150 кГц тока) у крыс опытной и контрольной групп. Абсолютные значения фазового угла биоэлектрического импеданса миокарда у опытных крыс были ниже значений у контрольных крыс при 100 ($25.0 \pm 8.2^\circ$ и $38.0 \pm 7.6^\circ$, $p = 0.04$, критерий Тьюки) и 150 кГц ($17.1 \pm 22.7^\circ$ и $39.8 \pm 8.0^\circ$, $p = 0.047$, критерий Тьюки) электрического тока (рис. 2). Существенно меньшие абсолютные значения фазового угла (на 42–59% относительно средних значений, $p < 0.003$, критерий Стьюдента) биоэлектрического импеданса миокарда наблюдали у 56% крыс опытной группы в сравнении с крысами контрольной группы при частотах 30–100 кГц тока. У остальных 44% крыс опытной группы не выявлено различий фазового угла биоэлектрического импеданса миокарда по сравнению с контрольными крысами. В подгруппах опытных крыс не обнаружено значимых различий в изменении фракции выброса левого желудочка сердца относительно исходного значения.

Обнаружена статистически значимая зависимость между абсолютным значением фазового угла биоэлектрического импеданса миокарда при 100 кГц ($r_s = 0.6$, $p = 0.029$), 150 кГц ($r_s = 0.9$, $p = 0.005$) и толщиной свободной стенки левого желудочка сердца.

Активное сопротивление биоэлектрического импеданса миокарда не различалось у крыс опытной и контрольной групп; при низких частотах (10, 15 кГц) среднее значение показателя было ниже, а при высоких (начиная с 20 кГц) – выше у опытных крыс в сравнении с контрольными. Выявлено меньшее отношение значений сопротивления миокарда у опытных крыс в сравнении с контрольными животными при двух частотах тока: $Z_{30} \setminus Z_{100}$ (1.4 ± 0.2 и 1.7 ± 0.3 , $t = -2.5$, $ss = 20$, $p = 0.021$) и $R_{10} \setminus R_{100}$ (1.9 ± 0.5 и 3.0 ± 1.3 , $t = -2.3$, $ss = 14$, $p = 0.04$).

Отмечены межгрупповые различия ($F_{1,10} = 13.1$, $p = 0.005$), влияние фактора частоты тока ($F_{1,10} = 25.4$, $p < 0.001$) и сочетание факторов частота тока\группа ($F_{1,10} = 10.9$, $p = 0.008$) на величину реактивного сопротивления биоэлектрического импеданса печени (при 50 и 70 кГц тока) у крыс двух групп. Абсолютное значение реактивного сопротивления биоэлектрического импеданса печени было меньше у опытных крыс в сравнении с контрольными крысами при 50 кГц (258.4 ± 79.2 Ом и 527.2 ± 161.0 Ом, $p = 0.011$, критерий Бонферрони) электрического тока.

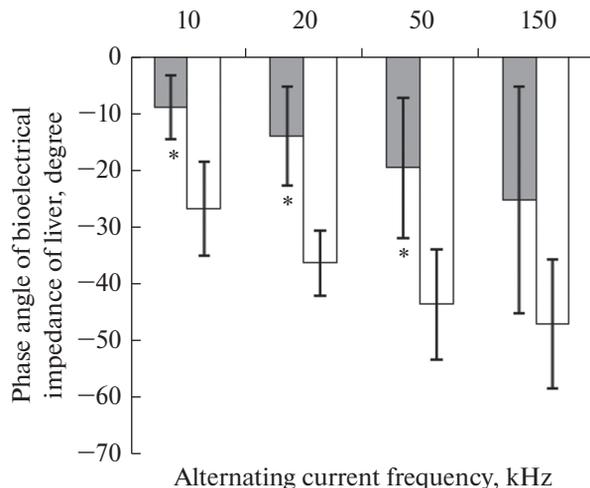


Рис. 3. Фазовый угол биоэлектрического импеданса печени у крыс опытной (серые столбики) и контрольной (белые столбики) групп. * – $p < 0.05$.

Установлена обратная корреляционная связь абсолютного значения реактивного сопротивления биоэлектрического импеданса печени при 50 кГц ($r_s = -0.6$, $p = 0.026$) и 70 кГц ($r_s = -0.7$, $p = 0.013$) с массой печени.

Показаны межгрупповые различия ($F_{4,6} = 9.3$, $p = 0.01$) фазового угла биоэлектрического импеданса печени (при 10, 20, 50 и 150 кГц тока). Выявлено меньшее абсолютное значение фазового угла биоэлектрического импеданса печени у опытных крыс в сравнении с контрольными животными при частоте 10 кГц ($9.1 \pm 5.6^\circ$ и $26.9 \pm 8.3^\circ$, $p = 0.003$, критерий Тьюки), 20 кГц ($14.2 \pm 8.7^\circ$ и $36.5 \pm 5.8^\circ$, $p = 0.001$, критерий Тьюки) и 50 кГц ($19.8 \pm 12.2^\circ$ и $43.8 \pm 9.6^\circ$, $p = 0.008$, критерий Тьюки) электрического тока (рис. 3).

Между абсолютным значением фазового угла биоэлектрического импеданса печени и массой печени наблюдали статистически значимую взаимосвязь, наиболее сильную при частоте тока 20 кГц ($r_s = -0.9$, $p < 0.001$).

Активное сопротивление биоэлектрического импеданса печени не различалось у крыс опытной и контрольной групп; при 10 кГц среднее значение сопротивления было ниже, а при остальных частотах было выше у опытных крыс в сравнении с контрольными. Выявлено меньшее отношение значений сопротивления печени у опытных крыс в сравнении с контрольными при двух частотах тока: Z_{30}/Z_{100} (1.4 ± 0.3 и 1.9 ± 0.3 , $t = -2.7$, $ss = 11$, $p = 0.021$) и R_{10}/R_{20} (1.2 ± 0.1 и 1.5 ± 0.2 , $t = -4.6$, $ss = 10$, $p = 0.001$). Обнаружена статистически значимая зависимость между отношением значений сопротивления печени R_{10}/R_{20} ($r_s = 0.9$, $p < 0.001$) и массой печени.

Выявлено меньшее внеклеточное сопротивление биоэлектрического импеданса печени у опытных крыс (1280.6 ± 546.5 Ом, $t = -2.7$, $ss = 10$, $p = 0.024$) в сравнении с контрольными (2312.7 ± 802.4 Ом).

Медиана активного сопротивления биоэлектрического импеданса тела крыс обеих групп уменьшилась к концу эксперимента при всех частотах; у крыс опытной группы наблюдали меньшие изменения сопротивления тела (не более 6%) по сравнению с крысами контрольной группы (6–14%). Обнаружена значимая взаимосвязь между изменениями активного сопротивления биоэлектрического импе-

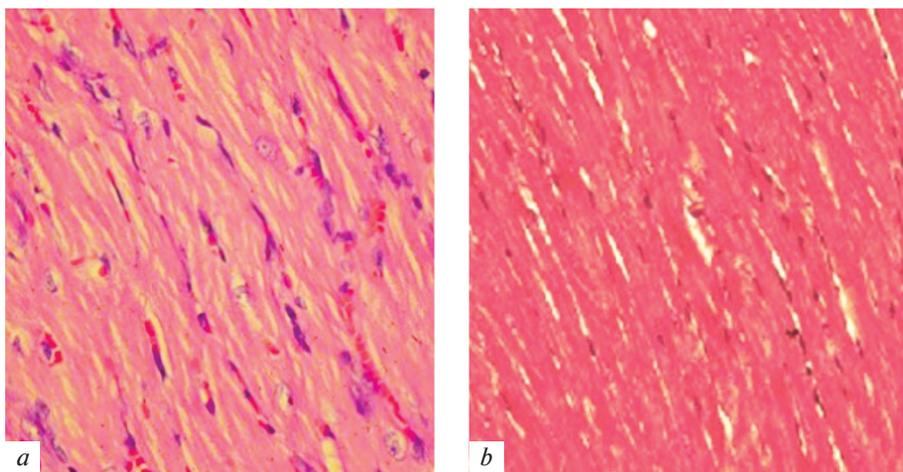


Рис. 4. Гистологические срезы миокарда свободной стенки левого желудочка сердца ($\times 400$) у крыс через два месяца хронического воздействия доксорубина (*a*) и контрольной группы (*b*). На срезе (*a*) наблюдаются кровоизлияния, внутри- и межклеточная вакуолизация.

данса тела крыс и массы тела (наиболее сильная при 10 кГц: $r_S = -0.6$, $p = 0.009$), обхвата грудной клетки (наиболее сильная при 70 кГц: $r_S = -0.7$, $p = 0.003$) в период эксперимента.

Выявлено меньшее изменение фазового угла биоэлектрического импеданса тела ($t = -2.5$, $ss = 16$, $p = 0.022$) в период эксперимента у крыс опытной группы (на $10 \pm 14\%$, $t = 2.7$, $p = 0.019$) в сравнении с крысами контрольной группы (на $27 \pm 9\%$, $t = 6.9$, $p = 0.002$) при 80 кГц тока. Существенно меньшее изменение (на $1 \pm 7\%$, $t = -5.7$, $p < 0.001$) абсолютного значения фазового угла биоэлектрического импеданса миокарда при 80 кГц тока наблюдали у 67% крыс опытной группы в сравнении с крысами контрольной группы. Меньшее увеличение абсолютного значения фазового угла биоэлектрического импеданса тела сопутствует большему уменьшению фракции выброса (при 80 кГц: $r_S = -0.5$, $p = 0.042$; при 30 кГц: $r_S = -0.5$, $p = 0.048$) к концу эксперимента у крыс опытной группы в сравнении с крысами контрольной группы.

Не было выявлено статистически значимых межгрупповых различий в изменении оцениваемых нами объемов внеклеточной жидкости, суммарного объема воды в теле крыс и их отношения.

Гистологическая картина миокарда

Спустя два месяца после первой инъекции доксорубина у 33% крыс опытной группы выявлено увеличение полости левого желудочка. В миокарде левого желудочка сердца у 33% крыс опытной группы были обнаружены кровоизлияние, внутри- и межклеточная вакуолизация, очаги мононуклеарной инфильтрации (рис. 4*a*).

У остальных крыс опытной группы не обнаружено явных гистопатологических изменений в миокарде.

Толщины передней части свободной стенки левого желудочка сердца, измеренные по гистологическим срезам, у опытных и контрольных животных не различались (4.8 ± 0.7 и 4.7 ± 0.2 мм соответственно).

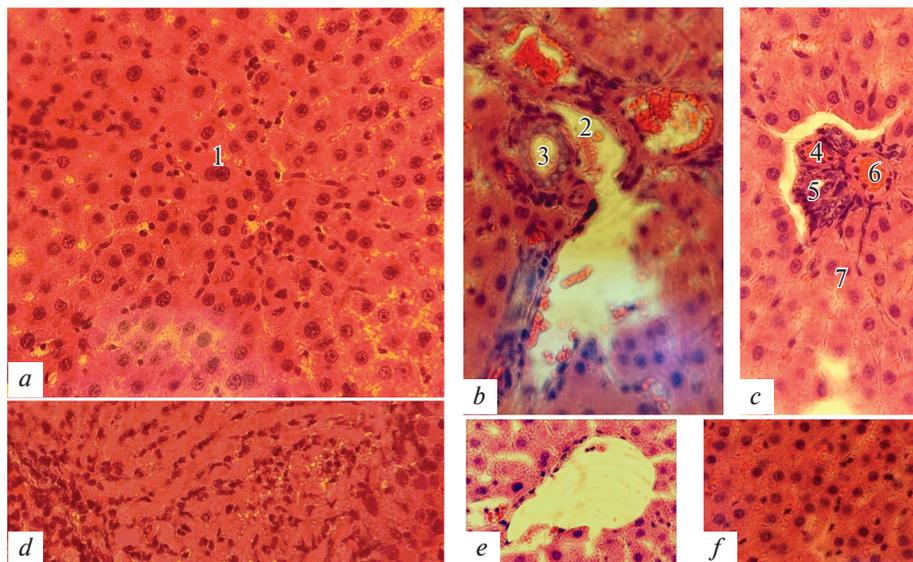


Рис. 5. Гистологическая картина печени ($\times 400$) у крыс опытной (*a–e*) и контрольной (*f*) групп. На фотографиях указано: (*a*) лимфоцитарная инфильтрация, двуядерные гепатоциты (1); (*b*) портальный тракт (2), отек сосудов, слабая лимфоцитарная инфильтрация, строма не склерозирована, эпителий мелких желчных протоков с вакуольной дистрофией (3); (*c*) портальная артерия (4), эпителиоциты желчного протока с вакуолизированной цитоплазмой (5), портальная вена (6), неполнокровные синусоиды (7) между гепатоцитами; (*d*) субкапсулярный некроз гепатоцитов; (*e*) печеночная долька с отеком пространства Диссе.

Гистологическая картина печени

Спустя два месяца после первой инъекции доксорубина в печени крыс опытной группы наблюдалась слабая или умеренная лимфоцитарная инфильтрация отдельных портальных трактов с проникновением в печеночные дольки, вакуолизация гепатоцитов, отек пространства Диссе. У 22% крыс отмечена выраженная инфильтрация с проникновением лимфоцитов в межлобочечное пространство, появление 2-ядерных гепатоцитов, субкапсулярный некроз гепатоцитов, зернистая дистрофия печеночных клеток, вакуольная дистрофия эпителия мелких желчных протоков, неравномерное кровенаполнение сосудов (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами было отмечено статистически значимое снижение фракции выброса левого желудочка сердца в среднем на 13% у 56% крыс, получавших доксорубин (у остальных не было функциональных изменений сократительной функции левого желудочка сердца). Гистологически у крыс с хроническим воздействием доксорубина обнаружены морфологические изменения в миокарде левого желудочка сердца и печени, нарушение кровообращения в микрососудах.

Доксорубин вызывает структурное повреждение сосудов, нарушение микроциркуляции и снижение перфузии миокарда [19].

Кумулятивная доза доксорубина 10 мг/кг массы тела животного, выбранная нами, является значимой для развития дилатационной кардиомиопатии [20].

Введение доксорубина в течение 4-ех недель с интервалом в одну неделю привело к гистологически подтвержденным повреждениям в сердце и печени, вызванным окислительным стрессом [21], снижению фракции выброса левого желудочка сердца [22].

С помощью световой микроскопии были выявлены небольшие (менее 5% повреждения миоцитов) изменения миокарда (вакуолизация цитоплазмы и/или лизис миофибрилл) только у 25% животных, получивших кумулятивную дозу доксорубина 10 мг/кг, не было статистически значимых изменений фракции выброса левого желудочка сердца [23].

В обзорном исследовании (на основании 72% рассмотренных работ) отмечено, что при токсическом воздействии антрациклинов подавление фракции выброса левого желудочка сердца у крыс относительно исходного значения колеблется в пределах от 10 до 40% [24].

Большая относительная масса сердца и печени у крыс опытной группы в сравнении с крысами контрольной группы, отмеченная нами, может свидетельствовать об отеке [9, 25, 26]. В некоторых работах наблюдали уменьшение массы сердца из-за гибели кардиомиоцитов [8, 27]. Доксорубин вызывал нарушение кровотока, некроз паренхимы печени, дегенеративные изменения гепатоцитов, воспаление в портальном пространстве [28].

Отмеченное нами уменьшение отношения сопротивлений биоэлектрического импеданса сердца и печени у опытных крыс при двух частотах в сравнении с контрольными животными, снижение активного сопротивления биоэлектрического импеданса органов тела при низкой частоте и повышение при высоких частотах тока указывает на накопление межклеточной жидкости, вызванное нарушением микроциркуляции.

Активное сопротивление биоэлектрического импеданса тканей тела характеризует растворы электролитов в межклеточном (при низких частотах тока), интерстициальном и внутриклеточном (при высоких частотах тока) пространствах [29]. При повреждении клеточных мембран, нарушении структурной организации тканей тела изменяется зависимость сопротивления ткани от частоты тока: значения при низкой и высокой частоте тока приближаются друг к другу [30]. Уменьшение отношения сопротивлений $Z_{9,4}/Z_{110}$ миокарда человека, отмеченное при наполнении сосудистого русла и интерстициального пространства кардиоплегическим раствором, указывало на нарушение обмена электролитов и формирование клеточного отека [31].

Ранее при воздействии доксорубина (однократно введенная доза 10 мг/кг за неделю до измерений) было показано увеличение биоимпеданса миокарда (на 33%), измеряемого на глубине 1 мм при частоте тока 10 кГц у крыс при гистологически выявленном выраженном интерстициальном отеке, дилатации миокарда [32].

Окислительный стресс (вызванный токсическим воздействием доксорубина [26]) приводит к ухудшению емкостных свойств мембраны [15]. При уменьшении клеточной массы, нарушении нормального функционирования клеток, увеличении объема внеклеточной жидкости снижаются абсолютные значения реактивного сопротивления и фазового угла биоэлектрического импеданса тела [33].

Показанные нами различия фазового угла биоэлектрического импеданса миокарда желудочка сердца у опытных крыс свидетельствуют о структурно-функциональных изменениях миокарда левого желудочка сердца у животных, получивших доксорубин.

При частотах 100 и 150 кГц нами выявлена зависимость показателя от толщины свободной стенки миокарда. Однако статистически значимые различия в электрическом сопротивлении миокарда и влияющей на сопротивление толщине передней стенки левого желудочка сердца у крыс двух групп нами не выявлены.

Биоимпеданс миокарда, измеряемый с эпикарда желудочка сердца, зависит от толщины стенки [34].

Значимое снижение сопротивления миокарда (измерение на эпикарде при 1 кГц) [35] и отношения сопротивлений миокарда при низкой и высокой частоте [6] отмечено при инфаркте миокарда. Уменьшение биоэлектрического импеданса миокарда при низких частотах может указывать на снижение количества кардиомиоцитов в ткани [35].

Нами выявлены статистически значимые меньшие значения реактивного сопротивления и фазового угла биоэлектрического импеданса, внеклеточного сопротивления печени у крыс опытной группы в сравнении с крысами контрольной группы.

Отмечены низкие значения R_e спустя 30 мин после электропорации, вероятно, вызванные расширением пространства между гепатоцитами, разрушением клеток [36]. Уменьшение активного и реактивного сопротивления биоэлектрического импеданса печени отмечено при фиброзе [37]. Уменьшение фазового угла и амплитуды биоэлектрического импеданса печени (в рассматриваемом нами диапазоне частот) выявлено при циррозе [38].

Нами установлена обратная корреляционная связь абсолютного значения реактивного сопротивления и фазового биоэлектрического импеданса печени с массой печени. Реактивное сопротивление и фазовый угол биоэлектрического импеданса печени являются индикатором отека.

Доксорубин, являясь ингибитором пролиферации клеток [39], способствует уменьшению мышечной массы, атрофии тканей большинства типов клеток в организме [8, 40]. При саркопении, наблюдаемой у пациентов, прошедших химиотерапию, абсолютное значение фазового угла биоэлектрического импеданса тела было ниже [4]. Фазовый угол биоэлектрического импеданса тела, являясь индикатором соотношения внеклеточной и внутриклеточной жидкости в организме, снижается у пациентов при асците [41].

Снижение фракции выброса левого желудочка сердца у пациентов при воздействии доксорубина выявляется при достижении уровня повреждения миокарда, когда исчерпаны компенсаторные механизмы [42].

Меньшее увеличение абсолютного значения фазового угла биоэлектрического импеданса тела у крыс при токсическом воздействии доксорубина вызвано ухудшением состояния органов, мышечных тканей при повреждении клеточных мембран, нарушении микроциркуляции, отеках. В сравнении с эхокардиографическим исследованием неинвазивный биоимпедансный показатель выявил токсические изменения в миокарде у большего количества животных (67% против 56%).

Прямое измерение биоимпеданса миокарда используется для диагностики и мониторинга физиологического состояния в имплантируемых медицинских устройствах [43]. В нашем исследовании существенное изменение фазового угла биоэлектрического импеданса миокарда при токсическом воздействии доксорубина наблюдали в том числе у животных, у которых не было выявлено значимых изменений сократительной функции, то есть показатель отразил морфофункциональные изменения на более раннем этапе развития токсического поражения.

Применение комплекса методов (биоимпедансного, эхокардиографического и гистологического) позволило подтвердить токсическое поражение миокарда и печени кумулятивной дозой доксорубина и выявить корреляционные связи между показателями биоимпеданса и морфофункциональными изменениями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Повреждение тканей сердца и печени, нарушение процессов микроциркуляции органов у крыс, получивших кумулятивную дозу доксорубина, приводит к уменьшению абсолютного значения фазового угла биоэлектрического импеданса органов, отношения значений сопротивления при низкой и высокой частоте тока в сравнении с крысами контрольной группы. Выявлена связь между изменением фазового угла биоэлектрического импеданса тела и фракции выброса левого желудочка сердца; между фазовым углом биоимпеданса миокарда и толщиной свободной стенки.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания АААА-А18-118012390260-9.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Создание доксорубициновой модели (С.Л.С., О.В.С.), получение экспериментальных данных (О.В.С. – гистология, Е.А.П. – эхокардиография; Н.Л.К. – многочастотный биоимпедансный анализ), описание гистологических данных (О.В.С.) статистическая обработка и написание статьи (Н.Л.К.), редактирование статьи (И.М.Р.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Volkova M, Russell R 3rd (2011) Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. *Current Cardiol Rev* 7(4): 214–220. <https://doi.org/10.2174/157340311799960645>
2. Damodar G, Smitha T, Gopinath S, Vijayakumar S, Rao Y (2014) An evaluation of hepatotoxicity in breast cancer patients receiving injection Doxorubicin. *Ann Med Health Sci Res* 4(1): 74–79. <https://doi.org/10.4103/2141-9248.126619>
3. Muramatsu M, Tsuchiya A, Ohta S, Iijima Y, Maruyama M, Onodera Y, Hagihara M, Nakaya N, Sato I, Omura K, Ueno S, Nakajima H (2015) Measuring body composition using the bioelectrical impedance method can predict the outcomes of gemcitabine-based chemotherapy in patients with pancreaticobiliary tract cancer. *Oncol Lett* 10(6): 3535–3541. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3811>
4. Davis MP, Panikkar R (2019) Sarcopenia associated with chemotherapy and targeted agents for cancer therapy. *Ann Palliat Med* 8(1): 86–101. <https://doi.org/10.21037/apm.2018.08.02>
5. Roehrich L, Suendermann S, Just IA, Knierim J, Mulzer J, Mueller M, Eulert-Grehn JJ, Hummel M, Starck C, Potapov E, Knosalla C, Falk V, Schoenrath F (2020) Safety of bioelectrical impedance analysis in advanced heart failure patients. *Pacing Clin Electrophysiol* 43(10): 1078–1085. <https://doi.org/10.1111/pace.14018>
6. Торнугев ЮВ, Балахнин СМ, Преображенская ВК, Манвелидзе РА, Ивлева ЕК (2016) Биоимпедансометрия миокарда при очаговых и диффузных повреждениях различного генеза. *Совр пробл науки и образов* N 4. [Tornuev YuV, Balakhnin SM, Preobrazhenskaya VK, Manvelidze RA, Ivleva EK Bioimpedance measuring myocardium in focal and diffuse injuries of various genesis. *Modern Problems Sci Educat* N 4. (In Russ)]. <https://doi.org/10.17513/spno.25001>
7. Панченков ДН, Леонов СД, Степанова ЮА, Алиханов РБ, Родин АВ, Баженов СМ (2017) Морфофункциональный анализ паренхимы печени при ее диффузном поражении n-нитрозодиэтиламином в эксперименте. *Диагностич и интервенцион радиол* 11(2): 61–69. [Panchenkov DN, Leonov SD, Stepanova YuA, Alikhanov RB, Rodin AV, Bazhenov SM (2017) Morpho-functional analysis of the liver parenchyma in case of its defeat by n-nitrosodiethylamine in experiment. *Diagn Intervent Radiol* 11(2): 61–69. (In Russ)].
8. Лушникова ЕЛ, Непомнящих ЛМ, Молодых НА, Клиникова МГ, Молодых ОП (2011) Структурная реорганизация миокарда крыс и численность кардиомиоцитов при дей-

- ствии доксорубина и тритерпеноидов. *Фундамент исследований* (6): 98–102. [Lushnikova EL, Nepomnyashchikh LM, Molodykh NA, Klinnikova MG, Molodykh OP (2011) Structural reorganization of the rat myocardium and the total number of cardiomyocytes under the action of doxorubicin and triterpenoids. *Fundament Res* (6): 98–102. (In Russ)].
9. Putri H, Nagadi S, Larasati YA, Wulandari N, Hermawan A (2013) Cardioprotective and hepatoprotective effects of Citrus hystrixpeels extract on rats model. *Asian Pac J Trop Biomed* 3(5): 371–375.
[https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60079-9](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60079-9)
 10. Salouge I, Ali RBen, Saïd DBen, Elkadri N, Kourda N, Lakhal M, Klouz A (2014) Means of evaluation and protection from doxorubicin-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats. *J Cancer Res Ther* 10(2): 274–278.
<https://doi.org/10.4103/0973-1482.136557>
 11. Kalyanaraman B (2020) Teaching the basics of the mechanism of doxorubicin-induced cardiotoxicity: Have we been barking up the wrong tree? *Redox Biol* 29: 101394.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101394>
 12. Teichholz LE, Kreulen T, Herman MV, Gorlin R (1976) Problems in echocardiographic volume determinations: echocardiographic-angiographic correlations in the presence of absence of asynergy. *Am J Cardiol* 37(1): 7–11.
[https://doi.org/10.1016/0002-9149\(76\)90491-4](https://doi.org/10.1016/0002-9149(76)90491-4)
 13. Hu L, Maslanik T, Zerebeckyj M, Plato CF (2012) Evaluation of bioimpedance spectroscopy for the measurement of body fluid compartment volumes in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods* 65: 75–82.
<https://doi.org/10.1016/j.vascn.2012.02.001>
 14. Raghavan K, Porterfield JE, Kottam ATG, Feldman MD, Escobedo D, Valvano JW, Pearce JA (2009) Electrical conductivity and permittivity of murine myocardium. *IEEE Transaction Biomed Enginer* 56(8): 2044–2052.
<https://doi.org/10.1109/TBME.2009.2012401>
 15. Торнүев ЮВ, Хачатрян РГ, Хачатрян АП, Махнев ВП, Осенний АС (1990) Электрический импеданс биологических тканей. М. Изд-во ВЗПИ. [Tornuev YuV, Hachatryan RG, Hachatryan AP, Mahnev VP, Osenniy AS Electriccheskiy impedans biologicheskikh tkaney [Electrical impedance of biological tissues]. Moscow. Izd-vo VZPI. 1990. (In Russ)].
 16. Цветков АА (2010) Биоимпедансные методы контроля системной гемодинамики. М. Изд-во Фирма “Слово”. [Tsvetkov AA Bioimpedansnyye metody kontrolya sistemnoy gemodinamiki. Moscow. Izd-vo Firma “Slovo”. (In Russ)].
 17. Kun S, Ristic B, Peura RA, Dunn RM (1999) Real-time extraction of tissue impedance model parameters for electrical impedance spectrometer. *Med Biol Eng Comput* 37(4): 428–432.
<https://doi.org/10.1007/BF02513325>
 18. Cornish BH, Thomas BJ, Ward LC (1993) Improved prediction of extracellular and total body water using impedance loci generated by multiple frequency bioelectrical impedance analysis. *Phys Med Biol* 38 (3): 337–346.
<https://doi.org/10.1088/0031-9155/38/3/001>
 19. Galán-Arriola C, Vilchez-Tschischke JP, Lobo M, López GJ, de Molina-Iracheta A, Pérez-Martínez C, Villena-Gutiérrez R, Macías Á, Díaz-Rengifo IA, Oliver E, Fuster V, Sánchez-González J, Ibanez B (2021) Coronary microcirculation damage in anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovasc Res:cvab053*.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvab053>
 20. Hayward R, Hydock DS (2007) Doxorubicin cardiotoxicity in the rat: an in vivo characterization. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 46(4): 20–32.
 21. Shivakumar P, Rani MU, Reddy AG, Anjaneyulu YA (2012) Study on the Toxic Effects of Doxorubicin on the Histology of Certain Organs. *Toxicol Int* 19(3): 241–244.
<https://doi.org/10.4103/0971-6580.103656>
 22. Абрамов АА, Лакомкин ВЛ, Просвирнин АВ, Капелько ВИ (2019) Характеристика давления и объема левого желудочка при диастолической и систолической дисфункции. *Кардиология* 59(4): 45–51. [Abramov AA, Lakomkin VL, Prosvirnin AV, Kapelko VI (2019) Pressure and Volume Characteristics of the Left Ventricle in Its Diastolic and Systolic Dysfunction. *Kardiologiya* 59(4): 45–51. (In Russ)].
<https://doi.org/10.18087/cardio.2019.4.2647>
 23. Kang Y, Wang W, Zhao H, Qiao Z, Shen X, He B (2017) Assessment of Subclinical Doxorubicin-induced Cardiotoxicity in a Rat Model by Speckle-Tracking Imaging. *Arq Bras Cardiol* 109(2): 132–139.
<https://doi.org/10.5935/abc.20170097>
 24. Georgiadis N, Tsarouhas K, Rezaee R, Nepka H, Kass GE, Dorne JC, Stagos D, Toutouzias K, Spandidos DA, Kouretas D, Tsiitsimpikou C (2020) What is considered cardiotoxicity of anthracyclines in animal studies. *Oncol Rep* 44(3): 798–818.
<https://doi.org/10.3892/or.2020.7688>

25. Саликова СП, Бахтияров РЗ (2008) Роль структурных изменений эндотелия и миокарда в развитии экспериментальной сердечной недостаточности. *Морфология* 134(5): 20–25. [Salikova SP, Bakhtiyarov RZ (2008) The role of structural changes of the endothelium and myocardium in the development of experimental heart failure. *Morphology* 134(5): 20–25. (In Russ)].
26. Yu X, Cui L, Zhang Z, Zhao Q, Li S (2013) α -Linolenic acid attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats through suppression of oxidative stress and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sinica* 45(10): 817–826.
<https://doi.org/10.1093/abbs/gmt082>
27. Chen PY, Hou CW, Shibu MA, Day CH, Pai P, Liu ZR, Lin TY, Viswanadha VP, Kuo CH, Huang CY (2017) Protective effect of Co-enzyme Q10 on doxorubicin-induced cardiomyopathy of rat hearts. *Environ Toxicol* 32(2): 679–689.
<https://doi.org/10.1002/tox.22270>
28. Yagmurca M, Bas O, Mollaoglu H, Sahin O, Nacar A, Karaman O, Songur A (2007) Protective effects of erdosteine on doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats. *Arch Med Res* 38(4): 380–385.
<https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2007.01.007>
29. Kyle UG, Bosaeus I., De Lorenzo AD, Deurenberg P, Elia M, Gómez JM, Heitmann BL, Kent-Smith L, Melchior JC, Pirllich M, Scharfetter H, Schols AM, Picard C (2004) Composition of the ESPEN Working Group. Bioelectrical impedance analysis—part I: Review of principles and methods. *Clin Nutr* 23(5): 1226–1243.
<https://doi.org/10.1016/j.clnu.2004.06.004>
30. Demirci C, Açıcı G, Demirci MS, Özkahya M, Töz H, Duman S, Sipahi S, Erten S, Tanrısev M, Ok E (2016) Impedance ratio: a novel marker and a powerful predictor of mortality in hemodialysis patients. *Int Urol Nephrol* 48(7): 1155–1162.
<https://doi.org/10.1007/s11255-016-1292-1>
31. Бубнов ВА, Пузенко ДВ (2012) Биоэлектрическая импедансометрия как метод оценки состояния миокарда во время операции на открытом сердце. *Клин практика* 3(3): 25–30. [Bubnov VA, Puzenko DV (2012) Bioelectric impedancemetry as a method of assessment of the myocardium during open-heart surgery. *J Clin Practice* 3(3): 25–30. (In Russ)].
<https://doi.org/10.17816/clinpract3325-30>
32. Новиков ВЕ, Крикова АВ, Новиков АС (2011) Биоимпедансометрическая оценка повреждения миокарда различными экзогенными факторами. *Курский научно-практ вестн. Человек и его здоровье* 1: 16–18. [Novikov VE, Krikova AV, Novikov AS (2011) Bioimpedancemetric assessment of myocardial damage by various exogenous factors. *Kursk Sci Pract Bull. Man and his Health* 1: 16–18. (In Russ)].
33. Dittmar M (2003) Reliability and variability of bioimpedance measures in normal adults: effects of age, gender, and body mass. *Am J Phys Anthropol* 122(4): 361–370.
<https://doi.org/10.1002/ajpa.10301>
34. Tsai J-Z, Cao H, Tungjitkusolmun S, Woo EJ, Vorperian VR, Webster JG (2000) Dependence of apparent resistance of four-electrode probes on insertion depth. *IEEE Transact Biomed Engineer* 47(1): 41–48.
<https://doi.org/10.1109/10.817618>
35. Schwartzman D, Chang I, Michele JJ, Mirotznik MS, Foster KR (1999) Electrical Impedance Properties of Normal and Chronically Infarcted Left Ventricular Myocardium. *J Intervent Cardiac Electrophysiol* 3: 213–224.
<https://doi.org/10.1023/a:1009887306055>
36. Ivorra A, Rubinsky B (2007) In vivo electrical impedance measurements during and after electroporation of rat liver. *Bioelectrochemistry* 70(2): 287–295.
<https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2006.10.005>
37. Wang H, He Y, Yang M, Yan Q, You F, Fu F, Wang T, Huo X, Dong X, Shi X (2014) Dielectric properties of human liver from 10 Hz to 100 MHz: normal liver, hepatocellular carcinoma, hepatic fibrosis and liver hemangioma. *Biomed Mater Engineer* 24(6): 2725–2732.
<https://doi.org/10.3233/BME-141090>
38. Laufer S, Ivorra A, Reuter VE, Rubinsky B, Solomon SB (2010) Electrical impedance characterization of normal and cancerous human hepatic tissue. *Physiol Meas* 31(7): 995–1009.
<https://doi.org/10.1088/0967-3334/31/7/009>
39. Denard B, Lee C, Ye J (2012). Doxorubicin blocks proliferation of cancer cells through proteolytic activation of CREB3L1. *eLife*. 1: e00090.
<https://doi.org/10.7554/eLife.00090>
40. Huang SC, Wu JF, Saovieng S, Chien WH, Hsu MF, Li XF, Lee SD, Huang CY, Huang CY, Kuo CH (2017) Doxorubicin inhibits muscle inflammation after eccentric exercise. *J Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 8(2): 277–284.
<https://doi.org/10.1002/jcsm.12148>
41. Peres WAF, Lento DF, Baluz K, Ramalho A (2012) Phase angle as a nutritional evaluation tool in all stages of chronic liver disease. *Nutricion Hospitalaria* 27(6): 2072–2078.
<https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.6.6015>

42. Кузьмина ТП, Давыдкин ИЛ, Терешина ОВ, Данилова ОЕ, Шпигель АС, Бетанели ТШ, Наумова КВ, Попельнюк НС (2019) Кардиотоксичность и методы ее диагностики у пациентов гематологического профиля (обзор литературы). Сибирск научн мед журн 39(1): 34–42. [Kuzmina TP, Davydkin IL, Tereshina OV, Danilova OE, Shpigel AS, Betaneli TSh, Nau-mova KV, Popelnyuk NS (2019) Cardiotoxicity and methods of its diagnosis in hematology pa-tients (review). Siber Sci Med J 39 (1): 34–42. (In Russ)].
43. Rodriguez S, Ollmar S, Waqar M, Rusu AA (2016) Batteryless Sensor ASIC for Implantable Bio-impedance Applications. IEEE Transact Biomed Circuits and Systems 10(3): 533–544. <https://doi.org/10.1109/TBCAS.2015.2456242>

Bioelectrical Impedance of the Myocardium and Liver in Rats under Chronic Exposure to Doxorubicin

**N. L. Kolomeyets^{a, *}, O. V. Syslonova^a, S. L. Smirnova^a,
E. A. Peshkin^a, and I. M. Roshchevskaya^b**

^a *Department of Comparative Cardiology, Federal Research Centre “Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences”, Syktyvkar, Komi Republic, Russian Federation*

^b *Federal State Budgetary Institution “Research Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russian Federation*

*e-mail: kolomeec@frc.komisc.ru

Changes in bioelectrical impedance of the myocardium and liver were revealed in male Wistar rats under chronic exposure to doxorubicin. Multi-frequency bioimpedance and echocardiographic studies in rats were performed before and two months after the first injection of doxorubicin (a cumulative dose of 10 mg/kg divided into 4 injections for 4 weeks) or saline; histological examination of the left ventricular myocardium of the heart and liver was carried out at the end of the experiment. Two months after the first injection of doxorubicin, 56% of animals showed a $13 \pm 2\%$ decrease in the left ventricular ejection fraction. In 33% of rats treated with doxorubicin, hemorrhage, intra- and intercellular vacuolization were histologically revealed in the left ventricular myocardium of the heart. Morphological changes in the liver were shown in all the rats affected by chronic exposure to doxorubicin. In rats treated with doxorubicin, a change in the dependence of the active resistance of bioelectrical impedance of the heart and liver on the current frequency, a statistically significant decrease in the ratio of resistances at low and high frequencies in comparison with the control animals indicated the accumulation of extracellular fluid caused by impaired microcirculation, damage to vascular cell membranes. Histologically confirmed morphological changes in the myocardium and liver resulted in statistically significantly lower absolute values of the phase angle (of the myocardium and liver) and reactive resistance (of the liver) of bioelectrical impedance compared to the control rats. A statistically significant relation was found between the phase angle of bioelectrical impedance of the myocardium at high frequencies and the thickness of the left ventricular free wall of the heart. A statistically significantly lower extracellular resistance of bioelectrical impedance of the liver indicated an expansion of the space between hepatocytes and cell destruction in rats treated with doxorubicin in comparison with the control animals.

Keywords: doxorubicin, bioelectrical impedance of the liver, myocardium

ПЕПТИД АКТГ_{4–7}-PGR КОРРИГИРУЕТ ПОВЕДЕНИЕ И УРОВЕНЬ
КОРТИКОСТЕРОНА У КРЫС В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА

© 2021 г. А. О. Ворвуль^{1, *}, И. И. Бобынцев¹, М. В. Свищева¹, О. А. Медведева¹,
А. Ю. Мухина¹, Л. А. Андреева²

¹Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

²Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

*E-mail: vorvul1996@mail.ru

Поступила в редакцию 14.05.2021 г.

После доработки 06.08.2021 г.

Принята к публикации 12.08.2021 г.

Пептид АКТГ_{4–7}-PGR обладает широким спектром нейротропного действия, в том числе анксиолитическим и антидепрессивным эффектами в условиях стресса. При этом одним из важных вопросов является выяснение роли кортикостерона в поведенческих реакциях на фоне многократного введения АКТГ_{4–7}-PGR при хроническом стрессе. Целью работы явилось изучение влияния АКТГ_{4–7}-PGR на поведенческие реакции и содержание кортикостерона и их взаимосвязь при длительном стрессировании крыс. АКТГ_{4–7}-PGR вводили крысам-самцам Вистар в дозах 5, 50, 150, 450 мкг/кг в течение 14 дней за 12–15 мин до стрессорного воздействия. Поведение животных исследовали в тестах открытого поля и приподнятого крестообразного лабиринта, концентрацию кортикостерона в крови определяли методом иммуноферментного анализа. Установлено, что пептид в условиях хронического стресса оказывал анксиолитическое действие и снижал уровни тревожности в дозах 50 и 150 мкг/кг ($p < 0.05–0.01$). Во всех использованных дозах АКТГ_{4–7}-PGR снижал концентрацию кортикостерона в сыворотке крови стрессированных крыс на 28.6–34.2% ($p < 0.05$). Корреляционный анализ показал, что после введения АКТГ_{4–7}-PGR в дозе 50 мкг/кг уменьшение тревожности имело прямую сильную связь со снижением уровня кортикостерона.

Ключевые слова: АКТГ_{4–7}-PGR, хронический стресс, открытое поле, приподнятый крестообразный лабиринт, кортикостерон

DOI: 10.31857/S0869813921110108

Регуляторные пептиды семейства меланокортинов обладают широким спектром биологической активности и представляют собой класс регуляторных пептидов, который включает в себя как гормональные, так и другие физиологические эффекты [1, 2]. Эффекты данных пептидов реализуются путем взаимодействия с пятью подтипами меланокортиновых рецепторов (MCR). Известно, что адренокортикотропный гормон (АКТГ) и его фрагменты способствуют обучению, концентрируют внимание и усиливают консолидацию памятного следа [1]. При этом установлена способность фрагментов АКТГ и α -меланоцитстимулирующего гормонов проникать через гематоэнцефалический барьер [3].

На основе меланокортинов был создан фармакологический препарат Семакс, представляющий собой синтетический аналог участка АКТГ_{4–7}, защищенный от действия эндопептидаз путем присоединения глипролина Pro-Gly-Pro (PGR).

Препарат применяется для лечения интеллектуально-мнестических расстройств при сосудистых поражениях головного мозга, а также для повышения адаптационных возможностей в экстремальных условиях и профилактики психического утомления в наиболее тяжелые периоды работы в стрессовых условиях [3].

В настоящее время известно аксиолитическое и антидепрессивное действие АКТГ₄₋₇-PGP при хроническом введении пептида в течение 10–14 дней, однако данное исследование было выполнено с использованием только одной дозы – 50 мкг/кг [4], которая ранее применялась в исследовании анксиолитических и антидепрессивных эффектов пептида на моделях хронического непредсказуемого стресса на протяжении 6 недель с определением относительной массы надпочечников [5]. При этом уровень кортикостерона в крови экспериментальных животных в обеих работах не исследовался, тогда как вопрос об участии кортикостерона в формировании тревожности при хроническом стрессе остается открытым. Так, в ряде исследований показана как сонаправленность уровня тревожности с концентрацией кортикостерона [6] и относительной массой надпочечников [5], так и их обратная взаимосвязь [7]. АКТГ₄₋₇-PGP также оказывал разнонаправленное действие в различных моделях стресса. При хроническом непредсказуемом стрессе отмечался анксиолитический эффект на фоне снижения относительной массы надпочечников [5], однако на модели неонатальной изоляции показано увеличение уровня кортикостерона до контрольных значений при применении гептапептида [7].

Однако до настоящего времени не были выполнены исследования одновременного влияния АКТГ₄₋₇-PGP на поведенческие реакции (в том числе на тревожность) и уровень кортикостерона в крови в условиях одной модели хронического стресса.

Целью работы явилось изучение влияния АКТГ₄₋₇-PGP на поведенческие реакции у крыс, содержание кортикостерона в крови и их взаимосвязь при хроническом иммобилизационном стрессе.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 60 крысах-самцах Вистар массой 200–230 г, полученных из SPF-вивария Института цитологии и генетики СО РАН. Животных содержали при режиме освещенности 12 ч – свет, 12 ч – темнота и свободном доступе к воде и корму.

Пептид АКТГ₄₋₇-PGP, имеющий формулу Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro (МЕНФРРР), синтезированный в Институте молекулярной генетики НИЦ “Курчатовский институт” РАН, растворяли в физиологическом растворе и вводили внутривентриально в дозах 5, 50, 150 и 450 мкг/кг за 15 мин до стрессорного воздействия в объеме из расчета 1 мл на 1 кг массы тела. Используемые в эксперименте дозы пептида были выбраны в соответствии с имеющимися данными литературы об их эффективности [3, 10]. Контрольные животные получали эквивалентные объемы физиологического раствора. Все процедуры соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, директиве 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г по охране животных, используемых в научных целях, “Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств” (Москва, 2012), и рекомендациям регионального этического комитета при Курском государственном медицинском университете.

Хронический стресс моделировали путем иммобилизации животных с помощью индивидуальных пластиковых вентилируемых боксов в течение 2-х ч на протяжении 14 дней [8].

Поведение крыс изучали через час после окончания последней иммобилизации в тестах “приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ) и “открытое поле” (ОП) с использованием аппаратного и программного обеспечения для видеослежения за телом животного “SMART Video Tracking System” (PanLab Harvard Apparatus, Испания).

В тесте ПКЛ в течение 5 мин для оценки уровня тревожности у крыс определяли время их нахождения в открытых и закрытых рукавах, на центральной площадке, а также число свешиваний. В тесте ОП оценивали двигательную и исследовательскую (горизонтальную) активность, локомоторное поведение, эмоциональность, короткий груминг. Горизонтальную двигательную и исследовательскую активность определяли по числу пересеченных квадратов. Пересечением границы считали тот момент, когда животное находилось четырьмя лапами в одном квадрате. Эмоциональность оценивали по числу фекальных болюсов и актов урикации, локомоторное поведение – по пройденной дистанции в центральных и периферических квадратах, а также общей пройденной дистанции. За короткий груминг принимали 1–2 быстрых круговых движений передних лап вокруг носа или глаз. Также регистрировали время нахождения животных в центральных и периферических квадратах [9].

Для исследования уровня кортикостерона использовали сыворотку крови крыс. Забор крови у животных производили в течение 30 мин после проведения тестов под эфирным наркозом с помощью систем с прокоагулянтом S-Monovette (SARSTED, Германия) из правого желудочка сердца (локализацию иглы оценивали визуально). Уровень кортикостерона определяли иммуноферментным методом с помощью набора Corticosterone ELISA Kit (Enzo, США).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием интегрированной среды разработки для языка R “RStudio Desktop 1.4.1717” (RStudio, PBC, США). Характер распределения в вариационных рядах определяли с помощью теста Шапиро–Уилка, оценку равенства дисперсий – по критерию Левене. При принятии нулевой гипотезы о нормальности распределения для оценки достоверности различий между двумя группами применяли непарный *t*-критерий Стьюдента с поправкой Уэлча, тремя и более – однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с post-hoc анализом (тест Ньюмана–Кейлса), при ее отклонении – непарный *U*-критерий Манна–Уитни для двух групп или критерий Краскела–Уоллиса с post-hoc анализом (тест Дана) для трех и более групп. Для оценки взаимосвязи уровня кортикостерона и показателей тревожности проводился корреляционный анализ с расчетом рангового коэффициента корреляции Спирмена (*r*). Для исключения эффекта множественных сравнений применялась поправка Бенжамини–Хохберга. Достоверно значимыми различия считали при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка общей исследовательской, двигательной активностей и уровня тревожности при применении АКТГ₄₋₇-PGP в тесте “Открытое поле”

Установлено, что стресс вызывал изменение поведенческой активности животных в тесте ОП в виде достоверного увеличения горизонтальной двигательной активности (увеличение числа пересеченных центральных квадратов и пройденной дистанции в них) и времени, проведенного крысами в центральных квадратах (рис. 1).

В контрольной группе стрессированных животных отмечалось повышение эмоциональной напряженности (увеличение числа уриаций и фекальных болюсов) и количества актов короткого груминга (рис. 2).

Применение АКТГ₄₋₇-PGP в дозе 5 мкг/кг не вызывало значимого изменения поведенческой активности в тесте ОП в сравнении с контрольной группой стрес-

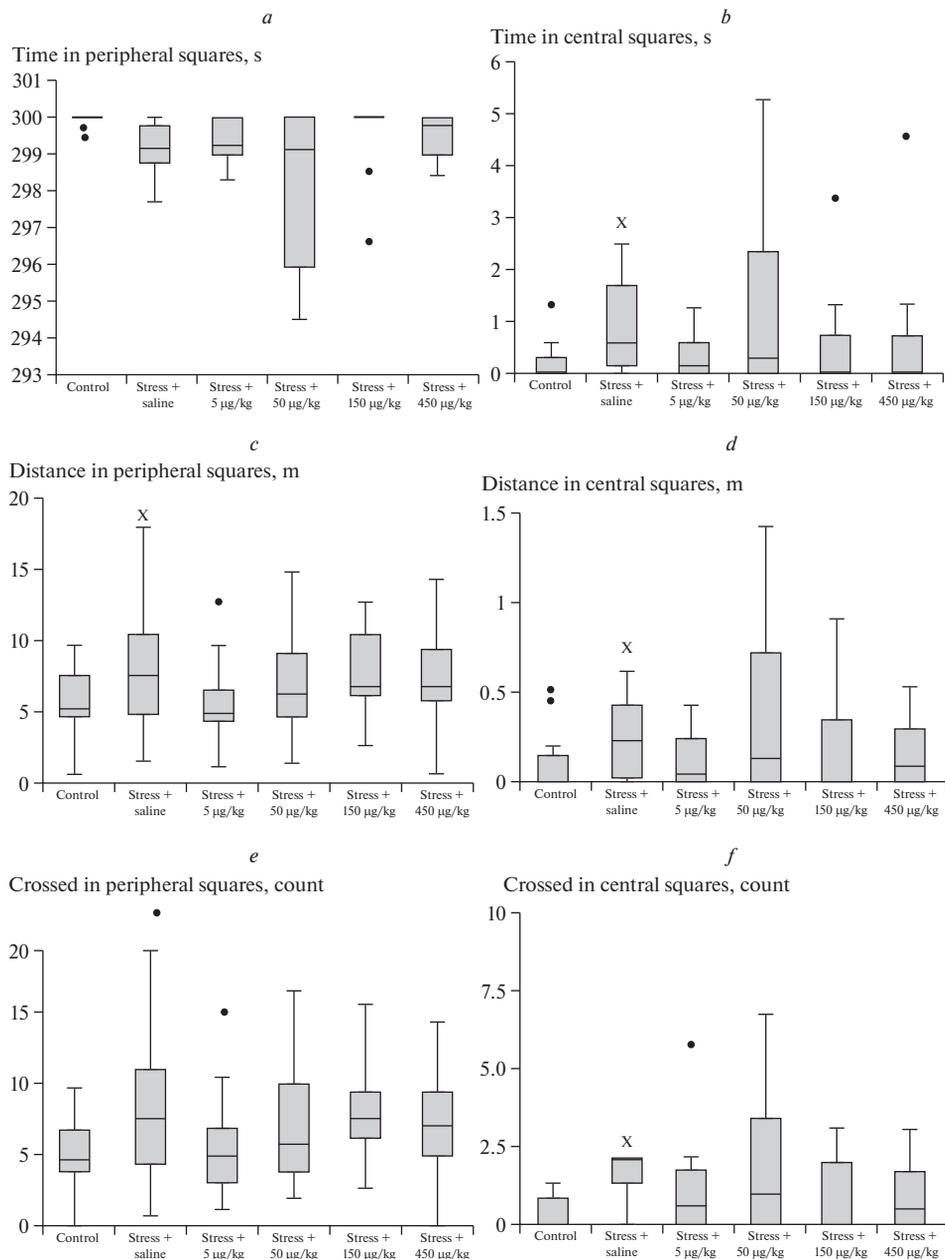


Рис. 1. Показатели поведения крыс в тесте “открытое поле” после введения АКТГ₄₋₇-PGP. (a) – время в периферических квадратах; (b) – время в центральных квадратах; (c) – пройденная дистанция в периферических квадратах; (d) – пройденная дистанция в центральных квадратах; (e) – число пересеченных периферических квадратов; (f) – число пересеченных центральных квадратов. Полуширная черта – медиана, ящик – межквартильный размах, усы – крайние значения вариационных рядов, полуширная точка – выброс. ^X – $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой нестрессированных крыс (U -критерий Манна–Уитни).

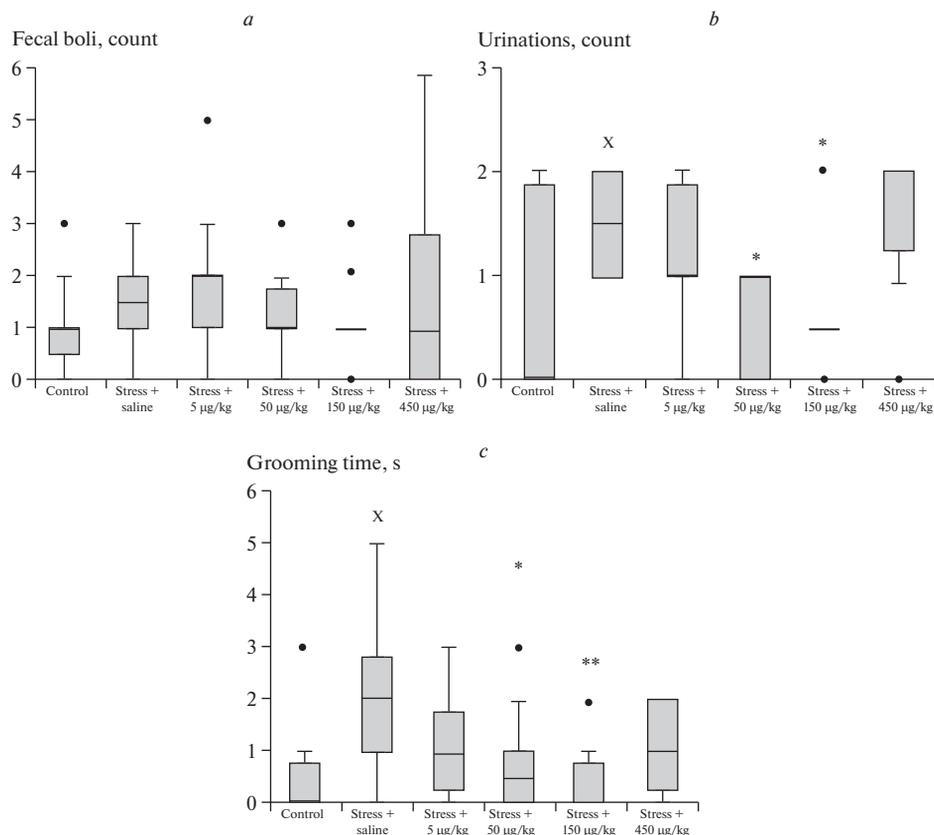


Рис. 2. Показатели проявления тревожности у исследуемых животных после введения АКТГ₄₋₇-PGR. (a) – число фекальных болов; (b) – число уринаций; (c) – общая продолжительность груминга. Полу- жирная черта – медиана, ящик – межквартильный размах, усы – крайние значения вариационных рядов, полужирная точка – выброс. ^x – $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой нестрессированных крыс (U -критерий Манна–Уитни), * – $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой стрессированных крыс (критерий Краскела–Уоллиса с post-hoc анализом Дана), ** – $p < 0.01$ по сравнению с контрольной группой стрессированных крыс (критерий Краскела–Уоллиса с post-hoc анализом Дана).

сированных крыс. При увеличении вводимой дозы до 50 мкг/кг наблюдалось значительное уменьшение эмоциональности и тревожности в виде снижения числа уринаций и количества актов короткого груминга в сравнении с контрольными стрессированными животными. При этом пептид не влиял на ориентировочно-исследовательскую и двигательную активность, измененную в условиях стресса. Увеличение дозы до 150 мкг/кг вызывало усиление эффектов: отмечалось снижение двигательной активности в центральных квадратах и показателей тревожности. В наибольшей использованной дозе 450 мкг/кг АКТГ₄₋₇-PGR не оказывал влияния на вызванные стрессом изменения поведения в тесте ОП.

*Оценка анксиолитических эффектов АКТГ₄₋₇-PGR в тесте
“Приподнятый крестообразный лабиринт” и уровня кортикостерона*

При исследовании поведения в ПКЛ у крыс контрольной стрессированной группы отмечалось достоверное увеличение времени нахождения в закрытых рука-

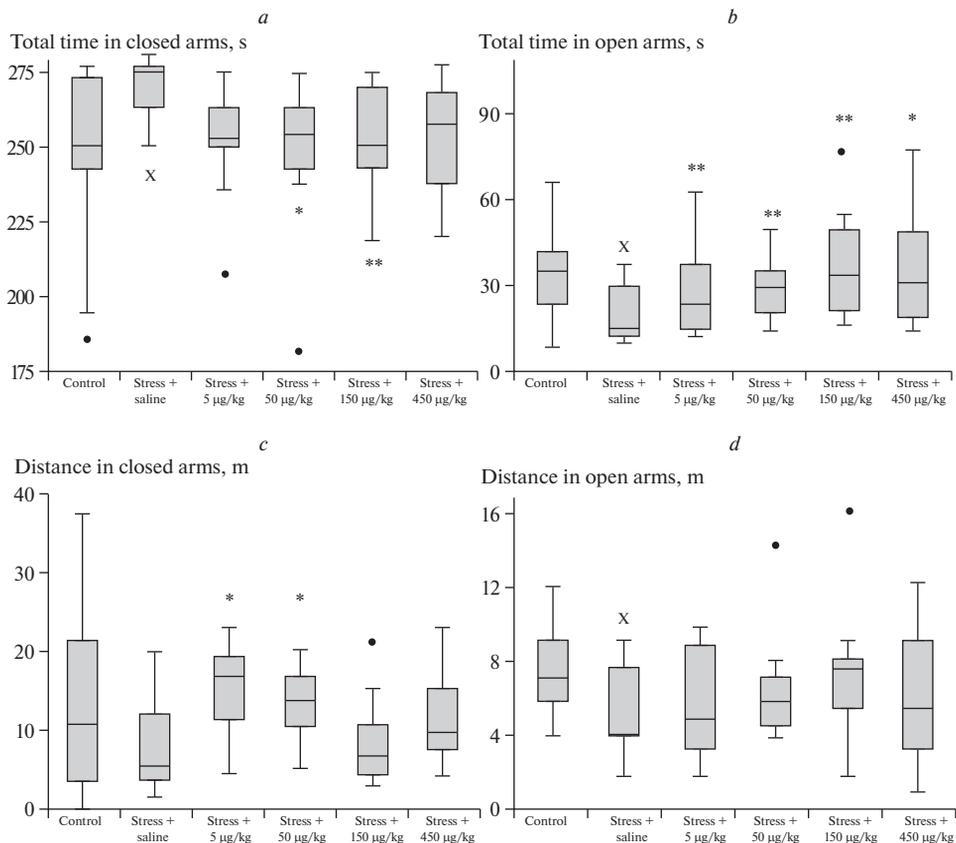


Рис. 3. Показатели поведения крыс в приподнятом крестообразном лабиринте после введения АКГГ₄₋₇-PGP. (a) – время в закрытых рукавах; (b) – время в открытых рукавах; (c) – дистанция в закрытых рукавах; (d) – дистанция в открытых рукавах. Полушпирная черта – медиана, ящик – межквартильный размах, усы – крайние значения вариационных рядов, полушпирная точка – выброс. X – $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой нестрессированных крыс (U-критерий Манна–Уитни), * – $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой стрессированных крыс (критерий Краскела–Уоллиса с post-hoc анализом Дана), ** – $p < 0.01$ по сравнению с контрольной группой стрессированных крыс (критерий Краскела–Уоллиса с post-hoc анализом Дана).

вах лабиринта на фоне снижения данного показателя в открытых рукавах в сравнении с нестрессированным контролем, что свидетельствует об увеличении уровня тревожности. Также при этом отмечалось уменьшение количества свешиваний из открытого рукава установки (рис. 3).

Концентрация кортикостерона в сыворотке крови у крыс контрольной стрессированной группы возросла на 59% в сравнении с нестрессированным контролем ($p < 0.01$) (рис. 4).

В дозе 5 мкг/кг пептид увеличивал время нахождения животных на центральной площадке при уменьшении времени их пребывания в закрытых рукавах на фоне достоверного снижения содержания кортикостерона сыворотки крови на 28.6% ($p < 0.01$). При использовании АКГГ₄₋₇-PGP в дозе 50 мкг/кг достоверно возросло время нахождения животных как в открытых рукавах, так и на центральной пло-

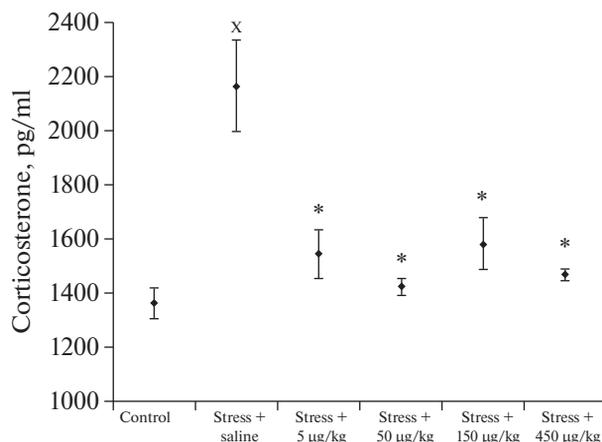


Рис. 4. Влияние АКТГ₄₋₇-PGP на содержание кортикостерона в сыворотке крови крыс (среднее \pm ошибка среднего). X — $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой нестрессированных крыс (t -критерий Стьюдента с поправкой Уэлча), * — $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой стрессированных крыс (one-way ANOVA с post-hoc анализом Ньюмана–Кейлса).

щадке экспериментальной установки при значительном уменьшении времени нахождения в закрытых рукавах. Подобные эффекты наблюдались и при применении пептида в дозе 150 мкг/кг: возросло время нахождения крыс в открытых рукавах и снизилось — в закрытых. Важно отметить, что при этом абсолютные значения исследуемых показателей были близки к соответствующим значениям группы нестрессированного контроля. Отмеченные изменения поведенческой активности после применения пептида в дозах 50 и 150 мкг/кг происходили при снижении уровня кортикостерона соответственно на 34.2 и 27% ($p < 0.01$). Дальнейшее увеличение дозы пептида до 450 мкг/кг сопровождалось ослаблением эффектов на фоне снижения содержания кортикостерона на 32.2% ($p < 0.01$).

Оценка взаимосвязи между кортикостероном и уровнем тревожности при применении АКТГ₄₋₇-PGP в условиях хронического стресса

Результаты выполненного корреляционного анализа между средним уровнем кортикостерона и средними значениями показателей тревожности показали наличие между ними целого ряда статистически значимых взаимосвязей (рис. 5).

Так, в группе нестрессированных животных отмечалась обратная связь средней силы между уровнем кортикостерона со временем, проведенном в открытых рукавах ($\rho = -0.32$, $p > 0.05$), временем пребывания в центре ($\rho = -0.58$, $p > 0.05$), числом свешиваний ($\rho = -0.69$, $p < 0.05$). При этом установлена сильная прямая связь между уровнем кортикостерона и числом актов короткого груминга ($\rho = 0.81$, $p < 0.05$), прямая связь средней силы — со временем в закрытых рукавах ($\rho = 0.61$, $p > 0.05$), числом уринаций ($\rho = 0.69$, $p < 0.05$) и количеством фекальных болюсов ($\rho = 0.23$, $p > 0.05$).

В условиях хронического стресса наблюдалось усиление корреляционных взаимоотношений: появлялась сильная обратная связь между уровнем кортикостерона, временем нахождения в открытых рукавах ($\rho = -0.89$, $p < 0.01$) и числом свешиваний ($\rho = -0.86$, $p < 0.05$), слабая обратная связь — со временем пребывания в центре ($\rho = -0.19$, $p > 0.05$). Выявлена сильная корреляционная связь уровня кортикостерона со временем нахождения в открытых рукавах ($\rho = 0.93$, $p < 0.01$) и числом ак-

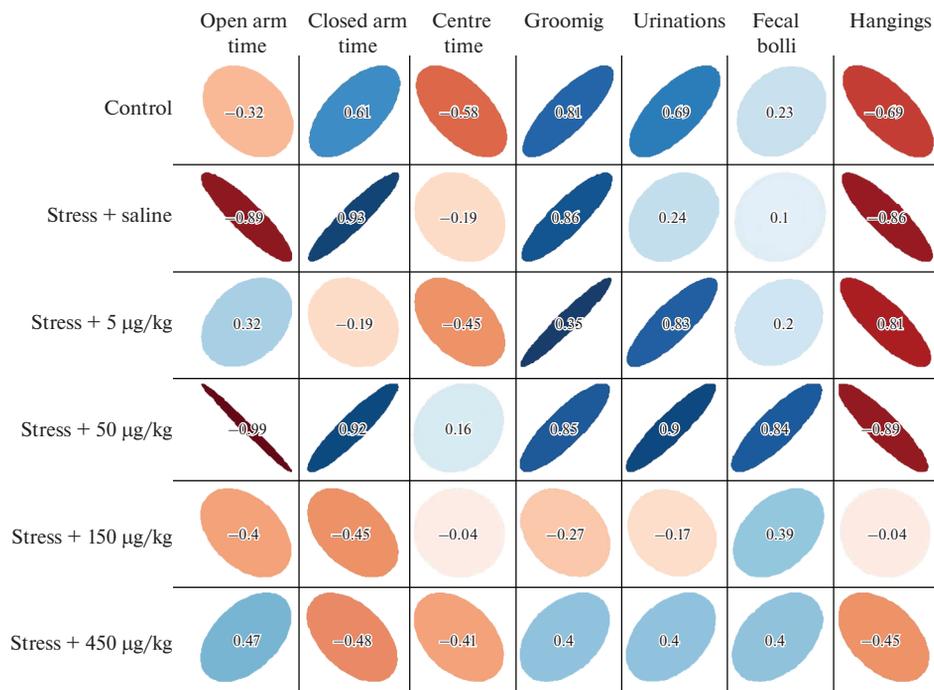


Рис. 5. Взаимосвязь между уровнем кортикостерона и показателями тревожности. Цветная шкала отображает значение коэффициента корреляции Спирмена, вытянутость эллипсов – направление связи: снизу вверх – прямая, сверху вниз – обратная.

тов короткого груминга ($\rho = 0.86$, $p < 0.05$), прямая связь средней силы – с числом уринаций ($\rho = 0.24$, $p > 0.05$) и слабая прямая связь – с числом фекальных болюсов ($\rho = 0.10$, $p > 0.05$).

В группе животных, получавших АКТГ₄₋₇-PGP в дозе 5 мкг/кг, обнаружена сильная прямая связь между уровнем кортикостерона и числом актов короткого груминга ($\rho = 0.95$, $p < 0.05$), уринаций ($\rho = 0.83$, $p < 0.05$) и сильная обратная связь – с числом свешиваний ($\rho = -0.81$, $p < 0.05$).

У крыс, получавших АКТГ₄₋₇-PGP в дозе 50 мкг/кг, сохранялась сила и направленность связей уровня кортикостерона со временем в открытых и закрытых рукавах, числом актов короткого груминга и свешиваний, обнаруженных в группе контрольных стрессированных животных. Кроме того, появлялись сильные прямые связи между уровнем кортикостерона и числом уринаций ($\rho = 0.90$, $p < 0.05$), фекальных болюсов ($\rho = 0.84$, $p < 0.05$).

После введения пептида в дозах 150 и 450 мкг/кг отсутствовали сильные достоверно значимые связи между уровнем кортикостерона и показателями тревожности.

Таким образом, проведенный корреляционный анализ у контрольных животных показал возникновение значимых связей между уровнем кортикостерона и поведенческими показателями в условиях хронического стресса. После применения АКТГ₄₋₇-PGP характер корреляционных взаимоотношений значительно изменялся в зависимости от использованной дозы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Выполненные эксперименты показали, что применение АКТГ₄₋₇-PGR в дозах 50 и 150 мкг/кг значительно снижало уровень стресс-индуцированной тревожности у крыс, тогда как в дозах 5 и 450 мкг/кг эффекты пептида были маловыраженными. Такое проявление зависимости действия АКТГ₄₋₇-PGR от использованной дозы известно как U-эффект, характерный для целого ряда регуляторных пептидов.

При выяснении механизмов выявленных эффектов необходимо учитывать, что биологические эффекты меланокортинов реализуются посредством воздействия на различные подтипы меланокортиновых рецепторов [1], а АКТГ₄₋₇-PGR является антагонистом MC4R и MC5R [10]. В связи с этим выявленный U-эффект может иметь следующее объяснение. Известно, что передача сигнала с меланокортиновых рецепторов осуществляется за счет взаимодействия с аденилатциклазой и активации цАМФ-сигнального пути [11]. Однако пути передачи сигнала могут зависеть от концентрации лиганда и передаваться с включением других систем вторичных мессенджеров, что может отражаться на направленности и выраженности эффектов. Например, сигнал с MC3R может передаваться по фосфоинозитольному пути [12], а с MC5R – с участием Jak/STAT [13].

В развитии поведенческих реакций в условиях стресса важную роль играют MCR4, сигнал с которых вызывает активацию гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы и проявляется усилением эмоциональности и груминга [14–16]. Данные механизмы могут находиться в основе отмеченного нами в контрольной группе стрессированных крыс увеличения количества уриаций и актов короткого груминга в тесте ОП, а также изменений поведения в тесте ПКЛ, свидетельствующих об увеличении тревожности у крыс. При этом известно, что АКТГ₄₋₇-PGR как антагонист MC4R в экспериментах без стрессорного воздействия после введения пептида на протяжении 14 дней проявляет анксиолитическое действие [4]. Необходимо отметить, что в выполненном нами исследовании АКТГ₄₋₇-PGR вводили до начала стрессорного воздействия также в течение 14 дней. Известно, что длительность ноотропных эффектов пептида составляет 20–24 ч [17, 18], и его действие могло проявляться на всех звеньях развивающейся стрессорной реакции на протяжении всего эксперимента. При этом продолжительность анксиолитического действия после курсового введения пептида остается неизученным вопросом. Полученные в работе данные также согласуются с результатами исследования, в котором АКТГ₄₋₇-PGR в значительной степени корригировал анксиогенный эффект холецистокинина-тетрапептида [19].

Следует отметить, что при однократном введении за 15 мин до начала тестирования АКТГ₄₋₇-PGR не оказывал анксиолитического действия как в тесте конфликтной ситуации по Вогелю, так и в бесконфликтных условиях модели ПКЛ [20].

Анксиолитическое действие АКТГ₄₋₇-PGR при многократном введении в течение продолжительного промежутка времени может достигаться за счет увеличения концентрации в тканях мозга BDNF, который оказывает влияние на созревание нейронов и на процессы обучения и памяти. Кроме того, BDNF участвует в регуляции тревожных и стрессорных расстройств, и за счет изменения его экспрессии может реализовываться анксиолитический эффект пептида [21]. Его участие в модуляции реакции тревоги и депрессии у экспериментальных животных также возможно вследствие влияния пептида на системы биогенных аминов головного мозга [22].

Стрессорное воздействие в условиях нашего эксперимента вызывало типовую стресс-реакцию в виде значительного увеличения содержания кортикостерона в сыворотке крови у крыс. Применение пептида способствовало существенному

снижению его уровня, а проведенный корреляционный анализ показал значимую взаимосвязь между уровнем кортикостерона и показателями тревожности в условиях использованной нами модели хронического стресса. Обращает внимание, что снижение содержания гормона происходило во всех группах животных, не зависело от выраженности анксиолитического эффекта пептида, что может свидетельствовать о преимущественно центральных (стероиднезависимых) механизмах влияния пептида на исследованные поведенческие реакции и является поводом для дальнейшего анализа. Так, известно, что хронический иммобилизационный стресс вызывает проявление тревожности и депрессии на фоне повышения уровня кортикостерона и увеличения экспрессии рецепторов к глюкокортикоидам [6], что согласуется с результатами нашего исследования. Однако введение АКТГ₄₋₇-PGR в условиях стресса в течение первых 21 дней жизни детенышам крыс вызывало снижение уровня тревожности, рост ориентировочно-исследовательской активности и улучшение обучения крыс на фоне восстановления до контрольных значений уровня кортикостерона [7]. Данные различия могут являться следствием различного функционального состояния гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы в зависимости от возраста животных [23], а также отсутствием ежедневной стимуляции, обусловленной социальными взаимодействиями [24].

Подтверждением данному предположению о преимущественно центральных (стероиднезависимых) механизмах влияния пептида могут являться результаты корреляционного анализа между исследованными нами показателями. Так, в условиях хронического стресса уровень кортикостерона во всех подопытных группах сильно коррелировал с показателями поведения. У контрольных стрессированных крыс выявлены сильные прямые связи между уровнями кортикостерона и тревожности. Однако после введения АКТГ₄₋₇-PGR характер данных взаимоотношений существенно различался в зависимости от использованной дозы. В частности, при введении АКТГ₄₋₇-PGR в дозах 5, 150, 450 мкг/кг отмечалось изменение направленности связей или их значительное ослабление. При этом только в дозе 50 мкг/кг, оказавшей наибольшее анксиолитическое действие, взаимосвязи между уровнем кортикостерона и показателями тревожности имели сходный с контрольными стрессированными животными характер. Возможно, в данной группе наибольшая выраженность анксиолитического эффекта достигалась за счет сочетания центрального нейротропного действия АКТГ₄₋₇-PGR и выраженного снижения уровня кортикостерона вследствие значительного ослабления психоэмоционального стрессорного воздействия иммобилизации. Подобный механизм может находиться в основе анксиолитических эффектов данной дозы в выполненных ранее работах [4, 5].

Также в развитии установленных эффектов АКТГ₄₋₇-PGR могут участвовать изменения в оси кишечник-мозг. Выявленная нами ранее коррекция пептидом стрессиндуцированного дисбиоза и развивающейся воспалительной реакции [25, 26] могла отразиться на функциональном состоянии нервной системы вследствие изменений в системе кишечник-мозг [27].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хронический иммобилизационный стресс вызывал снижение общей исследовательской и двигательной активности на фоне повышения тревожности у крыс и уровня кортикостерона в сыворотке крови. АКТГ₄₋₇-PGR способствовал коррекции стрессиндуцированных сдвигов в поведении у крыс, оказывая анксиолитическое действие в дозах 50 и 150 мкг/кг. При этом установлено снижение уровней кортикостерона во всех исследуемых группах в сравнении с контрольными стрессированными животными. Проведенный анализ корреляционных взаимосвязей между уровнем кортикостерона и поведенческими показателями показал значение

стероидозависимых механизмов в опосредовании дозозависимого анксиолитического эффекта АКТГ₄₋₇-PGR. Применение АКТГ₄₋₇-PGR в условиях хронического стресса не оказывало влияния на исследовательскую и двигательную активность.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа профинансирована за счет госбюджета.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Разработка концепции и дизайна исследования (Б.И.И., М.О.А., А.Л.А.); сбор, обработка материала и статистический анализ данных (С.М.В., М.А.Ю., В.А.О.); написание и редактирование манускрипта (Б.И.И., С.М.В., В.А.О.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Левицкая НГ, Каменский АА* (2009) Меланокортиновая система. Успехи физиол наук 40(1): 44–65. [*Levitskaya NG, Kamensky AA* (2009) Melanocortin System. *Uspekhi fiziol nauk* 40(1): 44–65. (In Russ)].
2. *Catania A, Gatti S, Colombo G, Lipton JM* (2004) Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation. *Pharmacol Rev* 56(1): 1–29. PMID: <https://doi.org/10.1124/pr.56.1.115001661>
3. *Koroleva SV, Myasoedov NF* (2018) Semax as a universal drug for therapy and research. *Biol Bull* 45(6): 589–600. <https://doi.org/10.1134/S000233291806005X>
4. *Виленский ДА, Левицкая НГ, Андреева ЛА, Алфеева ЛЮ, Каменский АА, Мясоедов НФ* (2007) Влияние хронического введения Семакса на исследовательскую активность и эмоциональное состояние белых крыс. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 93(6): 661–669. [*Vilensky DA, Levitskaya NG, Andreeva LA, Alfeeva LYu, Kamensky AA, Myasoedov NF* (2007) Effects of chronic Semax administration on exploratory activity and emotional reaction in white rats. *Russ J Physiol* 93(6): 661–669. (In Russ)].
5. *Yatsenko KA, Glazova NY, Inozemtseva LS, Andreeva LA, Kamensky AA, Grivennikov IA, Levitskaya NG, Dolotov OV, Myasoedov NF* (2013) Heptapeptide Semax attenuates the effects of chronic unpredictable stress in rats. *Dokl Biol Sci* 453: 353–357. <https://doi.org/10.1134/S0012496613060161>
6. *Chiba S, Numakawa T, Ninomiya M, Richards MC, Wakabayashi C, Kunugi H* (2012) Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 9(1): 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.pnpb.2012.05.018>
7. *Volodina MA, Sebentsova EA, Glazova NY, Manchenko DM, Inozemtseva LS, Dolotov OV, Andreeva LA, Levitskaya NG, Kamensky AA, Myasoedov NF* (2012) Correction of long-lasting negative effects of neonatal isolation in white rats using semax. *Acta Naturae*. 4(1): 86–92.
8. *Zheng J, Dobner A, Babygirija R, Ludwig K, Takahashi T* (2009) Effects of repeated restraint stress on gastric motility in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296(5): R1358–R1365. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90928.2008>
9. *Воронина ТА, Середенин СБ, Яркова МА, Воронин МВ* (2012) Методические рекомендации по доклиническому изучению транквилизирующего (анксиолитического) действия лекарственных средств. 264–275 В: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Миронов АН (ред) Том 1. М. Гриф и К. [*Voronina TA, Seredenin SB, Yarkova MA, Voronin MV* (2012) Methodological recommendations for the preclinical study of the tranquilizing (anxiolytic) effect of drugs. 264–275 In: Guidelines for conducting preclinical studies of medicines. Mironov AN (ed) Vol 1. M. Grif and K. (In Russ)].
10. *Adan RA, Szklarczyk AW, Oosterom J, Brakkee JH, Nijenhuis WA, Schaaper WM, Meloen RH, Gispen WH* (1999) Characterization of melanocortin receptor ligands on cloned brain melano-

- cortin receptors and on grooming behavior in the rat. *Eur J Pharmacol.* 378(3): 249–258.
[https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(99\)00465-3](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(99)00465-3)
11. *Clark AJ, Forfar R, Hussain M, Jerman J, McIver E, Taylor D, Chan L* (2016) ACTH Antagonists. *Front Endocrinol (Lausanne)* 7: 101.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00101>
 12. *Konda Y, Gantz I, DelValle J, Shimoto Y, Miwa H, Yamada T* (1994) Interaction of dual intracellular signaling pathways activated by the melanocortin-3 receptor. *J Biol Chem* 269(18): 13162–13166.
 13. *Buggy JJ* (1998) Binding of alpha-melanocyte-stimulating hormone to its G-protein-coupled receptor on B-lymphocytes activates the Jak/STAT pathway. *Biochem J* 331(Pt 1): 211–216.
<https://doi.org/10.1042/bj3310211>
 14. *Shimazaki T, Chaki S* (2005) Anxiolytic-like effect of a selective and non-peptidergic melanocortin 4 receptor antagonist, MCL0129, in a social interaction test. *Pharmacol Biochem Behav* 80(3): 395–400.
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2004.11.014>
 15. *Von Frijtag JC, Croiset G, Gispén WH, Adan RA, Wiegant VM* (1998) The role of central melanocortin receptors in the activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal-axis and the induction of excessive grooming. *Br J Pharmacol* 123(8): 1503–1508.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701750>
 16. *Yamano Y, Yoshioka M, Toda Y, Oshida Y, Chaki S, Hamamoto K, Morishima I* (2004) Regulation of CRF, POMC and MC4R gene expression after electrical foot shock stress in the rat amygdala and hypothalamus. *J Vet Med Sci* 66(11): 1323–1327.
<https://doi.org/10.1292/jvms.66.1323>
 17. *Манченко ДМ, Глазова НЮ, Левицкая НГ, Андреева ЛА, Каменский АА, Мясоедов НФ* (2010) Ноотропные и анальгетические эффекты семакса при различных способах введения. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 96(10): 1014–1023. [*Manchenko DM, Glazova NYu, Levitskaya NG, Andreeva LA, Kamensky AA, Myasoedov NF* (2010) Nootropic and analgesic effects of Semax following different routes of administration. *Russ J Physiol* 96(10): 1014–1023 (In Russ)].
 18. *Ashmarin IP, Nezavibatko VN, Levitskaya NG, Koshelev VB, Kamensky AA* (1995) Design and Investigation of An ACTH_{4–10} Analogue Lacking D-Amino Acids and Hydrophobic Radicals. *Neurosci Res Commun* 16(2): 105–112.
 19. *Levitskaya NG, Vilenskii DA, Sebentsova EA, Andreeva LA, Kamensky AA, Myasoedov NF* (2010) Influence of semax on the emotional state of white rats in the norm and against the background of cholecystokinin-tetrapeptide action. *Biol Bull Russ Acad Sci* 37:186–192.
<https://doi.org/10.1134/S1062359010020147>
 20. *Dodonova SA, Bobyntsev II, Belykh AE, Telegina IA, Muzaleva YuA, Andreeva LA, Myasoedov NF* (2020) Effects of Peptides ACTH6–9 PGP and ACTH4–7-PGP on Anxiety Levels in Rats in Punished and Unpunished Behavior. *Neurosci Behav Physiol* 50: 1203–1208.
<https://doi.org/10.1007/s11055-020-01022-w>
 21. *Dolotov OV, Karpenko EA, Seredenina TS, Inozemtseva LS, Levitskaya NG, Zolotarev YA, Kamensky AA, Grivennikov IA, Engele J, Myasoedov NF* (2006) Semax, an analogue of adrenocorticotropin (4–10), binds specifically and increases levels of brain-derived neurotrophic factor protein in rat basal forebrain. *J Neurochem* 97 Suppl 1: 82–86.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03658.x>
 22. *Eremin KO, Kudrin VS, Grivennikov IA, Myasoedov NF, Rayevsky KS* (2004) Effects of Semax on dopaminergic and serotonergic systems of the brain. *Dokl Biol Sci* 394(1–6): 1–3.
 23. *Segar TM, Kasckow JW, Welge JA, Herman JP* (2009) Heterogeneity of neuroendocrine stress responses in aging rat strains. *Physiol Behav* 8; 96(1): 6–11.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.07.024>
 24. *Haller J, Halász J* (1999) Mild social stress abolishes the effects of isolation on anxiety and chlórdiazepoxide reactivity. *Psychopharmacology (Berl)* 144(4): 311–315.
<https://doi.org/10.1007/s002130051012>
 25. *Svishcheva MV, Mukhina AY, Medvedeva OA, Shevchenko AV, Bobyntsev II, Kalutskii PV, Andreeva LA, Myasoedov NF* (2020) Composition of Colon Microbiota in Rats Treated with ACTH(4–7)-PGP Peptide (Semax) under Conditions of Restraint Stress. *Bull Exp Biol Med* 169(3): 357–360.
<https://doi.org/10.1007/s10517-020-04886-7>
 26. *Svishcheva MV, Mishina YS, Medvedeva OA, Bobyntsev II, Mukhina AY, Kalutskii PV, Andreeva LA, Myasoedov NF* (2021) Morphofunctional State of the Large Intestine in Rats under Conditions of Restraint Stress and Administration of Peptide ACTH_(4–7)-PGP (Semax). *Bull Exp Biol Med* 170(3): 384–388.
<https://doi.org/10.1007/s10517-021-05072-z>
 27. *Forsythe P, Bienenstock J, Kunze WA* (2014) Vagal pathways for microbiome-brain-gut axis communication. *Adv Exp Med Biol* 817: 115–133.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0897-4_5

Peptide ACTH₄₋₇-PGP Ameliorates Behaviour and Stabilize Corticosterone Level in Rats Affected with Chronic Stress**A. O. Vorvul^{a, *}, I. I. Bobyntsev^a, M. V. Svishcheva^a, O. A. Medvedeva^a,
A. Yu. Mukhina^a, and L. A. Andreeva^b**^a *Kursk State Medical University, Kursk, Russia*^b *Institute of Molecular Genetics of Russian Academy of Science, Moscow, Russia***e-mail: vorvul1996@mail.ru*

ACTH₄₋₇-PGP peptide has a wide range of neurotropic effects, including anxiolytic and antidepressant effects in stress conditions. At the same time, one of the important issues is to clarify the role of corticosterone in behavioral reactions against the background of repeated administration of ACTH₄₋₇-PGP in chronic stress. The aim of the study was to study the effect of ACTH₄₋₇-PGP on behavior and corticosterone level in rats and their relationship under chronic stress. ACTH₄₋₇-PGP was administered to male Wistar rats at doses of 5, 50, 150, 450 µg/kg for 14 days 12–15 minutes before stress exposure. The behavior of animals was studied in open field test and elevated plus-maze test, the concentration of corticosterone was determined with ELISA. It was found that the peptide under conditions of chronic stress had an anxiolytic effect and reduced anxiety levels at doses of 50 and 150 µg/kg ($p < 0.05$ – 0.01). In all doses used, ACTH₄₋₇-PGP reduced the concentration of corticosterone in the blood serum of stressed rats by 28.6–34.2% ($p < 0.05$). Correlation analysis showed that after administration of ACTH₄₋₇-PGP at a dose of 50 µg/kg, a decrease in anxiety had a direct strong association with a decrease in corticosterone levels.

Keywords: ACTH₄₋₇-PGP, chronic stress, open field, elevated plus-maze, corticosterone

РОЛЬ СЕРОВОДОРОДА В РЕЛАКСАЦИИ КАПСУЛЫ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ ПРИ ЛПС-ИНДУЦИРОВАННОМ ВОСПАЛЕНИИ

© 2021 г. Г. И. Лобов*

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

**E-mail: lobovgi@infran.ru*

Поступила в редакцию 18.06.2021 г.

После доработки 03.09.2021 г.

Принята к публикации 07.09.2021 г.

Сероводород принимает участие в регуляции функций различных органов как в физиологических условиях, так и при патологии, и, в частности, является важнейшим участником воспалительного процесса. В данном исследовании мы изучили роль и механизмы действия сероводорода в липополисахарид-индуцированной релаксации капсулы брыжеечных лимфатических узлов быка. Исследование проведено на полосках капсулы брыжеечных лимфатических узлов быков. Изолированные полоски капсулы лимфатических узлов инкубировали на протяжении 6 ч в среде F-10 Nam с добавлением липополисахарида (ЛПС *Escherichia coli* O55:B5). По окончании инкубирования препараты исследовали на миографической установке. Сократительные свойства оценивали посредством применения фенилэфрина, а способность к релаксации – посредством применения папаверина. Участие H_2S и NO в ЛПС-индуцированной релаксации определяли посредством применения специфических ингибиторов. Инкубация полосок капсулы лимфатических узлов в среде F-10 Nam + ЛП приводила к ингибированию фазных сокращений и снижению уровня тонического напряжения препаратов. Стойкое угнетение сократительной функции гладкомышечных клеток капсулы лимфатических узлов происходило под влиянием H_2S , синтезируемого ферментами цистатионин- γ -лиазой, цистатионин- β -синтазой и 3-меркаптосульфуртрансферазой, а также NO , продуцируемого индуцибельной NO -синтазой. Полученные данные показали, что H_2S является одним из основных веществ, достаточно быстро образующихся при моделировании воспаления в лимфатических узлах. Мы полагаем, что H_2S является важнейшей молекулой, запускающей совместно с NO воспалительное ремоделирование лимфатических узлов, способствующее быстрому увеличению их размеров.

Ключевые слова: лимфатический узел, капсула, гладкомышечные клетки, липополисахарид, сероводород, воспаление

DOI: 10.31857/S0869813921110066

ВВЕДЕНИЕ

Лимфатическая сосудистая сеть, включающая лимфатические капилляры, лимфатические сосуды и лимфатические узлы (ЛУ), является одним из основных участников воспаления и играет важную роль как в развитии, так и в разрешении воспалительного процесса [1, 2]. Исторически сложилось так, что длительное время при исследовании функций ЛУ внимание специалистов было сконцентрировано

но в основном на изучении гемопоэтических клеток, которые участвуют в распознавании антигенов (дендритные клетки) и иммунном ответе (В- и Т-лимфоциты) [3, 4]. Позднее появились работы, в которых была показана важная роль лимфатических эндотелиальных клеток в осуществлении иммунных функций ЛУ [5, 6]. Было установлено, что в ЛУ располагаются по меньшей мере три отдельные группы лимфатических эндотелиоцитов (ЛЭК субкапсулярного синуса, кортикальные и медуллярные ЛЭК). Было показано также, что помимо различной локализации, разные типы ЛЭК экспрессируют разнообразные хемокины, регулирующие миграцию иммунных клеток в пределах ЛУ [7]. Более того, недавно было показано, что лимфатические эндотелиальные клетки ЛУ являются мощными презентаторами аутоантигенов и участвуют в поддержании толерантности периферических Т-клеток [8]. В последние годы также появились данные о том, что стромальные клетки ЛУ негематопоэтического происхождения выполняют не только опорно-трофическую функцию, но и принимают участие в инициации и поддержании иммунитета [9]. Считается, что различные стромальные клетки играют активную роль в иммунном ответе благодаря их взаимодействию с дендритными клетками и лимфоцитами [10]. Чтобы приспособиться к притоку большого количества нейтрофилов, макрофагов, дендритных клеток и лимфоцитов, задействованных во время иммунного ответа, стромальные клетки способны быстро делиться с целью ремоделирования ЛУ [11].

Уникальной особенностью ЛУ является их способность значительно изменять размер: при воспалении их объем может увеличиваться в 10–20 раз по сравнению с нормальным размером в течение нескольких дней, и этот рост сопровождается пролиферативным расширением и ремоделированием сосудисто-стромального компартмента ЛУ с сохранением его основополагающей структуры [12]. В этом процессе принято выделять несколько фаз: фаза инициации, фаза расширения и фаза восстановления [13]. Опубликованы результаты исследований нескольких лабораторий, в которых показано, что среди пяти подмножеств стромальных клеток ЛУ только фибробластные ретикулярные клетки обладают выраженными сократительными способностями и экспрессируют α -актин и легкую цепь миозина гладких мышц [14, 15]. Предполагают, что именно эти клетки играют основную роль в ремоделировании ЛУ при воспалении, однако механизм, посредством которого они способствуют быстрому увеличению размеров ЛУ, остается неясен [16].

ЛУ, являющиеся основными органами в системе адаптивного иммунитета, интенсивно изучаются в различных лабораториях [11, 17]. В Pubmed по ключевым словам “endothelial cells in a lymph node” найдено более 1600 работ за последние 15 лет, а по словам “stromal cells in a lymph node” – более 1100 работ. При этом на фоне массива публикаций о роли стромальных клеток в процессе воспалительного ремоделирования ЛУ удивительно мало данных об участии в этом процессе клеток капсулы ЛУ. Между тем, как было показано в наших работах, именно капсула, содержащая значительное количество соединительнотканых волокон и гладкомышечных клеток (ГМК), является наиболее жестким компонентом ЛУ, выполняющим функцию его каркаса и определяющим размеры и форму ЛУ [18, 19].

В более поздних наших работах было установлено, что при моделировании воспаления сократительная функция капсулы брыжеечных ЛУ была значительно изменяется: прекращаются быстрые фазные сокращения и происходит довольно быстрое снижение тонического напряжения [20]. Нами также было показано, что в физиологических условиях в регуляции фазных и тонических сокращений капсулы мезентериальных ЛУ была принимает участие H_2S [21]. Роль H_2S в воспалительном процессе и сепсисе была предметом дискуссий в течение длительного времени. К настоящему времени общепризнано, что H_2S является важным фактором регуляции функций органов при разного рода патологии, в т.ч. и при воспалении [22].

В настоящей работе была поставлена задача изучить роль эндогенного H_2S в регуляции сократительной функции ГМК капсулы мезентериальных ЛУ быка и их моделировании при ЛПС-индуцированном воспалении на модели, описанной ранее [20]. Поскольку “активные” компоненты, ответственные за биологические эффекты H_2S , в настоящее время не полностью определены [23], в настоящей статье термин H_2S будет объединять все формы H_2S (в т.ч. и полисульфиды), которые будут присутствовать в растворе при физиологических значениях рН и температуры.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал для исследования забирали на пункте забоя животных ЗАО “Племенной завод “Приневское”. ЛУ первого порядка забирали из брыжейки быков чернопестрой породы (*Bos taurus taurus*) в возрасте 16–18 мес. через 15 мин после обескровливания животных, промывали в холодном физиологическом солевом растворе (PSS) и вырезали из них полоски капсулы с небольшим количеством коркового вещества. Полоски капсулы ($n = 54$ от 23 животных) доставляли в лабораторию в охлажденном (2–4°C) PSS. В лаборатории полоски капсулы ЛУ тщательно очищали от окружающей соединительной ткани и перикапсулярного жира и готовили препараты для исследования (полоски капсулы ЛУ длиной 10 мм и шириной 2 мм). У части полосок капсулы ЛУ удаляли субкапсулярный синус (SS). Контроль качества удаления эндотелия SS осуществляли посредством оценки релаксационного ответа полосок капсулы ЛУ на ацетилхолин (отсутствие ответа свидетельствовало о качественной дезэндотелизации).

Подготовленные полоски капсулы ЛУ были разделены на несколько групп (табл. 1). Препараты инкубировали в среде F-10 Ham (“ДИА-М”, Россия) с добавлением бензилпенициллина (100 ЕД/мл) и стрептомицина (10 мг/мл) при 37°C в течение 6 ч. В среду F-10 Ham для всех групп был также добавлен индометацин (10 мкМ) для подавления возможного образования вазоактивных простаноидов. В среду F-10 Ham, в которой инкубировали полоски 3–4 групп был добавлен липополисахарид (ЛПС) (20 мкг/мл), в среду для 5-й и 6-й групп был добавлен ЛПС + актиномицин D (ингибитор синтеза РНК), а в среду для 7-й и 8-й групп – ЛПС + циклогексимид (ингибитор синтеза белка).

По завершении инкубации препараты дважды промывали PSS и размещали в камере миографа с датчиком силы FORT-10 (WPI, США). Информацию от датчика после преобразования в АЦП “Labmaster” записывали на жесткий диск компьютера. Эксперименты проводили при непрерывном протоке PSS следующего состава (мМ): NaCl – 120.4; KCl – 5.9; CaCl₂ – 2.5; MgCl₂ – 1.2; NaH₂PO₄ – 1.2; NaHCO₃ – 15.5; глюкоза – 11.0; бычий сывороточный альбумин – 10 г/л. PSS сатурировали газовой смесью, состоящей из 95% O₂ и 5% CO₂. Температуру раствора в камере поддерживали на уровне $38.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$. Препараты подвергали исходному натяжению в 16 мН. Такая величина натяжения была выбрана в связи с тем, что после подобного натяжения и 30-минутной стабилизации уровень тонического напряжения интактных полосок капсулы ЛУ (1-я группа) устанавливался на уровне 10.3 ± 1.2 мН, что соответствовало трансмуральному давлению около 4 см водн. ст. Для проверки сократительных реакций полосок применяли гиперкалиевый раствор (заменяли 55 мМ NaCl в PSS на KCl). После оценки сократительной способности препаратов их дважды промывали PSS.

В настоящем исследовании использовали следующие вещества: ЛПС *Escherichia coli* O55:B5 (Sigma-Aldrich), 100 мкг/мл; бензилпенициллина натриевая соль (“Красфарма”, Россия), 100 ЕД/мл; стрептомицин (“Фармасинтез”, Россия), 10 мг/мл. Остальные реактивы приобретены в Sigma-Aldrich и использовались в следующих концентрациях: актиномицин D (actinomycin D), 100 нМ; циклогекси-

Таблица 1. Особенности полосок капсулы мезентериальных ЛУ быка разных групп и состав среды для инкубации

№ группы (количество полосок)	Особенности препаратов	Инкубационная среда
1 (9)	Полоска капсулы с субкапсулярным синусом (SS+)	Среда F-10 Ham
2 (8)	Полоска капсулы без субкапсулярного синуса (SS–)	Среда F-10 Ham
3 (14)	Полоска капсулы (SS+)	Среда F-10 Ham + ЛПС
4 (15)	Полоска капсулы (SS–)	Среда F-10 Ham + ЛПС
5 (9)	Полоска капсулы (SS+)	Среда F-10 Ham + ЛПС + актиномицин D
6 (10)	Полоска капсулы (SS–)	Среда F-10 Ham + ЛПС + актиномицин D
7 (8)	Полоска капсулы с (SS+)	Среда F-10 Ham + ЛПС + циклогексимид
8 (7)	Полоска капсулы (SS–)	Среда F-10 Ham + ЛПС + циклогексимид

SS+ – препараты с сохраненным субкапсулярным синусом, SS– – препараты, у которых субкапсулярный синус был удален.

мид (Cycloheximide), 10 мкМ; 1400W (N-([3-(Aminomethyl)phenyl] methyl)ethanimidamide dihydrochloride), 20 мкМ; DL-пропаргилглицин (DL-Propargylglycine, PPG), 10 мкМ; аминоксациетат (Aminoxy)acetic acid hemihydrochloride, АОАА), 100 мкМ; L-аспарагиновая кислота (L-Aspartic acid, (L-Asp), 10 мкМ; фенилэфрин, ((R)-(-)-Phenylephrine hydrochloride, PE), 100 мкМ; папаверин, (Papaverine hydrochloride, PP), 40 мкМ; ацетилхолин (acetylcholine chloride), 1 мкМ; индометацин (Indomethacin), 3 мкМ.

Все вещества растворяли в PSS непосредственно перед экспериментом. Актиномицин D и индометацин предварительно растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО), циклогексимид – в этаноле, и перед экспериментом добавляли необходимое количество концентрата в PSS. ДМСО в разведении 1/1000 и этанол в разведении 1/2000 не вызывали статистически значимых изменений параметров сократительной активности полосок капсулы ЛУ. Детали экспериментов с применением химических веществ подробно описаны в разделе “Результаты исследования”

Все процедуры, выполненные в данном исследовании, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям биоэтической комиссии Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы “StatSoft STATISTICA 6.1.478”. Для проверки нормальности распределения данных применяли критерий Шапиро–Уилка. Поскольку данные соответствовали распределению Гаусса, они представлены в виде среднего арифметического значения и стандартной ошибки ($M \pm m$). Для сравнения данных использовали *t*-критерий Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полоски капсулы ЛУ (SS+) и (SS–), инкубированные в течение 6 ч в среде F-10 Ham, после промывки и 30-минутной выдержки в PSS в камере миографа имели стабильный уровень тонуса, на фоне которого регистрировались ритмичные фазные сокращения. Величина тонуса и параметры фазных сокращений препаратов представлены в табл. 2. Полоски капсулы ЛУ без субкапсулярного синуса имели

Таблица 2. Параметры сокращений полосок капсулы мезентериальных ЛУ быка после инкубации в среде F-10 Ham и в среде F-10 Ham + ЛПС с актиномицином D и циклогексимидом

№ группы полосок капсулы ЛУ	Особенности препаратов и их инкубации	Тонус, мН	Амплитуда фазных сокращений, мН	Частота, мин ⁻¹
1	(SS+)	9.8 ± 0.4	8.3 ± 0.4	0.96 ± 0.07
2	(SS-)	10.9 ± 0.5*	8.6 ± 0.5	1.13 ± 0.07*
3	(SS+) + ЛПС	7.1 ± 0.3 ^{&}	—	—
4	(SS-) + ЛПС	8.8 ± 0.6 [#]	—	—
5	(SS+) + ЛПС + актиномицин D	9.4 ± 0.5*	7.7 ± 0.3*	0.91 ± 0.06
6	(SS) + ЛПС + актиномицин D	9.7 ± 0.4	7.9 ± 0.5 [@]	1.06 ± 0.07
7	(SS+) + ЛПС + циклогексимид	9.9 ± 0.6	7.5 ± 0.4*	0.91 ± 0.05
8	(SS-) + ЛПС + циклогексимид	10.3 ± 0.5	7.8 ± 0.5 [@]	1.04 ± 0.07 [@]

* – различия достоверны по отношению к показателям интактных полосок первой группы, $p < 0,05$; & – различия достоверны по отношению к показателям интактных полосок первой группы, $p < 0,01$; @ – различия достоверны по отношению к показателям деэнтотелизированных полосок второй группы, $p < 0,05$; # – различия достоверны по отношению к показателям деэнтотелизированных полосок второй группы, $p < 0,01$.

более высокий тонус и несколько бóльшую частоту фазных сокращений по сравнению с интактными.

Поскольку данных об эффектах ЛПС на сократительную функцию ГМК капсулы ЛУ крайне мало, мы оценили параметры сократительной активности интактных и деэнтотелизированных полосок капсулы ЛУ после добавления в инкубационную среду ЛПС (через 1 и через 6 ч). Исследование препаратов, инкубированных в среде с ЛПС на протяжении 1 ч, не выявило достоверных изменений параметров их сократительной функции по сравнению с препаратами 1-й и 2-й групп (не показано). Полоски капсулы ЛУ, обработанные ЛПС на протяжении 6 ч (группы 3 и 4), имели более низкий уровень тонуса, ни в одном из препаратов этих групп не было зарегистрировано спонтанных фазных сокращений (табл. 2).

С целью исследования механизмов действия ЛПС на капсулу мезентериальных ЛУ быка в одной из серий опытов (группы 5 и 6) одновременно с ЛПС в среду был добавлен актиномицин D (ингибитор синтеза РНК), а в другой (группы 7 и 8) – циклогексимид (ингибитор синтеза белка). После 6-часовой инкубации, полоски капсулы ЛУ исследовали по стандартной схеме. Было установлено, что параметры сократительной активности полосок капсулы ЛУ групп 5–8 мало отличались от аналогичных в группах 1 и 2. Частота фазных сокращений полосок капсулы ЛУ групп 5–8 были несколько меньше по сравнению с аналогичными препаратами групп 1 и 2, однако это уменьшение было незначительным и составляло в различных экспериментах 3–7% от величин, зарегистрированных в группах 1 и 2.

С целью исследования релаксационных свойств полосок капсулы ЛУ, после инкубации в среде F-10 Ham полоски дважды промывали PSS и помещали в камеру миографа. Все препараты подвергали исходному натяжению в 16 мН. После 30-минутного нахождения в камере миографа устанавливался стабильный уровень тонического напряжения полосок (табл. 2 и рис. 1). Затем в камеру миографа вводили раствор папаверина (40 мкМ), под действием которого препараты максимально расслаблялись. На рис. 1 представлены фрагменты записи двух экспериментов (на рис. 1а – запись изменения напряжения полоски капсулы ЛУ, инкубированной в среде F-10 Ham + ЛПС, на рис 1б – запись изменения напряжения полоски, инкубированной в среде F-10 Ham без ЛПС).

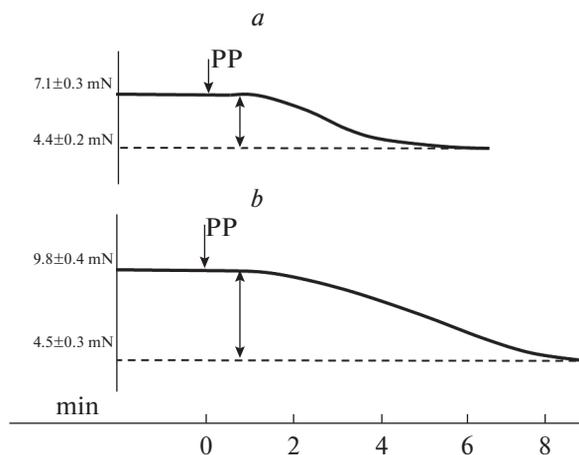


Рис. 1. Реакции полосок капсулы ЛУ на папаверин. *a* – реакция полоски капсулы ЛУ, инкубированной в среде F-10 Ham + ЛПС; *b* – реакция полоски капсулы ЛУ, инкубированной в среде F-10 Ham без ЛПС. Левая часть кривой демонстрирует тонус препаратов через 30 мин после помещения в камеру миографа и создания исходного натяжения в 16 мН. ↓PP – момент добавления в PSS папаверина. Правая часть кривой показывает тонус препаратов под влиянием папаверина. Вертикальная стрелка показывает амплитуду релаксации полосок. Внизу – шкала времени (в мин).

Папаверин-индуцированная релаксация полосок капсулы ЛУ разных групп отличалась. Амплитуда релаксации препаратов, инкубированных в среде F-10 Ham без ЛПС, была значительно больше по сравнению с таковой полосок капсулы ЛУ, инкубированных с ЛПС. Однако детальный анализ показал, что обе группы препаратов под влиянием папаверина достигли примерно одинакового уровня напряжения. Эти данные являются чрезвычайно интересными и свидетельствуют о том, что ГМК полосок капсулы ЛУ, инкубированные с ЛПС, уже были значительно ослаблены еще до воздействия папаверина.

В следующих экспериментах с целью изучения сигнальных путей, активируемых или ингибируемых ЛПС в клетках капсулы ЛУ и приведших к дилатации интактных полосок капсулы ЛУ (SS+), в PSS, омывающий препараты, добавляли ингибиторы индуцибельной NO-синтазы (iNOS) – 1400W, цистатионин-γ-лиазы (CSE) – DL-Proargylglycine, цистатионин-β-синтазы (CBS) – аминоксациацетат и 3-меркаптопуриватсульфуртрансферазы (3-MST) – L-Aspartic acid. В первой серии опытов по завершении инкубирования полосок капсулы ЛУ в среде F-10 Ham и в среде F-10 Ham + ЛПС препараты размещали в камере миографа, задавали стандартное натяжение и выдерживали 30 мин для стабилизации. После этого в омывающий раствор добавляли фенилэфрин (PE) и через 5 мин измеряли величину тонического напряжения, развиваемого полосками под действием PE. В ответ на применение PE, полоски капсулы ЛУ реагировали выраженным повышением тонуса. Сократительные реакции полосок капсулы ЛУ, инкубированных в среде F-10 Ham, имели бóльшую амплитуду по сравнению с реакциями полосок капсулы ЛУ, инкубированных в среде F-10 Ham + ЛПС. Затем заменяли раствор с PE на PSS, через 10 мин в PSS добавляли 1400W и через 20 мин вводили PE и вновь измеряли величину тонического напряжения, сравнивая ее с предыдущим показателем.

На других полосках капсулы ЛУ исследования проводили по такой же схеме, но в раствор добавляли ингибиторы ферментов, синтезирующих H₂S: PPG + AOAА + L-Asp. На

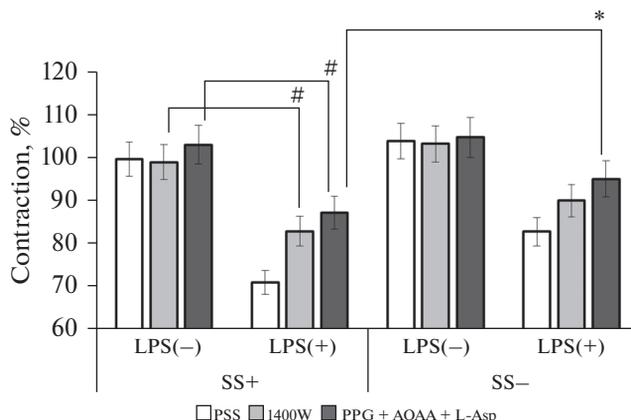


Рис. 2. Амплитуда PE-индуцированного сокращения intactных полосок капсулы брыжеечных ЛУ быка (SS+) и полосок капсулы ЛУ с удаленным субкапсулярным синусом (SS-) после инкубирования в среде F-10 Ham (LPS-) и в среде F-10 Ham + LPS (LPS+) на фоне действия ингибитора индуцибельной NO-синтазы (1400W) и смеси ингибиторов H₂S-продуцирующих ферментов (DL-Propargylglycine + + аминоксиацетат + L-Aspartic acid). PSS – физиологический солевой раствор. Амплитуда PE-индуцированного сокращения intactных полосок капсулы брыжеечных ЛУ быка в PSS принята за 100%.

фоне действия ингибиторов H₂S-продуцирующих ферментов, амплитуда PE-индуцированной сократительной реакции полосок капсулы ЛУ, инкубированных в среде F-10 Ham + ЛПС, увеличивалась. В другой серии опытов с целью определения роли эндотелия в ЛПС-индуцированной дилатации капсулы ЛУ, исследования были проведены на полосках капсулы ЛУ с удаленным субкапсулярным синусом. Опыты были проведены по такой же схеме, концентрации применяемых химических веществ были одинаковыми. Результаты этих двух серий опытов представлены на рис. 2.

Поскольку ЛПС оказывал на капсулу ЛУ релаксирующий эффект, а на рис. 2 представлены величины сократительных реакций препаратов, то анализировать эти данные достаточно сложно. Поэтому нами представлены результаты этих же исследований в другом виде. Мы исходили из того, что разница в амплитудах PE-индуцированного сокращения полосок капсулы ЛУ, инкубированных в среде F-10 Ham и в среде F-10 Ham + ЛПС, по сути своей представляет собой величину релаксации препаратов, вызванной действием ЛПС. Поэтому на рис. 3 мы представили данные о величинах релаксации полосок капсулы ЛУ (intactных и деэндотелизированных), вызванной действием ЛПС в PSS и на фоне применения ингибиторов ферментов, продуцирующих NO и H₂S. Применение 1400W сопровождалось значительным уменьшением амплитуды релаксации капсулы ЛУ. В свою очередь, действие комплекса ингибиторов синтеза H₂S также приводило к значительному ослаблению ЛПС-индуцированной релаксации капсулы ЛУ.

Поскольку ферментативный путь образования H₂S в большинстве биологических тканей считается основным [24], то в последующих опытах с целью определения конкретных ферментов, продуцирующих H₂S в капсуле ЛУ при воспалении, мы применяли по одному ингибитору. Полоски капсулы ЛУ с сохраненным субкапсулярным синусом подвергали воздействию PE и оценивали амплитуду сокращения. Затем удаляли PE, в раствор вводили один из ингибиторов H₂S-продуцирующих ферментов и через 20 мин в раствор вновь добавляли PE. Измеряли амплитуду

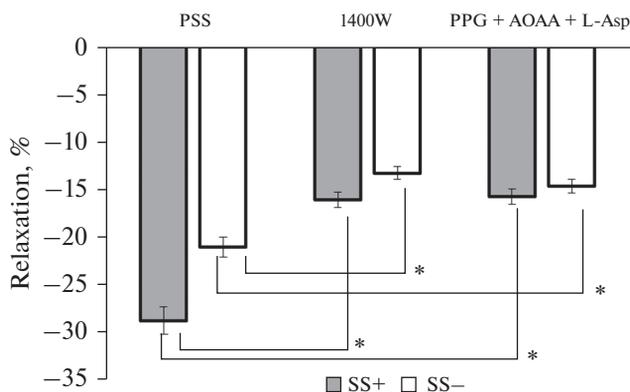


Рис. 3. Амплитуда релаксации интактных полосок капсулы брыжеечных ЛУ быка (SS+) и полосок капсулы ЛУ с удаленным субкапсулярным синусом (SS-) после инкубирования в среде F-10 Ham + ЛПС на фоне действия ингибитора индуцибельной NO-синтазы (1400W) и смеси ингибиторов H_2S -продуцирующих ферментов (DL-Propargylglycine + аминоксисацетат + L-Aspartic acid). PSS – реакции в физиологическом растворе. Различия достоверны: * – $p < 0.01$.

сократительной реакции и сравнивали ее с амплитудой PE-индуцированного сокращения в растворе без ингибитора. Разницу в амплитудах PE-индуцированного сокращения полосок капсулы ЛУ в физиологическом растворе и в растворе с ингибитором считали релаксацией, вызванной H_2S , продуцируемым ингибированным ферментом. Данные этой серии опытов представлены на рис. 4. Применение каждого из трех ингибиторов ферментов, синтезирующих H_2S , сопровождалось достоверным увеличением амплитуды сокращения, т.е. уменьшением релаксирующего эффекта ЛПС (рис. 4a). Для сравнения на рис. 4b представлены результаты аналогичных экспериментов на полосках капсулы ЛУ, инкубированных в среде F-10 Ham без ЛПС. Представляется интересным, что тенденция к увеличению амплитуды PE-индуцированного сокращения (хотя и недостоверное) в этих препаратах наблюдалось только при ингибировании цистатионин- γ -лиазы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

К настоящему времени хорошо известно, что H_2S участвует в регуляции функций сердечно-сосудистой системы, желудочно-кишечного тракта, нервной системы и почек, а также является важнейшим участником воспалительного процесса [25]. Помимо этого, H_2S способен оказывать влияние на различные аспекты иммунного ответа, как врожденного (регуляция функций нейтрофилов, макрофагов и тучных клеток [26]), так и приобретенного – стимуляция дифференцировки Т-клеток [27]. Что касается исследований влияния H_2S на органы лимфатической сосудистой системы, обеспечивающие транспорт лимфы – лимфатические сосуды и ЛУ, то подобные работы единичны, зарегистрированы лишь эффекты экзогенного H_2S и продемонстрированы вероятные сигнальные пути, вовлеченные в ответ на применение H_2S [21, 28].

Как уже указывалось во “Введении”, в задачу нашего исследования не входило изучение иммунных клеток ЛУ и регуляции их взаимодействия с дендритными клетками. Задача была более простой (хотя и менее изученной) – оценить роль эндогенного H_2S в релаксации капсулы ЛУ в процессе его воспалительного ремоде-

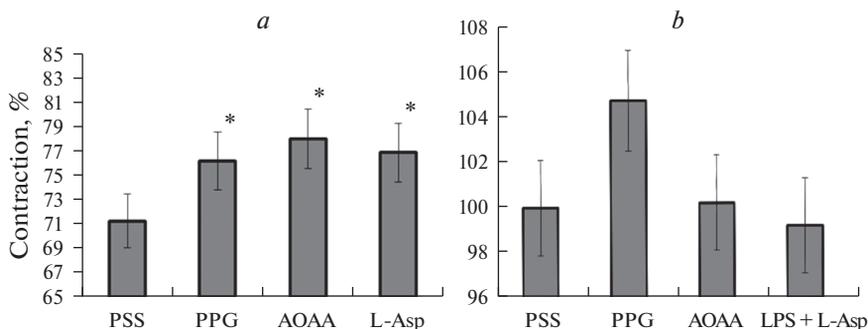


Рис. 4. Амплитуда РЕ-индуцированного сокращения полосок капсулы ЛУ с сохраненным субкапсулярным синусом, инкубированных в среде F-10 Ham + ЛПС (*a*) и в среде F-10 Ham без LPS (*b*) в физиологическом растворе (PSS) и при действии ингибиторов H_2S -продуцирующих ферментов: цистатионин- γ -лиазы (PPG), цистатионин- β -синтазы (AOAA) и 3-меркаптопуриват сульфуртрансферазы (L-Asp). Амплитуда сокращения препаратов показана в % от амплитуды сокращения полосок капсулы ЛУ, инкубированных в среде F-10 Ham без ЛПС. * – различия достоверны по отношению к величине сокращения препаратов в PSS, $p < 0.05$.

лирования. ЛУ – это очень динамические структуры, которые должны иметь возможность в процессе адаптивных реакций быстро увеличиваться в размерах с целью рекрутирования лимфоцитов и дендритных клеток и сохранять при этом свою структурную целостность. Подобное уникальное свойство ЛУ обеспечивается сетью фибробластических ретикулярных клеток (FRC), формирующих довольно жесткий каркас, поддерживающий внутреннюю структуру ЛУ [29]. Помимо FRC, в процесс быстрого и обширного ремоделирования ЛУ вовлекаются и другие стромальные клетки, формирующие основу ЛУ. Основными причинами, приводящими к увеличению размеров ЛУ сразу после инфицирования или иммунизации, являются расширение афферентных лимфатических сосудов, что приводит к возрастанию рекрутирования антигенпрезентирующих ДК с периферии [30], а также увеличение количества, размеров и проницаемости вен с высоким эндотелием для облегчения проникновения в ткань ЛУ наивных лимфоцитов [31]. Увеличение размеров ЛУ также связано с блокированием выхода лимфоцитов из ЛУ [32, 33]. В итоге количество антигенпрезентирующих клеток и лимфоцитов в дренирующих ЛУ сильно увеличивается. Реконструкция плотной жесткой сети FRC в ЛУ в процессе воспалительного ремоделирования изучена лишь частично [30]. Что же касается изменений структуры и функции капсулы ЛУ при воспалительном ремоделировании, то таковых данных к настоящему времени практически нет.

Результаты проведенного нами исследования показывают, что кратковременное (на протяжении 1 ч) действие ЛПС на капсулу брыжеечных ЛУ быка не оказывает влияния на параметры ее сократительной функции (уровень тонического напряжения и параметры фазных сокращений практически не изменялись). В то же время 6-часовое воздействие ЛПС приводило к ингибированию фазных сокращений и выраженному снижению уровня тонического напряжения капсулы. Полученные данные дают основания предположить, что в процессе 6-часовой инкубации препаратов в среде с ЛПС под его влиянием происходит экспрессия ряда генов, приводящая к образованию белков, оказывающих ингибирующее влияние на сократительную функцию ГМК капсулы ЛУ. Данное предположение подтверждается результатами экспериментов с добавлением в инкубационную среду актиномицина D (ингибитора синтеза РНК), или циклогексимида (ингибитора синтеза белка). На-

личие в инкубационной среде ингибиторов препятствовало развитию ЛПС-индуцированного угнетения сократительной функции ГМК клеток капсулы ЛУ (табл. 2).

Какие белки экспрессируются в капсуле ЛУ под действием ЛПС? В нашей предыдущей работе было показано, что такими белками могут быть индуцибельная NO-синтаза и циклооксигеназа-2 [20]. Данные настоящего исследования (результаты экспериментов с применением специфического ингибитора iNOS – 1400W) также подтверждают, что ЛПС способствует экспрессии в капсуле ЛУ индуцибельной NO-синтазы, которая способна производить большие количества NO [34], приводящие к мощной релаксации ГМК капсулы ЛУ.

Поскольку ранее нами было доказано, что в физиологических условиях H_2S оказывает выраженный релаксирующий эффект на капсулу ЛУ быка [21], естественно было предположить, что этот газотрансмиттер принимает участие в регуляции функций ГМК капсулы ЛУ при воспалении. Поэтому в следующей серии опытов мы оценили сократительные свойства ГМК капсулы после воздействия на нее ингибиторов H_2S -синтезирующих ферментов. На первоначальном этапе мы применяли смесь ингибиторов (DL-пропаргилглицин + аминоксиацетат + L-аспарагиновая кислота). На фоне действия ингибиторов H_2S -продуцирующих ферментов амплитуда PE-индуцированной сократительной реакции полосок капсулы ЛУ, инкубированных в среде F-10 Ham + ЛПС, увеличивалась, что подтверждает участие H_2S в релаксации ГМК капсулы ЛУ, обработанного ЛПС. Близкие результаты были получены также при исследовании по аналогичной схеме полосок капсулы ЛУ с удаленным субкапсулярным синусом, это дает основания предположить, что основным источником эндогенного H_2S являются не эндотелиальные клетки субкапсулярного синуса, а гладкомышечные клетки капсулы ЛУ.

Поскольку наличие в растворе смеси ингибиторов трех ферментов, продуцирующих H_2S в капсуле ЛУ, значительно уменьшало амплитуду релаксации капсулы ЛУ, естественно вставал вопрос о значимости каждого из ферментов в этом процессе. Следующая серия опытов была поставлена с целью получения ответа на этот вопрос. Применение ингибиторов в действующих концентрациях по одному на разных препаратах (с целью исключения кумулятивного и других нежелательных эффектов) показало, что в капсуле ЛУ при моделировании воспаления экспрессируются все три H_2S -синтезирующих фермента: цистатионин- γ -лиаза (CSE), цистатионин- β -синтаза (CBS) и 3-меркаптопуриватсульфуртрансфераза (3-MST). Данные наших экспериментов показывают, что роль каждого из них в ЛПС-индуцированной релаксации капсулы ЛУ была примерно одинаковой. При этом необходимо отметить интересный факт: полоски капсулы ЛУ, не подвергавшиеся воздействию ЛПС, наиболее активно реагировали на применение DL-пропаргилглицина, это дает основание предположить, что в физиологических условиях в капсуле ЛУ наиболее активна CSE.

При всей важности и многообразии механизмов действия H_2S в капсуле ЛУ важно не забывать об NO, синтезируемым в этой же структуре. Одновременная экспрессия в капсуле ЛУ H_2S и NO позволяет существенно усилить релаксационный эффект: способствует образованию биологически активных гибридных форм S/N, H_2S индуцирует высвобождения NO из его различных стабильных “пулов” и повышает удельную активность NO-синтаз. H_2S стабилизирует растворимую гуанилатциклазу в восстановленной форме, чувствительной к NO, а также ингибирует сосудистую фосфодиэстеразу (PDE5), тем самым продлевая биологический период полужизни cGMP. Наконец, полисульфиды, производные H_2S , непосредственно активируют cGMP-зависимую протеинкиназу (PKG). В итоге, H_2S , сам являясь мощным релаксантом, является еще и важным эндогенным усилителем передачи

сигналов NO, способствуя дополнительной релаксации [35]. Таким образом, наличие в капсуле воспаленного ЛУ двух газотрансмиттеров способствует ее достаточно быстрой и мощной релаксации, что позволяет ЛУ увеличиться в объеме и начать задерживать в синусах ЛУ дендритные клетки и лимфоциты, создавая условия для развития иммунных реакций.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов относительно публикации данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Автор самостоятельно выполнил весь объем работы от идеи работы до редактирования рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *von der Weid PY, Muthuchamy M* (2010) Regulatory mechanisms in lymphatic vessel contraction under normal and inflammatory conditions. *Pathophysiology* 17: 263–276. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2009.10.005>
2. *Liao S, von der Weid PY* (2015) Lymphatic system: an active pathway for immune protection. *Semin Cell Dev Biol* 38: 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.11.012>
3. *Wülfing C, Günther HS* (2015) Dendritic cells and macrophages neurally hard-wired in the lymph node. *Sci Rep* 19:5: 16866. <https://doi.org/10.1038/srep16866>
4. *Willard-Mack CL* (2006) Normal structure, function, and histology of lymph nodes. *Toxicol Pathol* 34(5): 409–424. <https://doi.org/10.1080/01926230600867727>
5. *Lucas ED, Tamburini BAJ* (2019) Lymph Node Lymphatic Endothelial Cell Expansion and Contraction and the Programming of the Immune Response. *Front Immunol* 10: 36. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00036>
6. *Jalkanen S, Salmi M* (2020) Lymphatic endothelial cells of the lymph node. *Nat Rev Immunol* 20(9): 566–578. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0281-x>
7. *Bonavita O, Mollica Poeta V, Setten E, Massara M, Bonocchi R* (2017) ACKR2: An Atypical Chemokine Receptor Regulating Lymphatic Biology. *Front Immunol* 7: 691. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00691>
8. *Cohen JN, Guidi CJ, Tewalt EF, Qiao H, Rouhani SJ, Ruddell A, Farr AG, Tung KS, Engelhard VH* (2010) Lymph node-resident lymphatic endothelial cells mediate peripheral tolerance via Aire-independent direct antigen presentation. *J Exp Med* 207(4): 681–688. <https://doi.org/10.1084/jem.20092465.9>
9. *Saxena V, Li L, Paluskiewicz C, Kasinath V, Bean A, Abdi R, Jewell CM, Bromberg JS* (2019) Role of lymph node stroma and microenvironment in T cell tolerance. *Immunol Rev* 292(1): 9–23. <https://doi.org/10.1111/imr.12799>
10. *Reynoso ED, Lee JW, Turley SJ* (2009) Peripheral tolerance induction by lymph node stroma. *Adv Exp Med Biol* 633: 113–112. https://doi.org/10.1007/978-0-387-79311-5_10
11. *Thierry GR, Gentek R, Bajenoff M* (2019) Remodeling of reactive lymph nodes: Dynamics of stromal cells and underlying chemokine signaling. *Immunol Rev* 289(1): 42–61. <https://doi.org/10.1111/imr.12750>
12. *Acton SE, Reis e Sousa C* (2016) Dendritic cells in remodeling of lymph nodes during immune responses. *Immunol Rev* 271(1): 221–229. <https://doi.org/10.1111/imr.12414>

13. *Zhu M, Fu YX* (2011) The role of core TNF/LIGHT family members in lymph node homeostasis and remodeling. *Immunol Rev* 244(1): 75–84.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01061.x>
14. *Köhler CN* (2010) The actin-binding protein caldesmon is in spleen and lymph nodes predominantly expressed by smooth-muscle cells, reticular cells, and follicular dendritic cells. *J Histochem Cytochem* 58(2): 183–193.
<https://doi.org/10.1369/jhc.2009.954651>
15. *Breslin JW, Yang Y, Scallan JP, Sweat RS, Adderley SP, Murfee WL* (2018) Lymphatic Vessel Network Structure and Physiology. *Compr Physiol* 9(1): 207–299.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c180015>
16. *Koning JJ, Mebius RE* (2012) Interdependence of stromal and immune cells for lymph node function. *Trends Immunol* 33(6): 264–270.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2011.10.006>
17. *Yang CY, Vogt TK, Favre S, Scarpellino L, Huang HY, Tacchini-Cottier F, Luther SA* (2014) Trapping of naive lymphocytes triggers rapid growth and remodeling of the fibroblast network in reactive murine lymph nodes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(1): E109–E118.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1312585111>
18. *Lobov GI, Pan'kova MN* (2011) Mechanical properties of lymph node capsule. *Bull Exp Biol Med* 151(1): 5–8.
<https://doi.org/10.1007/s10517-011-1246-7>
19. *Lobov GI, Pan'kova MN, Dvoretzky DP, Sergeev IV* (2010) Characteristic of the active and passive mechanical properties of the lymph node capsule. *Dokl Biol Sci* 434: 310–312.
<https://doi.org/10.1134/S0012496610050054>
20. *Lobov GI, Unt DV* (2018) Protective Effect of Dexamethasone on Lipopolysaccharide-Induced Inhibition of Contractile Function of Isolated Lymphatic Vessels and Nodes. *Bull Exp Biol Med* 165(5): 602–605.
<https://doi.org/10.1007/s10517-018-4222-7>
21. *Lobov GI* (2020) Relaxing Effect of Hydrogen Sulfide on Isolated Bovine Mesenteric Lymph Nodes. *Bull Exp Biol Med* 169(2): 192–196.
<https://doi.org/10.1007/s10517-020-04848-z>
22. *Sun HJ, Wu ZY, Nie XW, Bian JS* (2020) Role of Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Link Between Inflammation and Hydrogen Sulfide. *Front Pharmacol* 10: 1568.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01568>
23. *Greiner R, Pálincás Z, Bässell K, Becher D, Antelmann H, Nagy P, Dick TP* (2013) Polysulfides link H2S to protein thiol oxidation. *Antioxid Redox Signal* 19(15): 1749–1765.
<https://doi.org/10.1089/ars.2012.5041>
24. *Lechuga TJ, Chen DB* (2019) Analysis of Vascular Hydrogen Sulfide Biosynthesis. *Methods Mol Biol.* 2007: 19–36.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9528-8_3
25. *Chen CQ, Xin H, Zhu YZ* (2007) Hydrogen sulfide: third gaseous transmitter, but with great pharmacological potential. *Acta Pharmacol Sin* 28(11): 1709–1716.
<https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2007.00629.x>
26. *Roviezzi F, Bertolino A, Sorrentino R, Terlizzi M, Matteis M, Calderone V, Mattera V, Martelli A, Spaziano G, Pinto A, D'Agostino B, Cirino G* (2015) Hydrogen sulfide inhalation ameliorates allergen induced airway hyperactivity by modulating mast cell activation. *Pharmacol Res* 100: 85–92.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.07.032>
27. *Yang R, Yu T, Liu D, Shi S, Zhou Y* (2018) Hydrogen sulfide promotes immunomodulation of gingiva-derived mesenchymal stem cells via the Fas/FasL coupling pathway. *Stem Cell Res Ther* 9(1): 62.
<https://doi.org/10.1186/s13287-018-0804-6>
28. *Lobov GI* (2020) The Role of Hydrogen Sulfide in the Dilatation of Mesenteric Lymphatic Vessels in Bulls. *Bull Exp Biol Med* 169(3): 302–305.
<https://doi.org/10.1007/s10517-020-04874-x>
29. *Yang CY, Vogt TK, Favre S, Scarpellino L, Huang HY, Tacchini-Cottier F, Luther SA* (2014) Trapping of naive lymphocytes triggers rapid growth and remodeling of the fibroblast network in reactive murine lymph nodes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(1): E109–E118.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1312585111>
30. *Tan KW, Yeo KP, Wong FH, Lim HY, Khoo KL, Abastado JP, Angeli V* (2012) Expansion of cortical and medullary sinuses restrains lymph node hypertrophy during prolonged inflammation. *J Immunol* 188(8): 4065–4080.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101854>
31. *Girard JP, Moussion C, Förster R* (2012) HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* (11): 762–773.
<https://doi.org/10.1038/nri3298>

32. Hess E, Duheron V, Decossas M, Lézet F, Bernal A, Chea S, Golub R, Bosisio MR, Bridal SL, Choi Y, Yagita H, Mueller CG (2012) RANKL induces organized lymph node growth by stromal cell proliferation. *J Immunol* 188(3): 1245–1254.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101513>
33. Cyster JG, Schwab SR (2012) Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 30: 69–94.
<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075011>
34. Förstermann U, Sessa WC (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 33(7): 829–37, 837a-837d.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>
35. Szabo C (2017) Hydrogen sulfide, an enhancer of vascular nitric oxide signaling: mechanisms and implications. *Am J Physiol Cell Physiol* 312(1): C3–C15.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00282.2016>

Role of Endogenous Hydrogen Sulfide in Relaxation of the Lymph Node Capsule in LPS-Induced Inflammation

G. I. Lobov*

Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Peterburg, Russia

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

Hydrogen sulfide takes part in the regulation of the functions of various organs, both in physiological conditions and in pathology, and, in particular, is the most important participant in the inflammatory process. In this study, we studied the role and mechanisms of action of hydrogen sulfide in lipopolysaccharide-induced relaxation of the capsule of the bovine mesenteric lymph nodes. The study was carried out on strips of the capsule of the bovine mesenteric lymph nodes. Isolated strips of the lymph node capsule were incubated for 6 hours in F-10 Ham medium supplemented with lipopolysaccharide (LPS *Escherichia coli* O55: B5). At the end of the incubation, the preparations were examined on a myographic installation. The contractile properties were evaluated by the use of phenylephrine, and the relaxation ability - by the use of papaverine. The participation of H₂S and NO in LPS-induced relaxation was determined through the use of specific inhibitors. Incubation of strips of the lymph node capsule in the F-10 Ham + LPS medium led to inhibition of phasic contractions and a decrease in the level of tonic tension of the lymph node capsule strips. Potent inhibition of the contractile function of smooth muscle cells of the lymph node capsule occurred under the influence of H₂S synthesized by the enzymes cystathionine-γ-lyase, cystathionine-β-synthase and 3-mercaptosulfuryltransferase, and also NO, produced by inducible NO-synthase. Our data show that H₂S is one of the main substances that are rather quickly formed in the lymph nodes by inflammation. We believe that H₂S is the most important molecule that, together with NO, triggers the inflammatory remodeling of lymph nodes, which contributes to a rapid increase in their size.

Keywords: lymph node, capsule, smooth muscle cells, lipopolysaccharide, hydrogen sulfide, inflammation

**РОЛЬ NO-СИНТАЗНЫХ ПУТЕЙ В РЕАЛИЗАЦИИ ВЛИЯНИЯ
ПРОВосПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ НА ПАТТЕРН ДЫХАНИЯ
И ВЕНТИЛЯЦИОННЫЙ ОТВЕТ НА ГИПОКСИЮ**

© 2021 г. А. А. Клиникова¹*, Г. А. Данилова¹, Н. П. Александрова¹

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

**E-mail: Klinnikova.an@gmail.com*

Поступила в редакцию 21.08.2021 г.

После доработки 12.09.2021 г.

Принята к публикации 12.09.2021 г.

Интерлейкин-1 β (IL-1 β) и фактор некроза опухоли- α (TNF- α) являются основными провоспалительными цитокинами. Их рецепторы экспрессируются в областях ствола мозга, участвующих в контроле дыхания, а также в каротидных телах, которые контролируют содержание O₂ в артериальной крови. Мы предположили, что циркулирующие провоспалительные цитокины могут влиять на вентиляцию легких и модулировать респираторный ответ на гипоксию посредством активации NO-зависимых путей. Целью нашего исследования было сравнение респираторных эффектов IL-1 β и TNF- α до и после предварительной обработки L-NAME – неселективным ингибитором NO-синтазы (NOS). Вентиляционный ответ на гипоксию измеряли у анестезированных крыс линии Вистар с использованием метода возвратного дыхания до и после внутривенного введения IL-1 β (2 мкг/кг) и TNF- α (40 мкг/кг). В результате было обнаружено, что повышение системного уровня провоспалительных цитокинов увеличивает вентиляцию легких при нормоксии, в то же время снижая респираторную чувствительность к гипоксии. Предварительное интраперитонеальное введение L-NAME снижало обнаруженные респираторные эффекты как IL-1 β , так и TNF- α . Мы полагаем, что активация NO-синтазных путей и усиление синтеза NO при взаимодействии цитокинов с соответствующими рецепторами, опосредует респираторные эффекты провоспалительных цитокинов и лежит в основе воздействия воспаления на дыхательную функцию.

Ключевые слова: интерлейкин-1 β , фактор некроза опухоли- α , цитокины, вентиляция, респираторный хеморефлекс, гипоксия, оксид азота

DOI: 10.31857/S0869813921110042

ВВЕДЕНИЕ

Гипоксический и гиперкапнический дыхательные хеморефлексы являются важнейшими элементами контроля дыхания. Эти рефлексы участвуют в поддержании газового гомеостаза артериальной крови. Хеморефлексы осуществляются при участии хеморецепторов каротидных телец, расположенных в бифуркации сонной артерии, которые возбуждаются при снижении напряжения кислорода, повышении напряжения углекислого газа и уменьшении pH артериальной крови. При гипоксии гломусные клетки каротидных телец деполаризуются в ответ на недостаток кислорода и выделяют нейромедиаторы, которые активируют сенсорные нервные волокна, передающие афферентную информацию в дыхательный центр ствола мозга.

Установлено, что гломусные клетки экспрессируют рецепторы воспалительных цитокинов, включая рецепторы TNF- α (TNF-R1 и TNF-R2), IL-1 β (IL-1R1) и рецепторы IL-6 [1–4]. IL-1 β и TNF- α являются основными провоспалительными цитокинами, продуцируемыми во время острой фазы иммунного ответа на инфекцию и воспаление. Сообщается, что системный уровень этих цитокинов повышается при многих респираторных заболеваниях, таких как астма, хроническая обструктивная болезнь легких и апноэ во сне [5–7]. Было обнаружено, что системное воспаление вызывает морфологические изменения в каротидном теле сонной артерии [3]. Эти изменения, связанные с повышением уровня провоспалительных цитокинов, снижают чувствительность каротидного тела к гипоксии [4]. Известно, что TNF- α может провоцировать высвобождение гломусными клетками медиатора дофамина [8, 9]. В совокупности, эти данные показывают, что функция каротидных телец при гипоксии может снижаться во время воспаления.

Однако механизмы, с помощью которых провоспалительные цитокины влияют на вентиляцию легких и гипоксическую хеморецепцию, до сих пор не изучены и могут включать множество воспалительных молекул, которые влияют не только на центральные и периферические хеморецепторы, но и на дыхательные нейроны [10]. Влияние цитокинов на дыхательную систему может быть опосредовано несколькими способами: высвобождением простагландинов, норадреналина, рилизинг-фактора кортикотропина, оксида азота (NO) [11–15].

Целью настоящего исследования было изучение влияния провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF- α на паттерн дыхания и гипоксическую хеморецепцию, а также выяснение роли NO-синтазных путей в реализации респираторных эффектов данных цитокинов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование было выполнено на 48 наркотизированных трахеостомированных спонтанно дышащих крысах самца линии Вистар массой 270 ± 20 г (ЦКП Библиотека Института физиологии им. И.П. Павлова РАН). Все животные находились под общей анестезией (уретан, 1400 мг/кг, интраперитонеально). Эксперименты выполнены с соблюдением основных норм и правил биомедицинской этики (European Community Council Directives 86/609/ЕЕС).

Для регистрации объемно-временных параметров внешнего дыхания использовалась пневмотахографическая методика. К трахеостомической канюле подключалась пневмометрическая трубка MLT-1L (AD Instruments, Австралия). По кривой пневмотахограммы измерялась средняя скорость инспираторного потока (Винсп) и частота дыхательных движений (ЧДД). При интеграции пневмотахографической кривой автоматически получали кривую дыхательных объемов – спирограмму и вычисляли дыхательный объем (ДО). Минутный объем дыхания (МОД) рассчитывали, как произведение ДО на ЧДД. Парциальное давление кислорода и углекислого газа ($P_{ET}O_2$ и $P_{ET}CO_2$) в конечной порции выдыхаемого воздуха измерялось с помощью респираторного газоанализатора (Gemini, США).

Животные были разделены на 6 экспериментальных групп. Животные первой группы ($n = 8$) использовались для выяснения собственных респираторных эффектов IL-1 β , этим животным вводили только IL-1 β (2 мкг/кг, “Беталейкин”, ФГУП ОЧБ ФМБА) в хвостовую вену. Вторая группа ($n = 8$) была предназначена для выяснения респираторных эффектов TNF- α , этой группе внутривенно вводили TNF- α (40 мкг/кг, Sigma). Третья и четвертая группы ($n = 8$ каждая) были созданы для выяснения роли нитрергических механизмов, участвующих в реализации респираторных эффектов цитокинов. Животным этих групп за 20 мин до введения IL-1 β или TNF- α производилась внутрибрюшинная инъекция неселективного ингиби-

тора NO-синтаз (L-NAME) (10 мг/кг, Sigma). Пятая группа ($n = 8$) использовалась для выявления возможного собственного влияния L-NAME на вентиляцию легких и гипоксическую хеморецепцию; этой группе вводили только ингибитор, внутривенно. Помимо этого, была создана группа животных ($n = 8$), которая являлась контрольной. Этим животным вводили внутривенно 0.25 мл физиологического раствора.

Чувствительность к гипоксическому стимулу исследовали классическим методом возвратного дыхания, адаптированным нами для использования на мелких лабораторных животных. Дыхание производилось в замкнутом контуре, заполненном азотно-кислородной гипоксической газовой смесью (80% N_2 , 15% O_2 , 5% CO_2). CO_2 добавлялся в дыхательную смесь в концентрации, соответствующей нормальному содержанию CO_2 в организме для предотвращения гипокапнии, развивающейся при гипоксической гипервентиляции.

Изокапния поддерживалась за счет удаления с помощью адсорбента (натронная известь) из выдыхаемого воздуха, поступающего в мешок (объем 50 мл) для возвратного дыхания, углекислого газа, образующегося в организме. По мере потребления кислорода при дыхании из мешка происходило постепенное убывание содержания O_2 в дыхательной смеси, нарастала стимуляция периферических хеморецепторов и происходило соответствующее увеличение легочной вентиляции. Содержание CO_2 в дыхательной смеси не изменялось. Продолжительность проведения пробы с возвратным дыханием составляла 4 мин. Вентиляционный ответ на гипоксию тестировался в диапазоне снижения парциального давления кислорода в выдыхаемом воздухе от 80 до 40 мм рт. ст., т.к. в этом диапазоне зависимость величины вентиляции от интенсивности гипоксического стимула практически линейна.

Для количественной оценки вентиляционного ответа на гипоксию производилось вычисление приростов ДО, МОД и $V_{инсп}$ при снижении парциального давления кислорода в конечной порции выдыхаемого воздуха на 1 мм рт. ст. Кроме того, производилось графическое построение зависимости роста вентиляции и ее составляющих от содержания O_2 в выдыхаемом воздухе. Гипоксический вентиляционный ответ тестировался до введения препаратов, а затем на 20-ой, 40-ой, 60-ой и 90-ой мин после их введения (рис. 1).

Для статистической обработки экспериментальных данных использовался программный пакет STATISTICA 7.0. Все значения представлены как среднее \pm стандартная ошибка. Для проверки нормальности распределения данных применялись критерии Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка. Значения до и после введения препаратов оценивали с помощью парного теста Стьюдента и однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Достоверными считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Паттерн дыхания. Эксперименты показали, что экзогенное повышение системного уровня как IL-1 β , так и TNF- α оказывает активирующее влияние на систему внешнего дыхания, вызывая увеличение средней скорости инспираторного потока, дыхательного объема и минутного объема дыхания (табл. 1, 2). Достоверные изменения минутного объема дыхания отмечались уже на 20-ой мин после введения цитокинов, средней скорости инспираторного потока и дыхательного объема – на 40-ой мин. Значимое увеличение частоты дыхательных движений наблюдалось лишь через 90 мин после введения IL-1 β или TNF- α . При проведении серии контрольных экспериментов с внутривенным введением физиологического раствора, а также с внутривенным введением раствора L-NAME не было выявлено достоверных изменений дыхательных параметров.

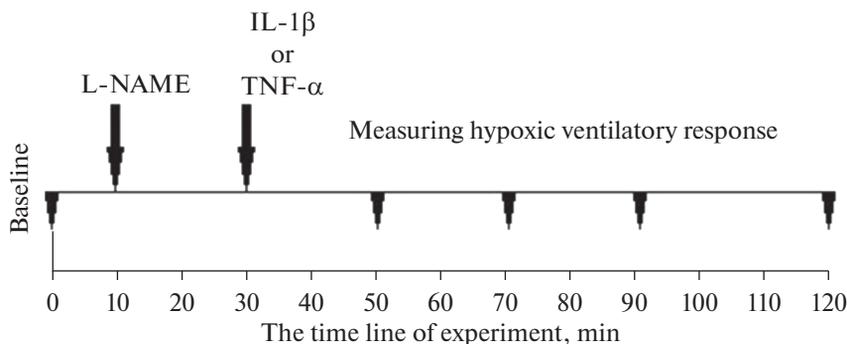


Рис. 1. Схема эксперимента. Эксперимент длился 120 мин, на тридцатой минуте вводили IL-1 β или TNF- α . L-NAME вводили на десятой минуте эксперимента (т.е. за 20 мин до введения цитокина). Треугольники – моменты измерения дыхательной реакции при гипоксии. Стрелки – моменты введения препаратов.

После предварительной обработки L-NAME влияние IL-1 β и TNF- α на паттерн дыхания было ослаблено. Достоверное увеличение минутного объема дыхания наблюдалось только через 60 мин после повышения системного уровня данных цитокинов (табл. 1, 2). Величина прироста этого параметра составляла 25 и 50% при введении IL-1 β и TNF- α соответственно. При действии IL-1 β и TNF- α на фоне предварительного введения L-NAME прирост минутного объема дыхания через 60 мин после введения цитокинов составлял 16 и 10%.

Таблица 1. Изменение параметров дыхания при повышении системного уровня IL-1 β и IL-1 β на фоне действия L-NAME

Параметр	Физиологический раствор (n = 8)			IL-1 β (n = 8)			IL-1 β + L-NAME (n = 8)		
	фон	40 мин	60 мин	фон	40 мин	60 мин	фон	40 мин	60 мин
МОД, мл/мин	100 \pm 5.2	97 \pm 4.0	96 \pm 9.5	117 \pm 9.6	143 \pm 12.8*	146 \pm 12.0*	210 \pm 8.3	237 \pm 10.1	244 \pm 9.3*
ДО, мл	1.0 \pm 0.02	0.9 \pm 0.05	1.0 \pm 0.08	1.0 \pm 0.08	1.36 \pm 0.07*	1.4 \pm 0.07*	1.8 \pm 0.08	1.9 \pm 0.07 [#]	1.9 \pm 0.07 [#]
ЧДД, мин ⁻¹	107 \pm 2.0	105 \pm 4.0	105 \pm 2.6	113 \pm 7.0	106 \pm 9.0	105 \pm 8.0	114 \pm 3.3	118 \pm 2.6	122 \pm 2.7 [#]
V _{инсп} , мл/с ⁻¹	3.8 \pm 0.3	3.9 \pm 0.2	3.9 \pm 0.1	3.8 \pm 0.5	4.2 \pm 0.4*	4.3 \pm 0.4*	7.8 \pm 0.3	8.7 \pm 0.3	8.8 \pm 0.3

МОД – минутный объем дыхания; ДО – дыхательный объем; ЧДД – частота дыхания; V_{инсп} – средняя скорость инспираторного потока. Значения являются средними \pm SEM. * $p < 0.05$ достоверные отличия от исходного уровня. [#] $p < 0.05$ достоверные отличия IL-1 β от IL-1 β на фоне действия L-NAME.

Таблица 2. Изменение параметров дыхания при повышении системного уровня TNF- α и TNF- α на фоне действия L-NAME

Параметр	Физиологический раствор (n = 8)			TNF- α (n = 8)			TNF- α + L-NAME (n = 8)		
	фон	40 мин	60 мин	Фон	40 мин	60 мин	фон	40 мин	60 мин
МОД, мл/мин	100 \pm 5.2	97 \pm 4.0	96 \pm 9.5	119 \pm 15.6	172 \pm 13.8*	179 \pm 11.5*	132 \pm 8.8	138 \pm 7.0 [#]	145.2 \pm 7.0* [#]
ДО, мл	1.0 \pm 0.02	0.9 \pm 0.05	1.0 \pm 0.08	1.1 \pm 0.07	1.3 \pm 0.06*	1.4 \pm 0.05*	1.3 \pm 0.06	1.2 \pm 0.07 [#]	1.2 \pm 0.06 [#]
ЧДД, мин ⁻¹	107 \pm 2.4	105 \pm 3	105 \pm 2.6	111 \pm 5.1	114 \pm 5.3	119 \pm 6.1	108 \pm 5.6	112 \pm 4.8	110 \pm 6.0
V _{инсп} , мл/с ⁻¹	3.8 \pm 0.3	3.9 \pm 0.2	3.9 \pm 0.1	4.2 \pm 0.4	5.4 \pm 0.5*	5.8 \pm 0.3*	4.2 \pm 0.3	4.3 \pm 0.2 [#]	4.4 \pm 0.4 [#]

Обозначения такие же, как в табл. 1.

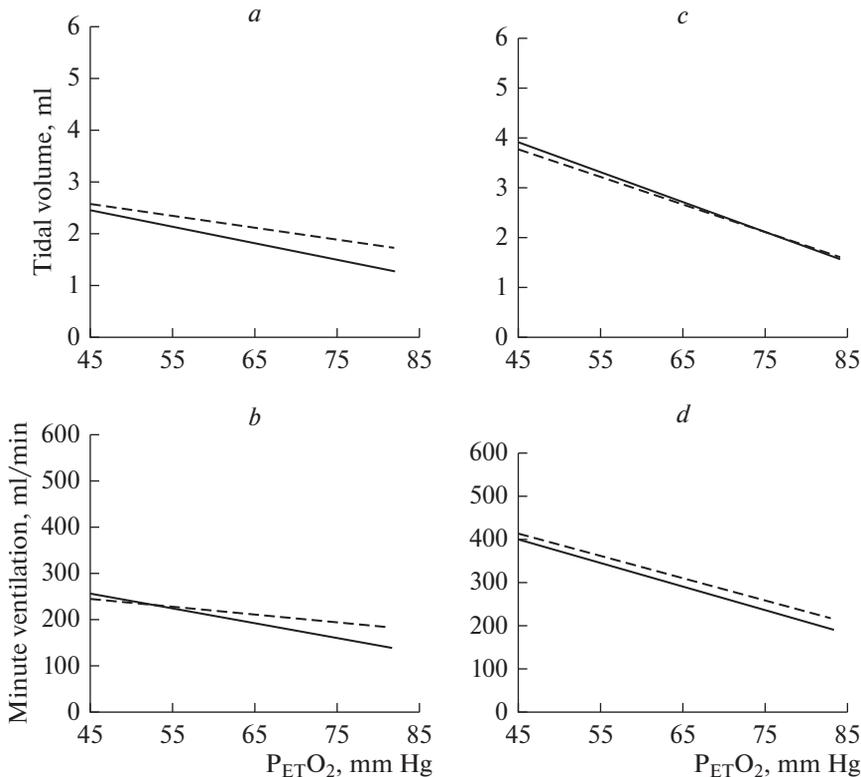


Рис. 2. Вентиляционный ответ на гипоксию до (сплошная линия) и через 40 мин после (пунктирная линия) внутривенного введения IL-1 β (a, b) и IL-1 β на фоне действия L-NAME (c, d).

Вентиляционный ответ на гипоксию. При возвратном дыхании гипоксической газовой смесью наблюдалась значительная корреляция между увеличением минутной вентиляции, дыхательного объема, средней скорости инспираторного потока и снижением $P_{ET}O_2$ как до, так и после внутривенных инъекций IL-1 β или TNF- α . Однако внутривенное введение как IL-1 β , так и TNF- α вызывало уменьшение угла наклона линий тренда, усредняющих вентиляционные кривые, зарегистрированные в нескольких экспериментах. Линии тренда становились более пологими, что свидетельствует о снижении вентиляционной чувствительности к гипоксической стимуляции (рис. 2a, b; 3a, b).

Проведение количественных расчетов подтвердило достоверность снижения прироста респираторных параметров в ответ на гипоксическую стимуляцию на фоне действия IL-1 β . Максимальное снижение приростов дыхательных параметров наблюдалось на 40-ой мин действия цитокина. Так, расчет величины прироста параметров при снижении $P_{ET}O_2$ на 1 мм рт. ст. показал, что через 40 мин после введения IL-1 β прирост МОД уменьшался с 3.34 ± 0.23 до 2.02 ± 0.19 мл/мин/мм рт. ст. (-41% , $p < 0.05$), ДО – с 0.031 ± 0.005 в контроле до 0.022 ± 0.004 мл/мм рт. ст. (-29% , $p < 0.05$) и скорости инспираторного потока с 0.114 ± 0.017 до 0.06 ± 0.012 мл/с/мм рт. ст. (-47% , $p < 0.05$) по сравнению с фоновыми величинами (рис. 4a).

Максимальное снижение чувствительности респираторной системы к гипоксии было обнаружено и через 40 мин после введения TNF- α . Количественные расчеты показали, что МОД снизился с 6.06 ± 0.91 до 3.48 ± 0.38 мл/мин/мм рт. ст. (-40%)

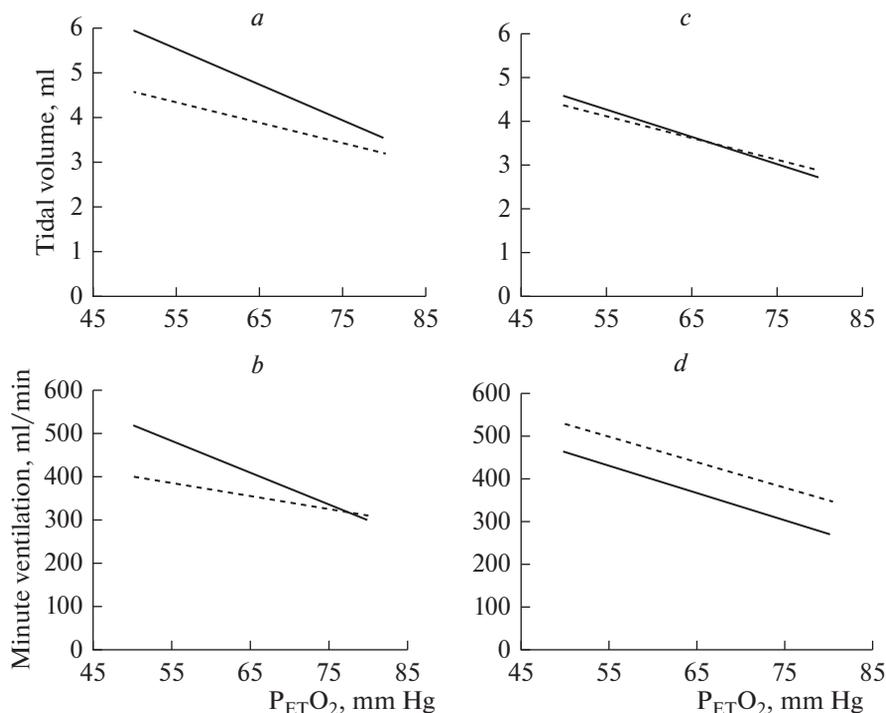


Рис. 3. Вентиляционный ответ на гипоксию до (сплошная линия) и через 40 мин после (пунктирная линия) внутривенного введения TNF- α (a, b) и TNF- α на фоне действия L-NAME (c, d).

через 40 мин после введения TNF- α ($p < 0.05$). ДО и $V_{\text{инсп.}}$ снизились с 0.06 ± 0.01 до 0.04 ± 0.01 мл/мм рт. ст. (-27% , $p < 0.05$) и с 0.23 ± 0.02 в контроле до 0.15 ± 0.01 мл/с/мм рт. ст. (-27% , $p < 0.05$) через 40 мин после введения TNF- α соответственно (рис. 4b). В то же время, внутривенное введение физиологического раствора не изменило вентиляционный ответ на гипоксию.

В совокупности полученные данные показывают, что повышенный уровень провоспалительных цитокинов в крови снижает чувствительность дыхательной системы к гипоксии и подавляет гипоксический хеморецепторный контроль дыхания.

Повышение системного уровня как IL-1 β , так и TNF- α на фоне действия ингибитора NO-синтаз – L-NAME не вызвало ослабления вентиляционного ответа на гипоксию: угол наклона линий тренда, характеризующий зависимость дыхательных параметров (МОД, ДО, $V_{\text{инсп.}}$) от величины гипоксической стимуляции, не изменялся после введения цитокинов (рис. 2c, d; 3c, d).

Количественная оценка реакции на гипоксию после введения цитокинов на фоне ингибирования активности NO-синтаз также показала, что в течение всего эксперимента достоверного снижения приростов МОД, ДО и $V_{\text{инсп.}}$ в ответ на гипоксическую стимуляцию, относительно их фоновых значений, не наблюдалось. Сохранялась лишь слабо выраженная тенденция к ослаблению вентиляционного ответа на гипоксию (рис. 4).

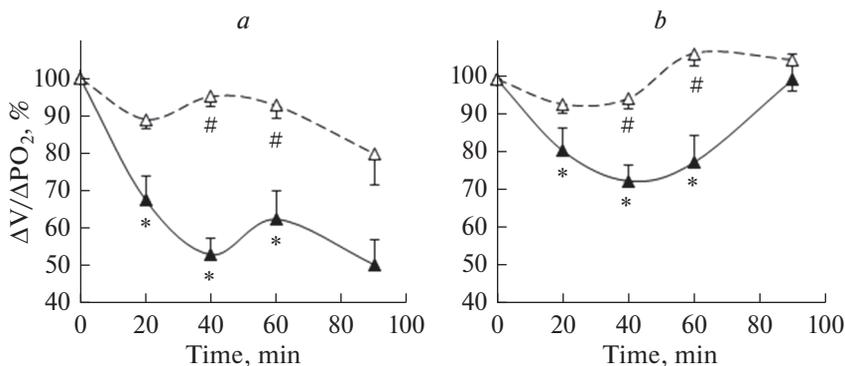


Рис. 4. Динамика вентиляционного ответа на гипоксию на протяжении всего эксперимента, т.е. на исходном уровне и через 20, 40, 60 и 90 мин после введения IL-1 β (a) или TNF- α (b), до (сплошная линия) и после (пунктирная линия) предварительного введения L-NAME.

* $p < 0.05$ – достоверные отличия от фоновых значений, # $p < 0.05$ – достоверные отличия от IL-1 β или TNF- α . Представлены средние значения \pm SEM.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нормальных условиях уровень цитокинов в организме очень низкий. Однако при системном воспалении, стрессе, гипоксии, обструктивной болезни легких наблюдается значительный рост уровня провоспалительных цитокинов. Известно, что внутривенное введение липополисахарида вызывает повышение уровня TNF в крови с 750 до 5000 нг/мл [16].

Проведенное нами исследование показало, что при спокойном дыхании воздухом экзогенное повышение уровня IL-1 β и TNF- α вызывает увеличение минутной вентиляции, дыхательного объема и средней скорости инспираторного потока. Подобное влияние провоспалительных цитокинов на вентиляцию легких было показано и в более ранних исследованиях. Было обнаружено, что вводимый внутривенно эндотоксин, который приводит к высвобождению провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6 и TNF- α), вызывает усиление вентиляции легких [17]. В предыдущих исследованиях мы показали, что повышение церебрального уровня IL-1 β приводит к значительному увеличению объемно-временных параметров дыхания в условиях нормоксии, но в то же время ослабляет гиперкапнический и гипоксический вентиляционные ответы [15, 18]. Результаты, представленные в данной статье, показывают, что внутривенное введение IL-1 β и TNF- α имеет такие же респираторные эффекты: усиление вентиляции легких и ослабление респираторной чувствительности к гипоксии.

На основании полученных нами данных мы полагаем, что повышение системного уровня провоспалительных цитокинов снижает чувствительность периферических артериальных хеморецепторов к изменению газового состава крови. Этот вывод подтверждается результатами, полученными в других исследованиях. Установлено, что IL-1 β и TNF- α могут распознаваться мембранными рецепторами, расположенными в гломусных клетках каротидных тел, а также могут способствовать выделению гломусными клетками медиатора дофамина [8, 9]. В экспериментах, проведенных *in vitro*, установлено, что в каротидном теле TNF- α может увеличивать базовую частоту хемосенсорных разрядов нерва, иннервирующего каротидные тела, но в то же время – уменьшать хемосенсорные разряды, вызванные гипоксией [8]. В нашей работе, в экспериментах *in vivo*, было показано, что внутри-

венная инъекция как IL-1 β , так и TNF- α увеличивает минутную вентиляцию легких при спокойном дыхании воздухом, и в то же время снижает вентиляционный ответ респираторной системы на гипоксию. Принимая во внимание представленные данные литературы, можно предположить, что обнаруженные нами респираторные эффекты провоспалительных цитокинов связаны с тем, что повышение их уровня в циркулирующей крови изменяет хемосенсорную активность каротидного тела.

Результаты представленного исследования показывают также, что респираторные эффекты провоспалительных цитокинов опосредуются активацией NO-синтазных путей. Наличие NO-синтаз было обнаружено в нервных волокнах, окружающих гломусные клетки каротидных тел, а также в самих гломусных клетках [19]. При взаимодействии цитокинов с соответствующими мембранными рецепторами в этих клетках может усиливаться синтез конститутивных форм NO-синтазы и образование молекул NO, которые оказывают как аутокринное, так и паракринное действие. Внутриклеточный механизм действия NO заключается в активации циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ), способного влиять на проводимость ионных каналов и, таким образом, изменять функциональное состояние клеточной мембраны.

Установлено, что оксид азота в физиологических концентрациях является тормозным модулятором хемосенсорных разрядов каротидных тел. Уменьшение эндогенной продукции NO вносит вклад в усиление хемосенсорных разрядов каротидных тел [20, 21]. Известно, что NO модулирует хеморецепторные процессы посредством различных механизмов, опосредовано через изменения тонуса сосудов в каротидных телах и доставки кислорода, и напрямую через модуляцию возбудимости гломусных клеток и сенсорных нейронов. При этом эффект NO имеет двойственное дозозависимое влияние на хеморецепцию каротидных тел. В гипоксических условиях NO является преимущественно тормозным модулятором каротидной хеморецепции, тогда как при нормоксии NO усиливает хемосенсорные разряды [20, 21]. Этот факт объясняет обнаруженный нами двойственный респираторный эффект IL-1 β и TNF- α : увеличение базовой вентиляции при нормоксии, но уменьшение гипоксического вентиляционного ответа.

Полученные нами данные, указывающие на восстановление вентиляционного гипоксического ответа после ингибирования NO-синтаз, находят объяснения и в других исследованиях, которые показывают, что уменьшенная эндогенная продукция NO усиливает хеморецепторную активность каротидных тел. Так, например, было установлено, что у кроликов с сердечной недостаточностью и усиленным ответом на гипоксию наблюдается уменьшенная эндогенная активность NO-синтаз в каротидных телах по сравнению с нормальными животными. При этом было показано, что внедрение этим животным аденовируса, экспрессирующего NO-синтазы, уменьшало базовые разряды хеморецепторов каротидных тел и ослабляло ответ на гипоксию [22]. В экспериментах *in vitro* на перфузированных каротидных телах кошек при регистрации активности синусного нерва было показано, что обе конститутивные изоформы NO-синтазы – нейрональная (nNOS) и эндотелиальная (eNOS) – вносят вклад в действие NO на хеморецепторную активность [23].

Таким образом, результаты проведенных нами исследований и анализ данных литературы указывают на участие ключевых воспалительных цитокинов IL-1 β и TNF- α в модуляции паттерна дыхания и гипоксического хеморефлекса посредством активации NO-синтаз и усиления синтеза NO в гломусных клетках каротидных тел.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа профинансирована за счет Государственной программы Российской Федерации 47 ГП.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Н.П.А., А.А.К.); сбор данных (А.А.К., Г.А.Д.); обработка данных (А.А.К., Г.А.Д.); написание и редактирование манускрипта (А.А.К., Н.П.А., Г.А.Д.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang X, Wang BR, Duan XL, Zhang P, Ding YQ, Jia Y, Jiao XY, Ju G (2002) Strong expression of interleukin-1 receptor types I in the rat carotid body. *J Histochem Cytochem* 50 (12): 1677–1684.
<https://doi.org/10.1177/002215540205001213>
2. Wang X, Zhang XJ, Xu Z, Li X, Li GL, Ju G, Wang BR (2006) Morphological evidence for existence of IL-6 receptor alpha in the glomus cells of rat carotid body. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 288 (3): 292–296.
<https://doi.org/10.1002/ar.a.20310>
3. Lam SY, Tipoe GL, Liong EC, Fung ML (2008) Chronic hypoxia upregulates the expression and function of proinflammatory cytokines in the rat carotid body. *Histochem Cell Biol* 130 (3): 549–559.
<https://doi.org/10.1007/s00418-008-0437-4>
4. Gauda EB, Shirahata M, Mason A, Pichard LE, Kostuk EW, Chavez-Valdeza R (2013) Inflammation in the carotid body during development and its contribution to apnoea of prematurity. *Respir Physiol Neurobiol* 185 (1): 120–131.
<https://doi.org/10.1016/j.resp.2012.08.005>
5. Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO (2000) Sleep apnoea and daytime sleepiness and fatigue: relation to visceral obesity, insulin resistance, and hypercytokinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 1151–1158.
6. Vernooy JH, Kucukaycan M, Jacobs JA, Chavannes NH, Buurman WA, Dentener MA, Wouters EF (2002) Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease: soluble tumor necrosis factor receptors are increased in sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 166: 1218–1224.
7. Bucchioni E, Kharitonov SA, Allegra L, Barnes PJ (2003) High levels of interleukin-6 in the exhaled breath condensate of patients with COPD. *Respir Med* 97: 1299–1302.
8. Fernández R, González S, Rey S, Cortés PP, Maisey KR, Reyes EP, Larrain C, Zapata P (2008) Lipopolysaccharide-induced carotid body inflammation in cats: functional manifestations, histopathology and involvement of tumour necrosis factor-alpha. *Exp Physiol* 93 (7): 892–907.
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.2008.041152>
9. Zapata P, Larrain C, Reyes P, Fernández R (2011) Immunosensory signaling by carotid body chemoreceptors. *Respir Physiol Neurobiol* 178 (3): 370–374.
<https://doi.org/doi:10.1016/j.resp.2011.03.025>
10. Huxtable AG, Vinit S, Windelborn JA, Crader SM, Guenther CH, Watters JJ, Mitchell GS (2011) Systemic inflammation impairs respiratory chemoreflexes and plasticity. *Respir Physiol Neurobiol* 178(3): 482–489.
<https://doi.org/10.1016/j.resp.2011.06.017>
11. Nakamori T, Morimoto A, Murakami N (1993) Effect of a central CRF antagonist on cardiovascular and thermoregulatory responses induced by stress or IL-1 β . *Am J Physiol* 265(4): 834–839.
12. Watanabe T, Tan N, Saiki Y, Makisumi T, Nakamura S (1996) Possible involvement of glucocorticoids in the modulation of interleukin-1-induced cardiovascular responses in rats. *J Physiol* 491(1): 231–239.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1996.sp021211>
13. Graff GR, Gozal D (1999) Cardiorespiratory responses to interleukin-1beta in adult rats: role of nitric oxide, eicosanoids and glucocorticoids. *Arch Physiol Biochem* 107(2): 97–112.

14. *Herlenius E* (2011) An inflammatory pathway to apnea and autonomic dysregulation. *Respir Physiol Neurobiol* 178: 449–457.
<https://doi.org/10.1016/j.resp.2011.06.026>
15. *Aleksandrova NP, Danilova GA, Aleksandrov VG* (2015) Cyclooxygenase pathway in modulation of the ventilatory response to hypercapnia by interleukin-1 β in rats. *Respir Physiol Neurobiol* 209: 85–90.
<https://doi.org/10.1016/j.resp.2014.12.006>
16. *Foster SJ, McCormick LM, Ntolosi BA, Campbell D* (1993) Production of TNF alpha by LPS-stimulated murine, rat and human blood and its pharmacological modulation. *Agents Actions* 38: 77–79.
<https://doi.org/10.1007/BF01991143>
17. *Preas HL 2nd, Jubran A, Vandivier RW, Reda D, Godin PJ, Banks SM, Tobin MJ, Suffredini AF* (2001) Effect of endotoxin on ventilation and breath variability: role of cyclooxygenase pathway. *Am J Respir Crit Care Med* 164(4): 620–626.
18. *Aleksandrova NP, Danilova GA, Aleksandrov VG* (2017) Interleukin-1beta suppresses the ventilatory hypoxic response in rats via prostaglandin dependent pathways. *Canad J Physiol Pharmacol* 95(6): 681–685.
<https://doi.org/10.1139/cjpp-2016-0419>
19. *Tanaka K, Chiba T* (1994) Nitric oxide synthase containing neurons in the carotid body and sinus of the guinea pig. *Microscopy Res Techniq J* 29(2): 90–93.
<https://doi.org/10.1002/jemt.1070290205>
20. *Iturriaga R* (2001) Nitric oxide and carotid body chemoreception. *Biol Res* 34(2): 135–139.
<https://doi.org/10.4067/s0716-97602001000200019>
21. *Moya EA, Alcayaga J, Iturriaga R* (2012) NO modulation of carotid body chemoreception in health and disease. *Respir Physiol Neurobiol* 184(2): 158–164.
<https://doi.org/10.1016/j.resp.2012.03.019>
22. *Li HF, Yu J* (2009) Airway chemosensitive receptors in vagus nerve perform neuro-immune interaction for lung-brain communication. *Adv Exp Med Biol* 648: 421–426.
https://doi.org/10.1007/978-90-481-2259-2_48
23. *Valdés V, Mosqueira M, Rey S* (2003) Inhibitory effects of NO on carotid body: contribution of neural and endothelial nitric oxide synthase isoforms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284(1): 57–68.

The Role of NO-Synthase Pathways in the Effects of Proinflammatory Cytokines on the Respiratory System during Normoxia and Hypoxia

A. A. Klinnikova^a, *, G. A. Danilova^a, and N. P. Aleksandrova^a

^a Pavlov Institute of Physiology of RAS, St. Petersburg, Russia

*e-mail: Klinnikova.an@gmail.com

Interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) are the major proinflammatory cytokines. Cytokine receptors are expressed in areas of the brainstem involved in the control of respiration, as well as in the carotid bodies, which control the O₂ balance in arterial blood. We hypothesized that circulating proinflammatory cytokines can affect lung ventilation and alter the respiratory response to hypoxia by activating NO-dependent pathways. The aim of our study was to compare the respiratory effects of IL-1 β and TNF- α before and after pretreatment with L-NAME, a non-selective inhibitor of NO synthase (NOS). The ventilation response to hypoxia was measured in anesthetized Wistar rats using the rebreathing method before and after intravenous administration of IL-1 β (2 μ g/kg) and TNF- α (40 μ g/kg). As a result, it was found that an increase in the systemic level of proinflammatory cytokines increases lung ventilation during normoxia, while reducing respiratory sensitivity to hypoxia. Pretreatment with L-NAME reduced these respiratory effects of both IL-1 β and TNF- α . We believe that the activation of NO-synthase pathways and an increase in NO synthesis, when cytokines interact with the corresponding receptors, mediates the respiratory effects of proinflammatory cytokines and underlies the effect of inflammation on respiratory function.

Keywords: interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α , cytokines, ventilation, respiratory chemoreflex, hypoxia, nitric oxide

**ПЕРЦЕПТИВНЫЙ АНАЛИЗ ВЗРОСЛЫМИ РЕЧИ ДЕТЕЙ
С РАССТРОЙСТВАМИ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА,
СИНДРОМ ДАУНА, УМСТВЕННОЙ ОТСТАЛОСТЬЮ**

© 2021 г. Е. Е. Ляксо¹, *, О. В. Фролова¹, **, А. С. Николаев¹, А. С. Григорьев¹

¹*Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

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

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

Поступила в редакцию 13.08.2021 г.

После доработки 13.09.2021 г.

Принята к публикации 14.09.2021 г.

Голос человека может отражать незначительные нюансы настроения и состояния, которые улавливаются слуховой системой и распознаются на основании личного опыта, состояния слушателя и мотивации говорящего. Нарушения голоса и речи у детей, разная степень их выраженности в зависимости от заболевания позволяют сформулировать вопрос о том, какую информацию могут извлечь взрослые при прослушивании речи ребенка с атипичным развитием. Цель исследования — определить возможность распознавания взрослыми различной информации о детях по речи. В работе использован метод слухового перцептивного эксперимента. В исследовании приняли участие 685 слушателей (аудиторов). Создано 40 тестовых последовательностей, включающих речевой материал 260 детей в возрасте от 4 до 16 лет, типично развивающихся и детей с атипичным развитием: расстройствами аутистического спектра, синдромом Дауна, интеллектуальными нарушениями. Показано, что аудиторы при прослушивании образцов детской речи могут правильно распознавать пол детей и их психоневрологическое состояние, но испытывают трудности при определении эмоционального состояния детей, лексического значения речевого материала; плохо распознают возраст, в особенности детей с атипичным развитием. Выявлены корреляции между способностью взрослых правильно определять пол, возраст, психоневрологическое и эмоциональное состояние детей, организацией тестовых последовательностей и профессиональным опытом аудиторов.

Ключевые слова: детская речь, перцептивный анализ, возраст, пол, эксперимент

DOI: 10.31857/S0869813921110078

Голос человека может передать мельчайшие нюансы настроения и состояния, которые способна уловить слуховая система слушающего и распознать, опираясь на собственный опыт, текущее настроение и состояние сонастроенности (доминанту) с говорящим. В исследованиях по распознаванию речи широко применяется метод слухового перцептивного эксперимента [1], хотя он и представляет сложную задачу использования суждения слушателей для изучения человеческого голоса. Экспериментальные исследования проведены с целью определения приятности голоса [2, 3], возраста и пола говорящего [3], его роста и веса [2] на основе прослушивания образцов речи. Показано, что на восприятие речевого материала влияет возраст слушающего и говорящего [3], на определение значения сказанного — ха-

рактеристики слуха [4]. Гендерная специфика имеет место при категоризации эмоций в голосовых проявлениях человека [5].

Исследования слухового восприятия включают в себя проблему распознавания слушателями особенностей речи людей с различными заболеваниями (например, болезнь Паркинсона [6], синдром Дауна (СД) [7, 8], расстройства аутистического спектра (РАС) [9]). В клинике инструментальным измерениям речи обычно предшествуют перцептивные данные [10].

Исследования, направленные на изучение восприятия взрослыми информации, содержащейся в характеристиках голоса и речи детей с нарушениями развития, имеют самостоятельное значение.

Наиболее яркие проявления нарушений речевого развития отмечаются у детей с РАС, СД и умственной отсталостью (УО).

Для пациентов с РАС характерны нарушения языка и речи, социально-эмоциональной сферы. Большинство исследователей сходятся в едином мнении в отношении существования специфических нарушений речи у людей с РАС, расхождения во мнениях касаются конкретных характеристик речи [например, 11–13]. Для детей с РАС описан широкий диапазон нарушений речи – от грубой задержки формирования до опережающего темпа развития. Выявлены особенности интонации, тембра, модуляций голоса, нарушение прагматики речи [14]. Фонологические нарушения речи выражены в большей степени, чем лексические, при общем низком уровне сформированности речи [15].

В пионерской работе Kanner [16] речь пациентов с РАС описывается как монотонная, механическая, с ровной, плоской интонацией. Другими исследователями показано, что речь детей с РАС характеризуется высокими значениями частоты основного тона и ее вариативностью – в речи 8–9-летних португальских детей [17], 4–10-летних билингвов (хинди–английский) [18], детей 6–11 лет с высокофункциональным аутизмом, говорящих на кантонском и мандаринском диалектах китайского языка [19], 4–6.5-летних израильских детей [12], русских детей и подростков 5–14 лет [4, 9]. Предполагается, что высокие значения диапазона частоты основного тона являются показателем задержки речевого развития детей с РАС [18]. Аномальную просодию выделяют в качестве основного признака речи пациентов с РАС [12, 20]. В нескольких исследованиях отмечено атипичное словесное и фразовое ударение [11]. Наряду с высокими значениями частоты основного тона и диапазона частоты основного тона описан атипичный спектр речевых сигналов [12].

СД – одна из форм геномной патологии. Особенности строения речевого аппарата детей с СД [21] обуславливают снижение разборчивости речи и четкости артикуляции [22], уменьшение разницы между значениями двух первых формантных частот кардинальных гласных [23, 24] по сравнению со сверстниками с типичным развитием (ТР). Люди с СД могут демонстрировать различные нарушения произношения [8]. Дети растягивают слова и ударные гласные, что влияет на постановку словесного ударения и, наряду с нечеткой артикуляцией, затрудняет распознавание речи ребенка [25]. Ребенок может говорить быстро и “глотать” окончания слов, говорить очень тихо и с назализацией, говорить медленно, заикаться, путать звуки в словах и повторять одно и то же слово много раз, правильно произносить слова, пропускать слоги в словах, менять местами звуки в слове и не договаривать окончания слов, заменять звуки в слове на более легкие для произношения [26].

Для детей с СД характерна задержка речевого развития, которая влияет на разные области: синтаксис, словарный запас, разборчивость речи [27]. Дети испытывают трудности в понимании предложно-именных, сложноподчиненных, инвертированных конструкций, отражающих коммуникативный аспект речи. Отмечаются индивидуальные различия, связанные с развитием артикуляционных навыков, словар-

Таблица 1. Характеристика детей-участников исследования

Группа	Количество	Возраст, лет
Типичное развитие	120	4–16
Расстройства аутистического спектра	85	4–16
Синдром Дауна	37	5–12
Умственная отсталость легкой степени	18	5–12

ным запасом и/или задержкой формирования синтаксической структуры высказывания [27].

Нарушения речи и голоса у детей, их разная степень выраженности позволяют поставить вопрос, какая информация о ребенке с атипичным развитием может быть доступна взрослым при прослушивании его речи. Решение этого вопроса важно для подбора персонала, работающего с детьми с атипичным развитием, организации процесса взаимодействия с детьми. Полученная информация может быть использована для более точной диагностики степени тяжести нарушений речи. Особое внимание к перцептивным характеристикам голоса обусловлено возможностью их применения для скрининга, диагностики и лечения.

Важная проблема – степень сложности речевого материала, используемого для прослушивания в перцептивных экспериментах. Влияет ли организация стимульного материала на характеристики восприятия?

Цель исследования – определить возможность распознавания взрослыми информации о детях с типичным и атипичным развитием при прослушивании их речи.

Первая задача заключалась в определении способности взрослых распознавать пол, возраст, эмоциональное состояние “комфорт–нейтральное–дискомфорт”, значение слов и/или фраз, психоневрологическое состояние детей “типичное развитие–нарушения развития” при прослушивании тестов, содержащих речевой материал.

Вторая задача состояла в оценке влияния организации речевого материала в текстах и опыта взаимодействия с детьми аудитора на восприятие информации о поле, возрасте и состоянии говорящего.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Аудиторы

В перцептивном эксперименте приняли участие 685 взрослых аудиторов (возраст: $M = 22.8$ лет, диапазон – 18–45.4 лет). У всех аудиторов слух в норме, пороги слуха – в пределах возрастной нормы. 545 информантов были носителями русского языка, 140 – иностранных языков (арабский, азербайджанский, узбекский, туркменский), им было предложено прослушать образцы речи русских детей. При отборе иностранных студентов не учитывался их родной язык; важной была информация о недостаточном владении русским языком – все носители иностранных языков изучали русский язык менее 1 года. Их результаты были подвергнуты перекрестному сравнению в последующих анализах.

Набор данных

Записи речи 260 детей были взяты из базы данных “AD_Child.Ru” [28] (табл. 1).

Выбор детей-информантов обусловлен нарушением у них разных уровней организации речи, выступающих в качестве симптомов ведущего заболевания (РАС, СД) [22] или сопровождающих основное заболевание (УО) [29]. Записи речи ти-

пично развивающихся (ТР) детей использовались в качестве контроля. Запись речи детей осуществляли в ситуациях диалогов с родителями и экспериментатором с использованием цифрового магнитофона “Marantz PMD660” с внешним микрофоном “SENNHEIZER e835S”, запись поведения детей – с использованием видеокамеры “SONY HDR-CX560E”. Речевые файлы сохраняли в формате Windows PCM WAV, 44 100 Гц, 16 бит.

Тестовые последовательности для перцептивного эксперимента

Создано 30 тестовых последовательностей. Тесты различались по: типам и количеству образцов речи; количеству, полу, возрасту и психоневрологическому состоянию детей, чей речевой материал включен в тест. Речевой материал одних и тех же детей мог быть включен в разные тесты. Продолжительность тестовых последовательностей составляла от 10 до 25 мин. Каждый речевой сигнал в тестах повторялся один раз. Интервал между различными речевыми сигналами составлял 10 с. Для создания тестов, содержащих эмоциональную речь, три эксперта с профессиональным опытом анализа речи выбрали высказывания, которые были произнесены детьми в состоянии дискомфорта, комфорта и нейтральном состоянии (эксперты просматривали видео записи и опирались на подробный протокол записи).

Перцептивный эксперимент

Перед аудиторами стояли задачи: определить пол, возраст, психоневрологическое состояние ребенка и лексическое значение высказываний при прослушивании тестовых последовательностей. Тесты предъявляли группам аудиторов не более 10 человек в открытом поле. В специально разработанной анкете аудиторы отмечали информацию о себе: пол, возраст, наличие собственных детей и опыт взаимодействия с детьми (отсутствует, бытовой, профессиональный). При наличии профессионального опыта указывались квалификация и стаж работы по специальности. После прослушивания каждого речевого сигнала, аудиторы отмечали в анкете напротив номера сигнала вариант своего ответа в зависимости от поставленной задачи.

Аудиторы не проходили предварительного обучения, не знали о диагнозах, поле, реальном возрасте детей, так как в инструкции возраст не указывался или указывался только возрастной диапазон.

При распознавании эмоционального состояния ставили задачу определить состояние говорящего ребенка: комфорт–нейтральное (спокойное)–дискомфорт. Во время одной экспериментальной сессии аудиторы прослушивали один тест. Всего проведено 40 перцептивных экспериментов. Все перцептивные эксперименты проведены с двойным слепым контролем.

Статистический анализ данных проводился в программе “Statistica” с использованием непараметрических критериев: коэффициент корреляции Спирмена ($p < 0.05$), регрессионный и множественный регрессионный анализ. Все данные ранжированы по степени сложности с учетом следующих показателей: сложность тестовой последовательности (включен речевой материал детей с одним диагнозом/разными диагнозами), речевой материал, задание для аудиторов, опыт аудиторов (отсутствует, бытовой и профессиональный), родной язык аудиторов.

Все процедуры были одобрены Этическим комитетом Санкт-Петербургского государственного университета для исследований в области здравоохранения и человека (IRB00003875St.PetersburgStateUniversity IRB#1 – Behavioral), от родителей каждого ребенка-участника исследования получено письменное информированное согласие.

Таблица 2. Правильное распознавание пола, возраста, психоневрологического и эмоционального состояния детей разными группами аудиторов (%), количество тестов и аудиторов

Задание		Количество тестов (русских аудиторов)	Правильные ответы русских аудиторов	Количество тестов (иностраннных аудиторов)	Правильные ответы иностраннных аудиторов
Пол	ТР-ж	12 (360)	61	3 (70)	91
	ТР-м	12 (409)	81	5 (104)	92
	РАС-ж	14 (352)	54	1 (21)	9.4
	РАС-м	14 (489)	78	3 (55)	77.6
	СД-ж	6 (105)	28.3	2 (34)	1.0
	СД-м	8 (242)	77	2 (34)	68.5
	УО-ж	4 (137)	49	1 (21)	69.8
	УО-м	4 (137)	71.4	1 (21)	72.7
Возраст	ТР	12 (409)	20	5 (104)	34.5
	РАС	14 (489)	17.8	3 (55)	12.4
	СД	8 (242)	12.2	2 (34)	2.6
	УО	2 (49)	9	3 (48)	18.9
Психоневрологическое состояние	ТР	10 (352)	73	2 (34)	56.7
	РАС	16 (540)	73.5	6 (84)	53
	СД	8 (264)	78.5	2 (34)	64.9
Эмоциональное состояние	ТР	6 (250)	49.4	5 (90)	39.8
	РАС	3 (167)	61	4 (49)	54
	СД	7 (364)	62.3		
Значение	ТР	5 (230)	72.3		
	РАС	4 (144)	47.9		
	СД	2 (46)	24		

* ж – женский пол, м – мужской.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение пола, возраста, состояния и лексического значения высказываний аудиторами при прослушивании детской речи

При определении пола детей все группы аудиторов распознавали мужской пол лучше, чем женский (табл. 2). Русские и иностранные аудиторы лучше определяли пол ТР мальчиков, чем мальчиков с РАС. Иностраннные аудиторы правильно распознавали пол по речи девочек с ТР, но не могли определить пол девочек с СД.

Возраст детей все группы аудиторов определяют плохо, указывая на более низкий возраст, чем реальный, при лучшем определении возраста ТР детей и худшем – детей с СД иностранными слушателями (указанный возраст на 4.4 ± 0.3 года ниже реального). Русские аудиторы указывали возраст ТР детей ниже реального на $1.0 \pm \pm 1.5$ лет, детей с РАС – на 2.8 ± 2.1 лет, детей с СД – на 2.7 ± 1.4 года, детей с УО на 3.0 ± 1.4 года.

Русские и иностранные аудиторы правильно определяют речевой материал ТР детей как принадлежащий детям с типичным развитием; речевые сигналы детей с СД – как сигналы детей с нарушениями развития. Речевые сигналы детей с РАС русские аудиторы правильно относят к категории сигналов, принадлежащих детям с нарушениями развития, иностранные – справляются с заданием хуже.

При распознавании эмоционального состояния ребенка по его речевым сигналам показано, что русские аудиторы дают больше правильных ответов для детей с СД. Для детей с РАС (тесты слушали русские и иностранные аудиторы) большое число

правильных ответов обусловлено практически однозначным распознаванием аудиоторами дискомфортного состояния у детей с РАС.

Пол, эмоциональное и психоневрологическое состояние информанта, в меньшей степени – возраст, находят отражение в паралингвистической информации, поэтому эти задания были предложены для выполнения русским и иностранным слушателям. Задание на распознавание лексического значения речевого материала выполняли только русские аудиторы, так как для его выполнения требуется опора на лингвистическую информацию.

Аудиторы лучше определили значение речевого материала ТР детей, детей с РАС, хуже – детей с СД (табл. 2).

Влияние организации тестовых последовательностей на распознавание аудитором информации о ребенке при прослушивании его речи

Регрессионный и множественный регрессионный анализ, проведенные по данным всех перцептивных экспериментов, выявили корреляции между возрастом, полом и вероятностью распознавания состояния детей аудитором, организацией тестового материала и заданием для аудиторов.

На основе множественного регрессионного анализа показано, что правильное распознавание состояния ТР детей (как типичное развитие), детей с РАС и с СД (нарушение развития) связано с опытом аудитора (профессиональным) и его языком (русским), речевым материалом (слова, слова и фразы), включенным в тестовые последовательности. На распознавание психоневрологического состояния ТР детей и детей с РАС влияет задание для аудиторов (чем больше заданий, тем хуже распознавание); на распознавание состояния ТР детей и детей с СД дополнительное влияние оказывает количество детей, чей материал представлен в тесте (табл. 3).

Определение эмоционального состояния ТР детей и детей с РАС связано с заданием для аудиторов и количеством аудиторов, прослушивающих тесты. Выявлена отрицательная корреляция между сложностью задания для слушателей и распознаванием эмоционального состояния ТР детей; для детей с РАС более сложное задание для аудиторов связано с лучшим распознаванием эмоционального состояния по речи. Эмоциональное состояние детей с ТР распознается лучше, если количество аудиторов, прослушивающих тест, меньше. Распознавание эмоционального состояния детей с РАС положительно связано с количеством речевых сигналов в тесте, речевым материалом (распознавание лучше, если речевой материал представлен вокализациями, а не словами и фразами), опытом аудиторов и их родным языком (русским) (табл. 4).

Определение лексического значения речевого материала ТР детей связано со степенью сложности речевого материала в тесте ($R^2 = 0.813$, $F(1, 9) = 39.068$, $\beta = 0.902$, $p < 0.001$) – регрессионный анализ; для детей с РАС – с опытом аудиторов ($R^2 = 0.516$, $F(1, 8) = 8.512$, $\beta = 0.718$, $p < 0.01$); речевым материалом (фразы) ($R^2 = 0.92$, $F(2, 7) = 40.631$) ($\beta = 0.553$, $p < 0.003$), возрастом детей ($\beta = 0.539$, $p < 0.003$) – множественный регрессионный анализ; для детей с СД – с речевым материалом в тесте (фразы) ($R^2 = 0.854$, $F(1, 4) = 320.33$, $\beta = 0.994$, $p < 0.001$) и опытом аудиторов ($R^2 = 0.988$, $F(1, 4) = 320.33$, $\beta = 0.993$, $p < 0.001$).

На определение возраста ТР детей оказывает влияние только задание, которое дается аудиторам; возраста детей с РАС – речевой материал в тесте, задание аудиторам, язык аудитора (русский) (табл. 5). Определение возраста детей с СД связано с речевым материалом детей (слов, так как ребенок произносит их более четко, чем фразы) ($R^2 = 0.272$, $F(1, 17) = 6.344$, $\beta = -0.522$, $p < 0.001$).

Таблица 3. Связь между организацией тестовых последовательностей, индивидуальными особенностями аудиторов и правильным распознаванием психоневрологического состояния детей с ТР, РАС и СД. Данные множественного регрессионного анализа*

R^2	F	Независимые переменные	β	$SE-\beta$	B	$SE-B$	t	p -уровень
Зависимые переменные: Психоневрологическое состояние детей								
ТР $t(32)$								
0.553	(9, 32) 4.395	Количество детей	-1.887	0.696	-4.866	1.796	-2.709	0.01
		Речевой материал	0.638	0.308	8.086	3.9	2.073	0.046
		Задание для аудиторов	-2.101	0.567	-1.563	0.42	-3.716	0.001
		Опыт аудитора	-0.78	0.154	-6.834	1.348	-5.709	0.001
		Язык аудитора	0.345	0.123	21.781	7.743	2.806	0.008
РАС $t(97)$								
0.697	(9, 97) 24.843	Речевой материал	0.319	0.092	6.175	1.795	3.439	0.001
		Задание для аудиторов	-0.694	0.11	-1.063	0.169	-6.302	0.001
		Опыт аудитора	0.321	0.821	3.634	0.931	3.903	0.001
		Язык аудитора	0.293	0.062	23.448	4.972	4.716	0.001
СД $t(28)$								
0.926	(9, 28) 38.884	Количество детей	1.22	0.428	10.391	3.651	2.846	0.008
		Количество сигналов	-0.418	0.083	-1.01	0.202	-4.996	0.001
		Речевой материал	0.33	0.127	9.095	3.499	2.599	0.014
		Опыт аудитора	0.238	0.067	4.24	1.208	3.508	0.001
		Язык аудитора	0.298	0.053	37.778	6.942	5.586	0.001

* R^2 – коэффициент корреляции; SE – стандартная ошибка; B – коэффициент регрессии.

Таблица 4. Связь между организацией тестовых последовательностей, индивидуальными особенностями аудиторов и правильным распознаванием эмоционального состояния детей с ТР и РАС. Данные множественного регрессионного анализа *

R^2	F	Независимые переменные	β	$SE-\beta$	B	$SE-B$	t	p -уровень
Зависимые переменные: Эмоциональное состояние детей								
ТР $t(37)$								
0.795	(5, 37) 28.773	Задание	-1.015	0.907	-0.573	0.052	-11.172	0.001
		Количество аудиторов	-0.775	0.091	-0.148	0.017	-8.482	0.001
РАС $t(25)$								
0.996	(7, 25) 881.38	Количество сигналов	0.295	0.02	0.475	0.033	14.285	0.001
		Речевой материал	-0.803	0.03	-17.627	0.672	-26.202	0.001
		Задание	3.427	0.139	1.92	0.078	24.591	0.001
		Опыт аудитора	3.914	0.147	0.781	0.029	26.616	0.001
		Язык аудитора	0.605	0.014	5.95	1.139	42.572	0.001

* R^2 – коэффициент корреляции; SE – стандартная ошибка; B – коэффициент регрессии.

Таблица 5. Связь между организацией тестовых последовательностей, индивидуальными особенностями auditors и правильным распознаванием возраста детей с ТР и РАС. Данные множественного регрессионного анализа*

R^2	F	Независимые переменные	β	$SE-\beta$	B	$SE-B$	t	p -уровень
Зависимые переменные: Возраст детей								
ТР							$t(17)$	
0.804	(7, 17) 9.985	Задание	1.488	0.636	1.815	0.776	2.339	0.02
РАС							$t(50)$	
0.535	(7, 50) 8.217	Речевой материал	0.525	0.154	13.146	3.867	3.399	0.001
		Задание	0.391	0.118	3.496	1.058	3.302	0.001
		Язык аудитора	0.326	0.112	24.585	8.094	2.913	0.005

* R^2 – коэффициент корреляции; SE – стандартная ошибка; B – коэффициент регрессии.

На определение пола ТР детей и детей с атипичным развитием влияют практически все факторы, анализируемые в данной работе (табл. 6).

Определение пола по речи девочек с РАС вызывает трудности при сложном задании для auditors, на определение мужского пола влияет задание для auditors и возраст детей – пол детей старшего возраста распознается по их речевым сигналам хуже, чем пол детей младшего возраста. Статистически значимые зависимости определены только для распознавания женского пола детей с СД (распознается хуже, чем пол ТР девочек и девочек с РАС) – на распознавание женского пола влияет количество детей, чей речевой материал представлен в тесте, и число auditors, прослушивающих тест.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты проведенного исследования показали, что взрослые способны правильно распознавать пол детей, их психоневрологическое состояние, но испытывают затруднения при определении эмоционального состояния детей и лексического значения речевого материала, плохо распознают возраст, особенно возраст детей с атипичным развитием. Организация тестовых последовательностей и индивидуальные особенности auditors влияют на распознавание информации, содержащейся в голосе и речи детей. Результаты исследования в целом согласуются с результатами исследований других авторов [1, 7, 10].

Особенности распознавания auditors возраста детей с типичным и атипичным развитием могут быть обусловлены существованием разных траекторий развития. Результаты нашего исследования показали, что слушатели плохо распознают возраст детей по их речи, что касается даже ТР детей. В работе, посвященной восприятию возраста по речи 120 детей – мальчиков и девочек 8–18 лет [30], показано, что auditors лучше распознают возраст детей по предложениям, чем по изолированным гласным [30]. В другом исследовании [31] показано, что взрослые могут достаточно точно определить возраст по голосу детей (5 девочек и 5 мальчиков) 5–18 лет (± 1.8 года), когда речевые высказывания представлены изолированными слогами, что, как предполагают авторы, объясняется различиями в акустических характеристиках речи. Результаты нашего перцептивного исследования показали, что определение возраста ТР детей связано только со сложностью задания для auditors и не зависит от речевого материала, включенного в тест. Речевой мате-

Таблица 6. Связь между организацией тестовых последовательностей, индивидуальными особенностями auditors и правильным распознаванием пола детей с TP, PAC и CD. Данные множественного регрессионного анализа*

R^2	F	Независимые переменные	β	$SE-\beta$	B	$SE-B$	t	p -уровень
Зависимые переменные:								
Пол детей								
TP-ж								$t(30)$
0.956	(9, 30) 73.024	Количество детей	1.795	1.192	9.02	0.964	9.361	0.001
		Количество сигналов	-0.423	0.177	-0.353	0.148	-2.39	0.02
		Речевой материал	1.071	0.159	23.344	3.471	6.726	0.001
		Задание	-1.19	0.260	-3.374	0.483	6.99	0.001
		Опыт аудитора	0.09	0.039	2.493	1.008		0.006
TP-м								$t(39)$
0.96	(9, 39) 105.63	Количество сигналов	1.193	0.141	0.823	0.09	9.141	0.001
		Речевой материал	0.974	0.083	15.837	1.354	11.696	0.001
		Возраст детей	0.12	0.057	0.542	0.261	2.074	0.004
		Количество auditors	-0.455	0.054	-0.185	0.022	-8.396	0.001
		Язык аудитора	0.176	0.039	7.747	1.725	4.492	0.001
PAC-ж								$t(48)$
0.906	(9, 48) 62.034	Кол-во детей	0.391	0.143	3.074	1.126	2.703	0.008
		Речевой материал	0.837	0.067	29.056	2.350	12.36	0.001
		Задание	-0.841	0.071	-2.368	0.211	-11.77	0.001
		Количество auditors	0.399	0.085	1.168	0.348	4.695	0.001
		Язык аудитора	0.282	0.066	29.137	6.85	4.252	0.001
PAC-м								$t(63)$
0.73	(9, 63) 33.714	Количество сигналов	0.429	0.148	0.404	0.139	2.895	0.005
		Речевой материал	1.021	0.097	12.468	1.179	10.578	0.001
		Возраст детей	-0.202	0.086	-0.894	0.383	2.336	0.022
		Задание	-0.904	0.099	1.117	0.11	-9.147	0.001
		Количество auditors	0.241	0.103	0.274	0.117	2.334	0.022
CD-ж								$t(22)$
0.95	(7, 22) 59.688	Количество детей	0.788	0.116	-2.782	0.411	6.75	0.001
		Количество auditors	0.301	0.132	0.019	0.008	2.29	0.03

* R^2 – коэффициент корреляции; SE – стандартная ошибка; B – коэффициент регрессии; ж – женский пол, м – мужской пол.

риал влияет на распознавание возраста детей с PAC – их возраст лучше распознается по фразам, чем по отдельным словам.

Наше мнение совпадает с позицией авторов статьи [31], которые отмечают, что определение возраста детей по речи является сложной задачей. Индивидуальные темпы созревания структур речевого тракта, изменения их конфигурации и размеров [32], становления речевого дыхания обуславливают значительные различия в характеристиках голоса детей одного возраста. Трудности при определении возраста

та детей с атипичным развитием также связаны с возрастной динамикой изменения структур речевого тракта [32] и усугубляются наличием заболевания в анамнезе ребенка.

Показано, что у детей с СД разборчивость речи улучшается с возрастом, особенно в возрасте от 4 до 16 лет [33], тогда как у ТР детей разборчивость речи повышается в основном в дошкольном возрасте. Развитие невербальных навыков детей с СД соответствует траектории общего интеллектуального развития ребенка, дефицит вербальных навыков со временем проявляется сильнее [34]. Систематический обзор данных не выявил существенных различий между детьми с СД и ТР по акустическим характеристикам речи, при этом исследования аэродинамических параметров показывают, что у детей с СД наблюдаются значительные нарушения в работе голосовых складок [35].

Сложности при распознавании возраста детей с РАС могут быть связаны с высокими значениями частоты основного тона [например, 12], что приводит к отнесению их речевых сигналов к младшему возрасту и классификации речевых сигналов мальчиков как сигналов девочек [4].

В исследовании установлено, что профессиональный опыт слушателей имеет значение для распознавания лексического значения речи и психоневрологического состояния ребенка. Наши результаты не полностью согласуются с данными [36] о том, что пол и опыт слушателя существенно не влияют на оценку разборчивости речи людей с нарушениями речи (дизартрия). Возможно, это связано с более яркими проявлениями нарушений речи при дизартрии, которые не наблюдаются у детей с атипичным развитием. Следует также учитывать специфику речи, обусловленную разными заболеваниями детей. Показано, что непрофессиональные слушатели могут отличать атипичных детей от типичных вне контекста ситуации взаимодействия, основываясь исключительно на разборчивости речи [37].

Представленное исследование моделирует ситуацию, с которой человек, разговаривающий по телефону, постоянно сталкивается в реальной жизни — выносит суждение о собеседнике без опоры на визуальный контекст.

Наше исследование позволяет говорить об идентификации нарушений развития по голосу человека при сложной и разнообразной организации речевого материала. Определение пола, возраста и состояния собеседника, в нашем исследовании — детей разного возраста с нарушениями развития, представляет практический интерес, поскольку может быть основой взаимодействия человека и компьютера при разработке игр и образовательных программ для детей с атипичным развитием.

Неинвазивный характер перцептивных исследований имеет значение для решения проблемы классификации голосов на соответствующие норме и патологические. Данные перцептивного анализа вносят вклад в формирование представлений о профиле нарушений голоса и речи у информантов с СД, РАС, УО, что имеет значение для будущих исследований в области клинической диагностики и лечения. Наши данные, впервые полученные на материале русского языка, могут стать основой для создания приложений для ранней диагностики нарушений развития ребенка.

Результаты исследования показали, что взрослые могут правильно распознать пол и психоневрологическое состояние детей, однако испытывают трудности с определением эмоционального состояния и лексического значения речевого материала, плохо распознают возраст, в особенности возраст детей с атипичным развитием.

Речевой материал (слова, фразы, речевые конструкции), сложность теста, количество детей, чей речевой материал включен в тесты, связаны преимущественно с распознаванием пола и возраста детей; количество сигналов в тесте связано с определением пола и психоневрологического состояния; речевой материал связан с распознаванием лексического значения.

Индивидуальные особенности аудиторов: профессиональный опыт влияет на распознавание лексического значения речевого материала и психоневрологического состояния ребенка; родной язык слушателя влияет на распознавание эмоционального состояния ребенка. Эти результаты указывают на необходимость учета перечисленных факторов при проведении перцептивных экспериментов с детской речью.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 18-18-00063).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация (Е.Е.Л.), методология (Е.Е.Л., О.В.Ф.), проверка данных (Е.Е.Л., О.В.Ф.), получение данных (Е.Е.Л., О.В.Ф., А.С.Н., А.С.Г.), подготовка оригинальной статьи (Е.Е.Л., О.В.Ф.), редактирование (Е.Е.Л., О.В.Ф.), администрирование проекта (Е.Е.Л.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gelfer MP* (1988) Perceptual attributes of voice: Development and use of rating scales. *J Voice* 2: 320–326.
[https://doi.org/10.1016/S0892-1997\(88\)80024-9](https://doi.org/10.1016/S0892-1997(88)80024-9)
2. *Bruckert L, Liénard JS, Lacroix A, Kreutzer M, Leboucher G* (2006) Women use voice parameters to assess men's characteristics. *Proc Biol Sci* 273: 83–89.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3265>
3. *Goy H, Kathleen Pichora-Fuller M, van Lieshout P* (2016) Effects of age on speech and voice quality ratings. *J Acoust Soc Am* 139(4): 1648.
<https://doi.org/10.1121/1.4945094>
4. *Lyakso E, Frolova O, Grigorev A* (2017) Perception and acoustic features of speech of children with autism spectrum disorders. *Lecture Notes in Computer Science* 10458:602–612.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-66429-3_60
5. *Lausen A, Schacht A* (2018) Gender differences in the recognition of vocal emotions. *Front Psychol* 9: 882.
<https://doi.org/10.3389/fpsyg.2018.00882>
6. *Verkhodanova V, Trckova D, Coler M, Lowie W* (2020) More than words: Cross-linguistic exploration of Parkinson's disease identification from speech. *Lecture Notes in Computer Science* 12335: 613–623.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-60276-5_59
7. *Jones HN, Crisp KD, Kuchibhatla M, Mahler L, Risoli Th Jr, Jones CW, Kishnani P* (2019) Auditory-perceptual speech features in children with Down syndrome. *Am J Intellect Dev Disabil* 124(4): 324–338.
<https://doi.org/10.1352/1944-7558-124.4.324>
8. *O' Leary D, Lee A, O'Toole C, Gibbon F* (2020) Perceptual and acoustic evaluation of speech production in Down syndrome: A case series. *Clin Linguist Phon* 34(1–2): 72–91.
<https://doi.org/10.1080/02699206.2019.1611925>
9. *Lyakso EE, Frolova OV* (2020) Early development indicators predict speech features of autistic children. *ICMI '20 Companion: Compan Publicati of the 2020 Int Confer on Multimodal Interaction* 514–521.
<https://doi.org/10.1145/3395035.3425183>
10. *Kent RD* (2009) Perceptual sensorimotor speech examination for motor speech disorders. In: *McNeil MR* (ed) *Clinical management of sensorimotor speech disorders*. Thieme 19–29.
11. *Diehl J, Paul R* (2013) Acoustic and perceptual measurements of prosody production on the profiling elements of prosodic systems by children with autism spectrum disorders. *Appl Psycholinguist* 34(1): 135–161.
<https://doi.org/10.1017/S0142716411000646>
12. *Bonneh YS, Levano Y, Dean-Pardo O, Lossos L, Adini Y* (2011) Abnormal speech spectrum and increased pitch variability in young autistic children. *Front Hum Neurosci* 4(237): 1–7.
<https://doi.org/10.3389/fnhum.2010.00237>

13. Nakai Y, Takashima R, Takiguchi T, Takada S (2014) Speech intonation in children with autism spectrum disorder. *Brain & Development* 36: 516–522.
<https://doi.org/10.1016/j.braindev.2013.07.006>
14. Whyte EM, Nelson KE (2015) Trajectories of pragmatic and nonliteral language development in children with autism spectrum disorders. *J Commun Disord* 54: 2–14.
<https://doi.org/10.1016/j.jcomdis.2015.01.001>
15. Alghazo MT, Hatamleh LS, Bashtawi M (2018) Phonological and lexical abilities of Jordanian children with autism. *Appl Neuropsychol Child* 9(2): 116–124.
<https://doi.org/10.1080/21622965.2018.1534690>
16. Kanner L (1943) Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child* 2: 217–250.
17. Filipe MG, Frota S, Castro SL, Vicente SG (2014) Atypical prosody in Asperger syndrome: perceptual and acoustic measurements. *J Autism Dev Disord* 44(8): 1972–1981.
<https://doi.org/10.1007/s10803-014-2073-2>
18. Sharda M, Subhadra TP, Sahaya S, Nagaraja Ch, Singh L, Mishra R, Sen A, Singhal N, Erickson D, Singh N (2010) Sounds of melody — Pitch patterns of speech in autism. *Neurosci Lett* 478(1): 42–45.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.04.066>
19. Chen F, Cheung CCh, Peng G (2021) Linguistic tone and non-linguistic pitch imitation in children with autism spectrum disorders: A cross-linguistic investigation. *J Autism Dev Disord*.
<https://doi.org/10.1007/s10803-021-05123-4>
20. Paul R, Augustyn A, Klin A, Volkmar F (2005) Perception and production of prosody by speakers with autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord* 35: 205–220.
<https://doi.org/10.1007/s10803-004-1999-1>
21. Kanamori G, Witter M, Brown J, Williams-Smith L (2000) Otolaryngologic manifestations of Down syndrome. *Otolaryngol Clin North Am* 33(6): 1285–1292.
[https://doi.org/10.1016/s0030-6665\(05\)70281-4](https://doi.org/10.1016/s0030-6665(05)70281-4)
22. Kent RD, Vorperian HK (2013) Speech impairment in Down syndrome: a review. *J Speech Lang Hear Res* 56: 178–210.
[https://doi.org/10.1044/1092-4388\(2012/12-0148\)](https://doi.org/10.1044/1092-4388(2012/12-0148))
23. Moura CP, Cunha LM, Vilarinho H, Cunha MJ, Freitas D, Palha M, Pais-Clemente M (2008) Voice parameters in children with Down syndrome. *J Voice* 22: 34–42.
<https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2006.08.011>
24. Carl M., Kent RD, Levy ES, Whalen DH (2020) Vowel acoustics and speech intelligibility in young adults with Down syndrome. *J Speech Lang Hear Res* 63(3): 674–687.
https://doi.org/10.1044/2019_JSLHR-19-00204
25. Городный ВА, Ляксо ЕЕ (2018) Характеристика речи детей 6–7 лет с расстройствами аутистического спектра и синдромом Дауна. Теорет и приклад лингвистика 2: 22–37.
https://doi.org/10.22250/2410-7190_2018_4_2_22_37
26. Cleland J, Wood S, Hardcastle W, Wishart J, Timmins C (2010) Relationship between speech, oromotor, language and cognitive abilities in children with Down's syndrome. *Int J Lang Commun Disord* 45(1): 83–95.
<https://doi.org/10.3109/13682820902745453>
27. Kaiser AP, Hester PP, McDuffie AS (2001) Supporting communication in young children with developmental disabilities. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 7(2): 143–150.
<https://doi.org/10.1002/mrdd.1020>
28. Lyakso E, Frolova O, Kaliyev A, Gorodnyi V, Grigorev A, Matveev Y (2019) AD-Child.Ru: Speech corpus for Russian children with atypical development. *Lecture Notes in Computer Sci* 11658: 299–308.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-26061-3_31
29. Poliženská K, Kapalková S, Novotková M (2018) Receptive language skills in Slovak-speaking children with intellectual disability: Understanding words, sentences, and stories. *J Speech Lang Hear Res* 61(7): 1731–1742.
https://doi.org/10.1044/2018_JSLHR-L-17-0029
30. Amir O, Engel M, Shabtai E, Amir N (2012) Identification of children's gender and age by listeners. *J Voice* 26(3): 313–321.
<https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2011.06.001>
31. Barrera S, Assmann PF (2018) Modeling the perception of children's age from speech acoustics. *J Acoust Soc Am* 143(5): EL361–EL366.
<https://doi.org/10.1121/1.5037614>
32. Vorperian HK, Wang S, Chung MK, Schimek EM, Durtschi RB, Kent RD, Gentry LR (2009) Anatomic development of the oral and pharyngeal portions of the vocal tract: An imaging study. *J Acoust Soc Am* 125(3): 1666–1678.
<https://doi.org/10.1121/1.3075589>

33. *Wild A, Vorperian HK, Kent RD, Bolt DM, Austin D* (2018) Single-word speech intelligibility in children and adults with Down syndrome. *Am J Speech Lang Pathol* 27(1): 222–236.
https://doi.org/10.1044/2017_AJSLP-17-0002
34. *Carvajal F, Iglesias J* (2006) Judgements of facial and vocal signs of emotion in infants with Down syndrome. *Dev Psychobiol* 48(8): 644–652.
<https://doi.org/10.1002/dev.20173>
35. *Krishnamurthya R, Ramani SA* (2020) Aerodynamic and acoustic characteristics of voice in children with Down syndrome — A systematic review. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 133:109946.
<https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2020.109946>
36. *Walshe M, Miller N, Leahy M, Murray A* (2010) Intelligibility of dysarthric speech: perceptions of speakers and listeners. *Int J Lang Commun Disord* 43(6): 633–648.
<https://doi.org/10.1080/13682820801887117>
37. *Redford MA, Kapatsinski V, Cornell-Fabiano J* (2018) Lay listener classification and evaluation of typical and atypical children's speech. *Lang Speech* 61(2): 277–302.
<https://doi.org/10.1177/0023830917717758>

Perceptual Evaluation of Speech Production in Children with Autism Spectrum Disorders, Down Syndrome, and Intellectual Disabilities by Adults

E. E. Lyakso^{a, *}, O. V. Frolova^{a, **}, A. S. Nikolaev^a, and A. S. Grigorev^a

^a *Saint-Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia*

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

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

The human voice can express minor nuances of mood and state, which the listener's auditory system can catch and recognize, based on personal experience, current mood, and the speaker's motivation. Speech and voice disorders in children, their different degrees of severity allow us to ask what information about a child with atypical development adults can extract while listening to their speech. The goal of the study was to determine the recognition by adults of information about children via their speech. The method of auditory perceptual experiments was used. 685 listeners participated in the experiment. 40 test sequences included the speech material of 260 children aged 4 to 16 years - typically developing, children with autism spectrum disorders, Down syndrome, intellectual disabilities. The listeners can correctly recognize the children's gender, the psychoneurological state and have difficulties with the determination of the emotional state and the lexical meaning of speech material, poorly recognize the age, in particular, of children with atypical development. A correlation between the children's gender, age, psychoneurological and emotional state determination by listeners and the organization of test sequences and the listener's professional experience has been found.

Keywords: child speech, perceptual analysis, age, gender, experiment

**ВЛИЯНИЕ МЕТФОРМИНОВОЙ ТЕРАПИИ НА СТИМУЛЯЦИЮ
АГОНИСТАМИ РЕЦЕПТОРА ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА
ПРОДУКЦИИ ТЕСТОСТЕРОНА И СПЕРМАТОГЕНЕЗА
У ДИАБЕТИЧЕСКИХ КРЫС**

© 2021 г. А. А. Бахтюков¹, К. В. Деркач¹, А. М. Степочкина¹, В. Н. Сорокоунов^{1, 2},
Л. В. Баюнова¹, И. А. Лебедев¹, А. О. Шпаков^{1, *}

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

²*Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

**E-mail: alex_shpakov@list.ru*

Поступила в редакцию 20.08.2021 г.

После доработки 03.09.2021 г.

Принята к публикации 03.09.2021 г.

Восстановление функций мужской репродуктивной системы при сахарном диабете 2-го типа (СД2) представляет собой одну из актуальных проблем современной эндокринологии. Для этого могут быть использованы как препараты, улучшающие глюкозный гомеостаз и инсулиновую чувствительность, в первую очередь метформин, так и активаторы рецептора лютеинизирующего гормона (ЛГР) – хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) и низкомолекулярные аллостерические агонисты ЛГР. Целью исследования было изучить влияние метформиновой терапии (4 нед., 120 мг/кг/сутки) на стимулирующие стероидогенез и сперматогенез эффекты, вызываемые пятидневным введением самцам крыс Вистар с СД2 5-амино-*N*-трет-бутил-2-(метилсульфанил)-4-(3-(никотинамидо)фенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамида (ТП03), аллостерического ЛГР-агониста (15 мг/кг/сутки), и ХГЧ (20 МЕ/крысу/сутки). СД2 вызывали высокожировой диетой и инъекцией низкой дозы стрептозотоцина (25 мг/кг). Лечение метформином частично восстанавливало уровни тестостерона и нормализовало сперматогенез у крыс с СД2. В первый день лечение метформином усиливало стероидогенные эффекты ТП03 и ХГЧ, но в последующие дни его потенцирующий эффект не выявлялся. При пятидневной обработке диабетических крыс с помощью ТП03 и ХГЧ восстанавливалось число эпидидимальных сперматозоидов, в том числе с поступательным прямолинейным движением, снижалась доля дефектных форм сперматозоидов. Показатели сперматогенеза при лечении метформином или ЛГР-агонистами по отдельности были сопоставимы с таковыми при их совместном применении. Таким образом, метформиновая терапия усиливает продукцию тестостерона, индуцированную ТП03 и ХГЧ, в первый день обработки этими препаратами, но в дальнейшем стероидогенный и сперматогенный эффекты ЛГР-агонистов в группах диабетических крыс с лечением метформином и без такового существенно не различались.

Ключевые слова: стероидогенез, сперматогенез, сахарный диабет 2-го типа, метформин, хорионический гонадотропин, тиенопиримидин, тестостерон

DOI: 10.31857/S0869813921110029

Одним из осложнений сахарного диабета 2-го типа (СД2), который характеризуется инсулиновой резистентностью, нарушением глюкозного гомеостаза и липидного обмена, являются дисфункции репродуктивной системы и нарушение функциональной активности гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси. У мужчин с СД2 развивается андрогенный дефицит и нарушается сперматогенез, что приводит к снижению фертильности и может стать причиной бесплодия [1–4]. Поиск эффективных подходов для восстановления функций мужской репродуктивной системы в условиях СД2 является одной из актуальных проблем современной эндокринологии, что обусловлено как высокими темпами роста заболеваемости СД2 в мире, так и общей тенденцией к снижению рождаемости, в том числе в связи с широким распространением мужского бесплодия.

Для нормализации репродуктивного потенциала у мужчин наиболее часто используют гонадотропины, в том числе хорионический гонадотропин человека (ХГЧ), мишенью которого в тестикулярных клетках является рецептор лютеинизирующего гормона (ЛГР) [5]. ХГЧ, как и ЛГ, с высоким сродством взаимодействует с внеклеточным доменом ЛГР, который относится к рецепторам, сопряженным с гетеротримерными G-белками. Результатом этого является изменение конформации трансмембранного домена ЛГР и активация зависимых от гонадотропинов внутриклеточных сигнальных путей [6]. Ключевую роль здесь играет цАМФ-зависимый путь, который включает G_s -белок, аденилатциклазу и протеинкиназу A и ведет к активации холестерин-транспортирующего белка StAR, катализирующего первую, скорость-лимитирующую стадию стероидогенеза, а также стероидогенных ферментов, осуществляющих синтез тестостерона и его прекурсоров в клетках Лейдига. Модулирующую роль в регуляции стероидогенеза играет и фосфоинозитидный путь, который запускается через посредство ЛГР-опосредуемой активации $G_{q/11}$ -белков и фосфолипазы $C\beta$ [7]. Синтезированный в клетках Лейдига тестостерон воздействует на клетки Сертоли и, тем самым, контролирует процесс созревания и функциональной активности сперматозоидов (СП). Однако длительная стимуляция ЛГР гонадотропинами и использование их высоких доз, необходимых для достижения значимого стероидогенного эффекта, вызывают активацию β -аррестинов, ответственных за интернализацию и даун-регуляцию ЛГР, а также запускают другие механизмы отрицательной обратной связи. Все это приводит к развитию резистентности клеток Лейдига к гонадотропинам, вследствие чего их отмена способна привести к андрогенной недостаточности и нарушению сперматогенеза [5]. В условиях диабетической патологии вследствие гипергликемии, воспаления и усиления окислительного стресса снижается экспрессия ЛГР в семенниках и нарушается структура его связывающих доменов, что вызывает снижение сродства рецептора к гонадотропинам и ослабляет их эффекты на стероидогенез и сперматогенез [8, 9].

Все вышесказанное указывает на необходимость разработки новых ЛГР-агонистов, более специфичных в отношении внутриклеточных сигнальных каскадов и способных более мягко в сравнении с ХГЧ и ЛГ стимулировать стероидогенные пути, не вызывая резистентности тестикулярных клеток к эндогенным гонадотропинам. Наибольший интерес здесь представляют тиенопиримидиновые производные (ТП), которые на протяжении последних лет разрабатываются нами [10–14] и другими авторами [15–17]. В отличие от гонадотропинов, они взаимодействуют с аллостерическим сайтом, расположенным в трансмембранном домене ЛГР, и не влияют на доступность внеклеточного сайта для гонадотропинов. Их преимуществами являются селективность в отношении цАМФ-зависимого пути, отвечающего за активацию стероидогенеза, отсутствие иммуногенности, а также сохранение активности при пероральном способе введения, поскольку ТП устойчивы к деградации в желудочно-кишечном тракте и хорошо всасываются энтероцитами

[10, 11, 18]. Стероидогенные эффекты ТП сейчас интенсивно изучаются [12, 18], но их воздействие на сперматогенез как в норме, так и при СД остается мало изученным.

Препаратом первой линии при лечении СД2 является метформин, который, активируя АМФ-активируемую протеинкиназу (АМФК), основной энергетический сенсор клетки, не только восстанавливает метаболизм и инсулиновую чувствительность, но и улучшает функционирование мужской репродуктивной системы [19, 20]. Ранее нами было показано, что лечение самцов крыс и мышей с различными формами СД восстанавливает у них стероидогенез, улучшает морфологию семенных канальцев, повышает подвижность СП [9, 21, 22]. Основываясь на данных о том, что метформиновая терапия повышает чувствительность семенников диабетических крыс к однократному воздействию ХГЧ [9], мы предположили, что лечение метформином может потенцировать восстановление функций семенников у крыс с СД2 при их обработке ортостерическими (ХГЧ) и аллостерическими (ТП) агонистами ЛГР.

Целью работы было изучить влияние четырехнедельной метформиновой терапии на стимуляцию стероидогенеза и сперматогенеза у самцов крыс с СД2, вызываемую их обработкой с помощью 5-амино-*N*-трет-бутил-2-(метилсульфанил)-4-(3-(никотинамидо)фенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид (ТП03), разработанного нами аллостерического ЛГР-агониста, и гонадотропина (ХГЧ).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для проведения экспериментов были взяты двухмесячные самцы крыс Вистар (масса тела 170–200 г), которых содержали в стандартных условиях со свободным доступом к корму и воде. Все эксперименты были выполнены в соответствии с требованиями Комитета по биоэтике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, European Communities Council Directive 1986 (86/609/ЕЕС) и “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”.

СД2 вызывали с помощью высокожировой диеты (1 кг смеси содержал 524 г свиного сала, 417 г творога, 50 г печени, 5.3 г L-метионина, 1.85 г дрожжей, 1.85 г NaCl) [23], которую животные получали на протяжении 9 недель, и последующей их обработки низкой дозой (25 мг/кг) стрептозотоцина (“Sigma”, США) с продолжением диеты еще в течение 6 нед. Контрольные животные (К, $n = 18$) вместо высокожировой диеты получали стандартный корм, а вместо стрептозотоцина им вводили 0.1 М натрий-цитратный буфер (рН 4.5), растворитель стрептозотоцина. В течение всего эксперимента осуществляли мониторинг массы тела и измеряли уровень глюкозы в крови (через 2 ч после еды), для чего использовали тест-полоски “One Touch Ultra” (США) и глюкометр “Life Scan Johnson & Johnson” (Дания). Степень гипергликемии оценивали по уровню гликированного гемоглобина (HbA1c), для чего использовали набор “Multi Test HbA1c System” (“Polymer Technology Systems, Inc.”, США).

Диабетические группы формировали через 2 недели после введения стрептозотоцина, перед началом метформиновой терапии, из крыс с уровнем глюкозы выше 7 мМ (120 мин после глюкозной нагрузки) и содержанием HbA1c выше 5.5%, основываясь на результатах глюкозотолерантного теста (ГТТ). При проведении ГТТ животным (после 12-часового голодания) внутривенно вводили раствор глюкозы из расчета 2 г глюкозы на 1 кг массы тела, и в течение 120 мин измеряли уровень глюкозы в крови. Диабетических крыс случайным образом распределяли на группы без лечения (Д, $n = 18$) и с лечением метформином (ДМ, $n = 18$). Лечение метформином (перорально, суточная доза 120 мг/кг) (“Sigma-Aldrich”, США) крыс группы ДМ осуществляли в течение 4 нед., в то время как группы Д и К вместо метформина в те же сроки и в том же объеме получали его растворитель – дистиллиро-

ванную воду. Диабетических крыс при этом продолжали содержать на высокожировой диете. Через три недели после начала лечения с целью оценки терапевтического эффекта метформина в группах К, Д и ДМ повторно проводили ГТТ, измеряя уровень глюкозы в течение 120 мин, а через 120 мин оценивая уровень инсулина, который измеряли с помощью наборов “Rat Insulin ELISA kit” (“Merckodia AB”, Швеция).

За пять дней до окончания эксперимента каждую из групп контрольных, нелеченых диабетических и обработанных метформином диабетических крыс дополнительно разделили на три группы (К0/КТ/КГ, Д0/ДТ/ДГ и ДМ0/ДМТ/ДМГ), сформировав в общей сложности 9 групп (в каждой $n = 6$). Группы К0, Д0 и ДМ0 ($n = 6$) вместо препаратов получали диметилсульфоксид (ДМСО), растворитель ТП03. Группам КТ, ДТ и ДМТ ежедневно внутрибрюшинно вводили растворенное в ДМСО соединение ТП03 в суточной дозе 15 мг/кг. Группам КГ, ДГ и ДМГ ($n = 6$) в течение 5 сут подкожно вводили ХГЧ (“Московский эндокринный завод”, Россия) в суточной дозе 20 МЕ/крысу. Согласно проведенным ранее исследованиям, ДМСО не оказывает существенного влияния на оцениваемые параметры и функциональное состояние животных [14]. Соединение ТП03 синтезировали, как описано ранее [11], характеризуя его с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии. В первый и пятый день обработки ЛГР-агонистами уровень тестостерона оценивали перед их введением (10.00) и через 60, 180 и 300 мин (11.00, 13.00, 15.00) после введения ТП03 и ХГЧ. Во второй–четвертый дни его оценивали через 180 мин после введения препаратов (в 13.00), когда, согласно нашим предварительным результатам, отмечается пик стероидогенного эффекта гонадотропина, а соответствующий эффект ТП03 начинает выходить на плато [12]. Для измерения концентрации тестостерона использовали коммерческий набор “Тестостерон-ИФА” (“Алкор-Био”, Россия).

По окончании эксперимента животных наркотизировали (ингаляция 4–5%-ным изофлюраном) и декапитуировали, после чего оценивали у них показатели спермограммы, как описано ранее [24]. Для этого из каудальной части эпидидимиса извлекали 5 мг СП и помещали их в 195 мкл среды фертилизации “Quinn’s Advantage™ Medium With HEPES” (“In Vitro Fertilization Inc., Cooper Surgical Company”, США). В этой среде СП инкубировали в течение 30 мин при 37°C. Затем в счетную камеру Маклера (глубина 10 мкм, “Sefi Medical Instruments”, Израиль) добавляли 10 мкл разбавленной семенной жидкости, подсчитывали количество клеток с помощью микроскопа MICMED-5 (увеличение $\times 400$, “ЛОМО”, Россия), результаты представляли как количество клеток/г эпидидимиса яичка. Количество подвижных СП и функционально активных СП с поступательным движением рассчитывали как процент от общего количества СП, которое принимали за 100%. Морфологию СП изучали после окрашивания помещенного на предметное стекло мазка азуром и эозином с использованием набора реагентов “Спермо-Дифф-200” (ООО “Фирма Синтакон”, Россия). Количество морфологически дефектных форм, включающих СП с извитым хвостом или дефектами головки [25], рассчитывали на 100 СП в каждом препарате. Фотографии препаратов получали с помощью микроскопа “Axio Lab.A1 MAT” (“Carl Zeiss”, Германия) со встроенной телевизионной камерой (увеличение $\times 1000$), используя программу Axio-Vision 4.8.

Статистический анализ данных проводили с помощью программы “Microsoft Office Excel 2007”. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения выборок с нормальным распределением использовали t -критерий Стьюдента. Достоверными считали отличия при уровне значимости $p < 0.05$. Данные представляли как $M \pm SD$.

Таблица 1. Масса тела, гликемические показатели, уровни инсулина и тестостерона у контрольных самцов крыс (К) и диабетических животных без лечения (Д) и с лечением метформином (ДМ)

Показатель	К	Д	ДМ
Масса тела, г	337 ± 29	376 ± 38*	354 ± 34
Тошачковая глюкоза, мМ (до ГТТ)	4.3 ± 0.5	6.8 ± 0.9*	5.4 ± 0.7*#
Постпрандиальная глюкоза, мМ (через 120 мин после ГТТ)	5.2 ± 0.7	10.5 ± 2.0*	6.9 ± 1.3*#
HbA1c, %	4.5 ± 0.4	8.1 ± 1.5*	5.7 ± 1.1*#
AUC _{0–120} (ГТТ), усл.ед.*	985 ± 123	1448 ± 258*	1209 ± 185*#
Постпрандиальный инсулин, нг/мл (через 120 мин после ГТТ)	0.93 ± 0.23	1.46 ± 0.37*	1.05 ± 0.31*#
Тестостерон, нМ	13.0 ± 4.3	7.1 ± 2.8*	10.6 ± 3.0#

* – различия с контролем статистически значимы при $p < 0.05$; # – различия между группами Д и ДМ статистически значимы при $p < 0.05$. Данные представлены как $M \pm SD$. $n = 18$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Длительная высокожировая диета и обработка крыс низкой дозой стрептозоточина приводили к развитию СД2 с характерными для него гипергликемией и нарушенной толерантностью к глюкозе, на что указывают повышенные уровни постпрандиальной глюкозы, HbA1c и повышенные значения интегрированной площади под кривыми “концентрация глюкозы (мМ)–время (мин)” (AUC_{0–120}) для глюкозы в ГТТ, а также с гиперинсулинемией, о чем свидетельствует повышенный уровень инсулина через 120 мин после глюкозной нагрузки (табл. 1). Лечение метформином в значительной степени нормализовало уровни глюкозы и инсулина и восстанавливало толерантность к глюкозе (табл. 1). У крыс с СД2 были снижены базовые уровни тестостерона, и лечение метформином их частично восстанавливало (табл. 1).

Пятидневное введение ТПО3 и ХГЧ контрольным крысам повышало уровень тестостерона, причем в первые два дня более эффективным был ХГЧ, а в третий–пятый дни стероидогенные эффекты ТПО3 и ХГЧ не различались (рис. 1, табл. 2), что согласуется с данными, полученными нами ранее при изучении ТПО3 [11] и его структурного аналога ТП4/2 [14]. У крыс с СД2 как базовые, так и стимулированные ЛГР-агонистами уровни тестостерона были снижены, что иллюстрируют более низкие в сравнении с соответствующими контрольными группами значения AUC_{0–300} и AUC_{0–5}, представляющими собой интегрированную площадь под кривой “концентрация тестостерона (нМ)–время обработки (минуты или дни)” (табл. 2). Как и в контроле, стероидогенный эффект ХГЧ, оцениваемый по значению AUC_{0–300} в группе ДГ, в первый день обработки значительно превосходил таковой ТПО3 (табл. 2). В то же время на пятый день эффекты ХГЧ и ТПО3 были сопоставимыми, и значение AUC_{0–300} в группе ДГ превышало таковое в группе ДТ лишь на 40% (рис. 1, табл. 2).

Лечение диабетических крыс метформином приводило к повышению базового уровня тестостерона и усиливало стероидогенные эффекты ТПО3 и ХГЧ в первый день обработки (рис. 1, табл. 2). Различия между AUC_{0–300} для групп ДТ и ДМТ и групп ДГ и ДМГ были статистически значимы ($p < 0.05$) (табл. 2). Со второго по пятый день эффекты ТПО3 и ХГЧ у диабетических крыс с лечением метформином и без такового были сопоставимы (рис. 1). Так, различия в значениях AUC_{0–300} на пятый день обработки между группами ДТ и ДМТ и группами ДГ и ДМГ не были значимыми, а в случае AUC_{0–5} значимые различия сохранялись только между группами ДГ и ДМГ (табл. 2).

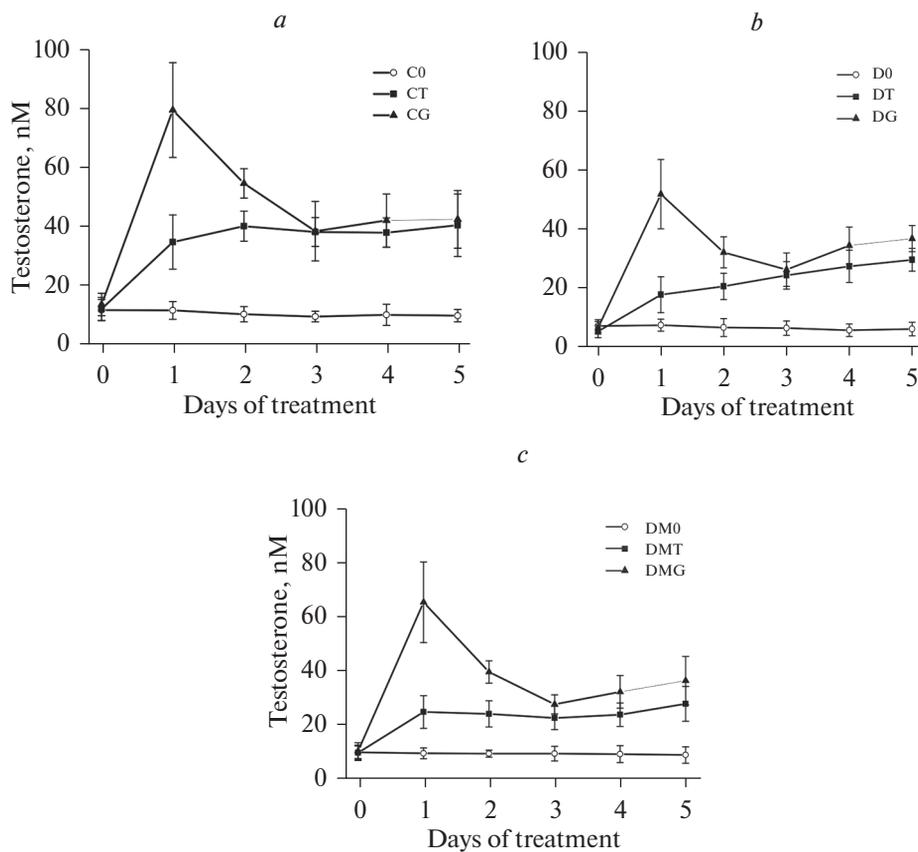


Рис. 1. Динамика изменения уровня тестостерона на протяжении пятидневной обработки самцов контрольных крыс (а), диабетических животных без лечения метформином (б) и с лечением метформином (с) с помощью ТП03 (15 мг/кг) и ХГЧ (20 МЕ/крысу).

Обозначения: C0 – контроль, CT – контроль + ТП03, CG – контроль + ХГЧ, D0 – диабет, DT – диабет + ТП03, DG – диабет + ХГЧ, DM0 – диабет + метформин, DMT – диабет + метформин + ТП03, DMG – диабет + метформин + ХГЧ. Уровень тестостерона определяли ежедневно через три часа после введения препарата. Данные представлены как $M \pm SD$. $n = 6$.

Далее изучали влияние СД2, лечения метформином и обработки ТП03 и ХГЧ на показатели сперматогенеза. При СД2 доля подвижных СП, в том числе их функционально активных форм с поступательным прямолинейным движением, была ниже, чем в контроле, в то время как доля дефектных форм СП была повышена (рис. 2). Отмечалась тенденция к снижению общего количества эпидидимальных СП, хотя различия между группами К0 и Д0 не были статистически значимыми. Лечение метформином повышало общее число и подвижность СП, причем доля СП с поступательным движением повышалась не только в сравнении с группой Д0, но и с контролем (рис. 2). Обработка контрольных крыс с помощью ТП03 и ХГЧ повышала долю СП с поступательным движением, а в случае ХГЧ также общее число СП. Доля СП с поступательным движением, рассчитанное с учетом общего числа СП, в группах КТ и КГ повышалось в сравнении с контролем без обработки препаратами на 43 и 85% соответственно. У диабетических крыс ТП03 и ХГЧ также

Таблица 2. Значения AUC_{0-300} , интегрированной площади под кривой “концентрация тестостерона (нМ)—время обработки (мин)”, для уровня тестостерона в первый и пятый дни обработки, а также значения AUC_{0-5} , интегрированной площади под кривой “концентрация тестостерона (нМ)—время обработки (дни)”, для уровня тестостерона при пятидневной обработке с помощью ТП03 (15 мг/кг) и ХГЧ (20 МЕ/крысу) контрольных крыс и диабетических животных с лечением метформинном и без такового

Группа	Первый день, AUC_{0-300} (усл. ед.)	Пятый день, AUC_{0-300} (усл. ед.)	Пятидневная обработка, AUC_{0-5} (усл. ед.)
К0	58.0 ± 5.9	50.9 ± 5.7	52.2 ± 5.1
КТ	142.5 ± 12.4 ^c	155.8 ± 14.4 ^c	177.4 ± 8.4 ^c
КГ	325.8 ± 23.2 ^{c, d}	178.5 ± 14.7 ^c	242.9 ± 15.7 ^{c, d}
Д0	35.9 ± 3.3 ^a	30.5 ± 4.5 ^a	33.6 ± 4.1 ^a
ДТ	73.4 ± 8.5 ^c	107.8 ± 4.9 ^c	107.6 ± 7.7 ^c
ДГ	210.1 ± 13.7 ^{c, d}	151.4 ± 4.6 ^{c, d}	165.6 ± 8.2 ^{c, d}
ДМ0	50.6 ± 4.3 ^b	48.4 ± 5.7 ^b	47.8 ± 4.0 ^b
ДМТ	113.0 ± 7.0 ^{c, e}	112.6 ± 8.6 ^c	117.6 ± 8.5 ^c
ДМГ	269.2 ± 19.1 ^{c, d, e}	149.8 ± 14.9 ^c	188.3 ± 5.1 ^{c, d, e}

^a – различия между диабетическими группами (Д0, ДМ0) и контролем (К0); ^b – различия между группами Д0 и ДМ0; ^c – различия между группами без обработки (К0, Д0, ДМ0) и соответствующими группами с обработкой ТП03 (КТ, ДТ, ДМТ) или ХГЧ (КГ, ДГ, ДМГ); ^d – различия между группами КТ и КГ, ДТ и ДГ или ДМТ и ДМГ; ^e – различия между группами ДТ и ДМТ и между группами ДГ и ДМГ статистически значимы при $p < 0.05$. Данные представлены как $M \pm SD$. $n = 6$.

повышали долю подвижных СП, в том числе с поступательным движением (рис. 2). Отмечалась тенденция к повышению общего числа СП в группе ДГ, но различия с группой Д0 не были статистически значимыми. В группах ДМТ и ДМГ общее число и доля подвижных СП в сравнении с группой ДМ0 не менялись (рис. 2). Полученные данные указывают на повышение фертильности спермы при обработке контрольных и диабетических крыс ТП03 и ХГЧ и диабетических крыс метформинном, но также свидетельствуют об отсутствии усиления стимулирующего эффекта ЛГР-агонистов на сперматогенез у крыс, получавших метформиновую терапию.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В условиях длительного СД2 отмечается нарушение как стероидогенеза, так и сперматогенеза, что приводит к репродуктивным дисфункциям и бесплодию, как это продемонстрировано на грызунах с СД2 [8, 9, 26–28], так и у пациентов с этой патологией [2, 29]. Полученные нами данные при изучении самцов крыс с СД2, индуцированным высокожировой диетой и низкой дозой стрептозотоцина, также указывают на негативное влияние гипергликемии, нарушенной толерантности к глюкозе, инсулиновой резистентности на андрогенный статус, число и подвижность СП, морфологию семенных канальцев [9].

Изучение стероидогенного эффекта ХГЧ, структурного и функционального гомолога ЛГ, который является мощным стимулятором продукции тестостерона клетками Лейдига [6], показало, что у диабетических крыс в сравнении с контрольными животными этот эффект снижался (рис. 1, табл. 2), в то время как стимулирующее влияние гонадотропина на сперматогенез при СД2 не претерпевало существенных изменений (рис. 2). При этом на третий–пятый дни стероидогенный эффект гонадотропина ослабевал как у контрольных, так и у диабетических крыс и становился сопоставимым с таковым ТП03, который, в отличие от ХГЧ, стимулирует активность ЛГР посредством связывания с аллостерическим сайтом, располо-

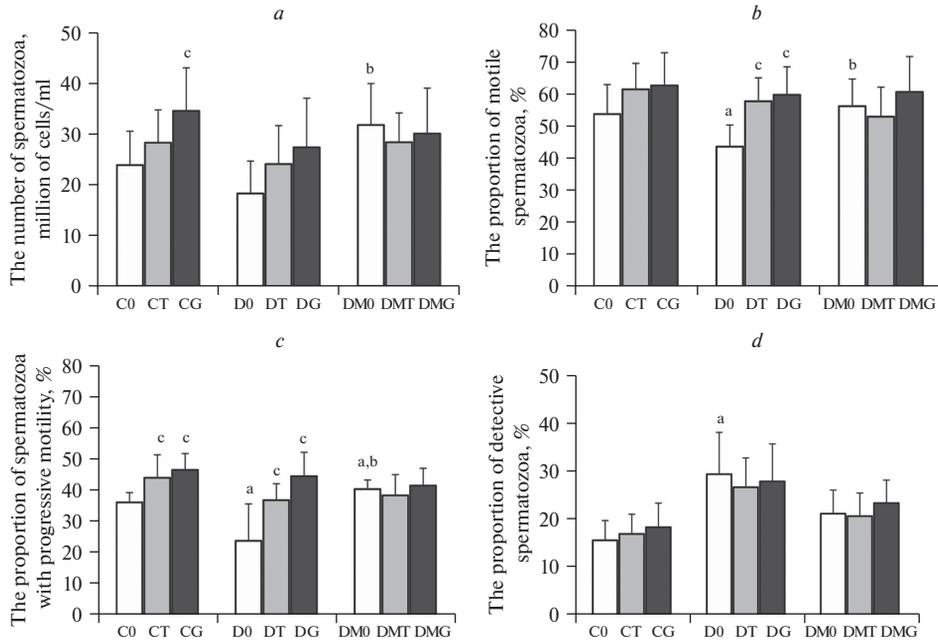


Рис. 2. Эффекты пятидневной обработки самцов крыс с СД2 с помощью ТП03 (15 мг/кг) и ХГЧ (20 МЕ/крысу) на количество сперматозоидов (а), долю подвижных сперматозоидов (б), долю сперматозоидов с поступательным прямолинейным движением (с) и долю сперматозоидов с морфологическими дефектами хвоста и головки (д), и влияние на этот эффект лечения метформинном. Обозначения: С0 – контроль, СТ – контроль + ТП03, СГ – контроль + ХГЧ, D0 – диабет, DT – диабет + ТП03, DG – диабет + ХГЧ, DM0 – диабет + метформин, DMT – диабет + метформин + ТП03, DMG – диабет + метформин + ХГЧ.

^a – различия между диабетическими группами (D0, DM0) и контролем (C0); ^b – различия между группами D0 и DM0; ^c – различия между группами без обработки (C, D, DM) и соответствующими группами с обработкой ТП03 (СТ, DT, DMT) или ХГЧ (СГ, DG, DMG) статистически значимы при $p < 0.05$. Данные представлены как $M \pm SD$. $n = 6$.

женным в трансмембранном домене рецептора [14, 16–18]. Важно отметить, что стероидогенный эффект ТП03, в отличие от ХГЧ, не ослабевал в ходе пятидневного введения, что может быть обусловлено как накоплением этого гидрофобного соединения в ткани семенников, так и особенностями его действия на ЛГР. Так, гонадотропины связываются с внеклеточным доменом ЛГР, который подвергается избыточному гликированию в условиях длительной гипергликемии и повреждению активными формами кислорода, в то время как аллостерический сайт, мишень ТП03, менее доступен для таких воздействий. Кроме того, будучи гидрофобным соединением, ТП03 способен связываться не только с расположенными в плазматической мембране ЛГР, но, проникая внутрь клетки, взаимодействовать с еще “незрелыми” формами рецептора [18, 30]. В случае СД2 это представляется особенно важным, так как сильно выраженные при диабетической патологии окислительный стресс, воспаление и стресс эндоплазматического ретикулама нарушают посттрансляционный процессинг ЛГР и их транслокацию в мембрану, что снижает число рецепторов на поверхности клеток-мишеней [9, 27].

Одним из наиболее широко и успешно используемых препаратов для лечения СД2 является метформин, который не только улучшает метаболические и гормо-

нальные показатели, но и частично восстанавливает репродуктивные функции [8, 19, 27, 31]. Предпринятое нами лечение диабетических самцов крыс метформином (4 нед., 120 мг/кг/сутки) не только нормализовало глюкозный гомеостаз, толерантность к глюкозе и уровень инсулина, но частично восстанавливало показатели стероидогенеза и сперматогенеза. Так, в группе ДМ0 отмечали повышение сниженного при СД2 уровня базового тестостерона (табл. 1), восстановление до контрольных значений числа эпидидимальных СП, доли их подвижных форм, в том числе с поступательным прямолинейным движением (рис. 2). Эти данные хорошо согласуются с данными, полученными ранее нами и другими авторами, о восстанавливающем эффекте метформиновой терапии на тестикулярную функцию у грызунов с различными моделями СД [8, 9, 19, 21, 22, 27, 31].

Поскольку при СД2 метформиновая терапия восстанавливает метаболические и гормональные показатели, а также улучшает функционирование гонадной оси, то нами была выдвинута гипотеза, что такая терапия будет усиливать стимулирующие эффекты ЛГР-агонистов на тестикулярный стероидогенез и сперматогенез. Эта гипотеза базировалась на выявленном нами ранее усиливающим эффекте метформиновой терапии на стероидогенные эффекты ХГЧ при однократном его введении диабетическим крысам [9].

Нами показано, что лечение диабетических крыс метформином усиливает стероидогенный эффект ТПО3 и ХГЧ в первый день обработки (рис. 1). Во второй день в группах ДМТ и ДМГ отмечалась тенденция к усилению эффектов ТПО3 и ХГЧ, но различия с группами ДТ и ДГ уже не были статистически значимыми. Однако в дальнейшем потенцирующее влияние метформиновой терапии на эффекты ЛГР-агонистов исчезало (рис. 1, 2). Тем самым, усиливая стимулирующие продукцию тестостерона эффекты различных по механизму действия агонистов ЛГР при их однократном введении, метформиновая терапия не влияет на эти эффекты при длительном введении препаратов. Довольно неожиданное угасание потенцирующего эффекта метформиновой терапии на стероидогенные эффекты ТПО3 и ХГЧ может быть обусловлено следующими причинами.

Метформин является стимулятором фермента АМФК, ключевого энергетического сенсора клетки, функциональная активность которого при диабетической патологии в большинстве тканей, включая семенники, снижается [32, 33]. Метформиновая терапия нормализует активность АМФК, что является одной из причин восстановления стероидогенеза в группе ДМ0 и потенцирования ответа тестикулярных клеток на однократное введение ТПО3 и ХГЧ в группах ДМТ и ДМГ (рис. 1, табл. 2). В то же время при длительном влиянии агонистов ЛГР на стероидогенез, в результате перманентной активации АМФК метформином, вероятно, запускаются механизмы, препятствующие потенцированию стероидогенного эффекта ТПО3 и ХГЧ. Это может быть обусловлено негативным влиянием метформин-активированной АМФК на экспрессию и активность белков стероидогенеза [34–37]. Так, в экспериментах с клетками гранулы цыплят-бройлеров показано, что повышение активности АМФК ассоциировано со снижением экспрессии генов, кодирующих транспортный белок StAR, цитохром CYP11A1 и дегидрогеназу HSD3B, результатом чего является снижение синтеза прогестерона [38]. В лютеинизированных клетках гранулы человека стимуляция АМФК агонистом адипонектина ингибирует цАМФ-зависимые каскады, снижая экспрессию ароматазы и продукцию эстрогенов [39]. В лютеальных клетках гиперактивация АМФК также подавляет стероидогенез, но не посредством подавления цАМФ-сигналинга и снижения экспрессии стероидогенных генов, а путем ингибирования гормоночувствительной липазы HSL [40]. Этот фермент гидролизует сложные эфиры холестерина, которые накапливаются в липидных каплях внутри клетки, и, тем самым, делает холестерин доступным для транспорта в митохондрии, где осуществляются

начальные стадии стероидогенеза. Необходимо отметить, что ЛГ подавляет активность АМФК в лютеальных клетках, предотвращая его негативное влияние на стероидогенез [41]. Постоянная стимуляция АМФК метформином в ходе четырехнедельной терапии, тем самым, может быть сдерживающим фактором, препятствующим потенцированию стероидогенного эффекта ХГЧ и ТПОЗ.

Метформиновая терапия, как показано нами в проведенном исследовании, наряду с улучшением тестикулярного стероидогенеза, нормализует сперматогенез, приближая оцениваемые параметры к их значениям в контроле, а в случае СП с поступательным прямолинейным движением их количество даже превышает таковое в контроле (рис. 2). Эти данные согласуются с результатами, полученными ранее нами и другими авторами, о восстановлении сперматогенной функции и морфологии семенных канальцев у грызунов с различными моделями СД при их лечении метформином [8, 9, 21, 27]. Ключевую роль здесь играет восстановление нарушенной при СД полярности клеток Сертоли и их плотных соединений, определяющих целостность гематотестикулярного барьера и нормальное протекание сперматогенеза [36, 42]. При этом на фоне нормализации процесса сперматогенеза метформином, дополнительная стимуляция сперматогенеза при обработке диабетических крыс ТПОЗ и ХГЧ в группах ДМТ и ДМГ не была выявлена (рис. 2). Вероятно, это обусловлено тем, что ресурс восстановления сперматогенеза в условиях метформинотерапии полностью исчерпан и его показатели не отличаются или даже превышают таковые в контроле (рис. 2).

Таким образом, лечение метформином самцов крыс с СД2, индуцированным высокожировой диетой и низкой дозой стрептозотоцина, улучшает у них тестикулярный стероидогенез и нормализует сперматогенез, нарушенные в условиях диабетической патологии. Впервые установлено, что лечение метформином усиливает стероидогенные эффекты ЛГР-агонистов, взаимодействующих как с аллостерическим (ТПОЗ), так и с ортостерическим (ХГЧ) сайтами рецептора, но только в первый день введения препаратов. В дальнейшем потенцирующий эффект метформинотерапии не выявляется, что может быть обусловлено негативным влиянием активируемых метформином АМФК-зависимых путей в клетках Лейдига на стероидогенные каскады. Как метформин, так и агонисты ЛГР восстанавливают сперматогенез, причем показатели сперматогенеза в группах с лечением метформином, ТПОЗ и ХГЧ в отдельности сопоставимы с таковыми при совместном применении метформина и ЛГР-агонистов. На основании полученных данных сделан вывод, что длительное комбинированное применение метформина и агонистов ЛГР при СД2 не приводит к усилению их восстанавливающего эффекта на андрогенный статус и фертильность, но способно повысить стероидогенный эффект гонадотропина и ТПОЗ при однократном их введении.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана Российским научным фондом (№ 19-75-20122). Исследования ЯМР соединения ТПОЗ проводились на оборудовании ресурсного центра СПбГУ “Методы магнитно-резонансных исследований”, масс-спектры высокого разрешения для этого соединения получали на оборудовании ресурсного центра СПбГУ “Методы анализа состава вещества”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Шпаков АО* (2010) Функциональное состояние гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы при сахарном диабете. Проблемы эндокринологии. 56: 23–29. [Shpakov AO (2010) The functional state of the hypothalamic-pituitary-gonadal system in diabetes mellitus. Probl Endokrinol (Mosk.) 56: 23–29. (In Russ)].
2. *Ding GL, Liu Y, Liu ME, Pan JX, Guo MX, Sheng JZ, Huang HF* (2015) The effects of diabetes on male fertility and epigenetic regulation during spermatogenesis. Asian J Androl 17: 948–953. <https://doi.org/0.4103/1008-682X.150844>
3. *Maresch CC, Stute DC, Alves MG, Oliveira PF, de Kretser DM, Linn T* (2018) Diabetes-induced hyperglycemia impairs male reproductive function: a systematic review. Hum Reprod Update 24(1): 86–105. 2018. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx033>
4. *Barkabi-Zanjani S, Ghorbanzadeh V, Aslani M, Ghalibafsbabghi A, Chodari L* (2020) Diabetes mellitus and the impairment of male reproductive function: Possible signaling pathways. Diabetes Metab Syndr 14: 1307–1314. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.07.031>
5. *Шпаков АО* (2018) Гонадотропины – от теории к клинической практике. СПб. ПОЛИТЕХ-пресс. ISBN 978-5-7422-6330-2. [Shpakov AO (2018) Gonadotropiny – ot teorii k klinicheskoy praktike. Sankt-Peterburg: POLITEKH-pess. ISBN 978-5-7422-6330-2. (In Russ)].
6. *Riccetti L, De Pascali F, Gilioli L, Poti F, Giva LB, Marino M, Tagliavini S, Trenti T, Fanelli F, Mezzullo M, Pagotto U, Simoni M, Casarini L* (2017) Human LH and hCG stimulate differently the early signalling pathways but result in equal testosterone synthesis in mouse Leydig cells in vitro. Reprod Biol Endocrinol 15: 2. <https://doi.org/10.1186/s12958-016-0224-3>
7. *Casarini L, Lispi M, Longobardi S, Milosa F, La Marca A, Tagliasacchi D, Pignatti E, Simoni M* (2012) LH and hCG action on the same receptor results in quantitatively and qualitatively different intracellular signaling. PLoS One 7:46682. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046682>
8. *Nna VU, Bakar ABA, Ahmad A, Mohamed M* (2019) Down-regulation of steroidogenesis-related genes and its accompanying fertility decline in streptozotocin-induced diabetic male rats: ameliorative effect of metformin. Andrology 7: 110–123. <https://doi.org/10.1111/andr.12567>
9. *Derkach KV, Bakhtyukov AA, Romanova IV, Zorina II, Bayunova LV, Bondareva VM, Morina IYu, Roy VK, Shpakov AO* (2020) The effect of metformin treatment on the basal and gonadotropin-stimulated steroidogenesis in male rats with type 2 diabetes mellitus. Andrologia 52: 13816. <https://doi.org/10.1111/and.13816>
10. *Shpakov AO, Dar'in DV, Derkach KV, Lobanov PS* (2014) The stimulating influence of thienopyrimidine compounds on the adenylyl cyclase systems in the rat testes. Dokl Biochem Biophys 456: 104–107. <https://doi.org/10.1134/S1607672914030065>
11. *Derkach KV, Dar'in DV, Bakhtyukov AA, Lobanov PS, Shpakov AO* (2016) In vitro and in vivo studies of functional activity of new low molecular weight agonists of the luteinizing hormone receptor. Biochemistry (Moscow) Suppl Ser A: Membrane and Cell Biology 10: 294–300. <https://doi.org/10.1134/S1990747816030132>
12. *Bakhtyukov AA, Derkach KV, Dar'in DV, Stepochkina AM, Shpakov AO* (2019) A low molecular weight agonist of the luteinizing hormone receptor stimulates adenylyl cyclase in the testicular membranes and steroidogenesis in the testes of rats with type 1 diabetes. Biochemistry (Moscow) Suppl Ser A: Membrane and Cell Biology 13: 301–309. <https://doi.org/10.1134/S1990747819040032>
13. *Bakhtyukov AA, Derkach KV, Dar'in DV, Shpakov AO* (2019) Conservation of Steroidogenic Effect of the Low-Molecular-Weight Agonist of Luteinizing Hormone Receptor in the Course of Its Long-Term Administration to Male Rats. Dokl Biochem Biophys 484: 78–81. <https://doi.org/10.1134/S1607672919010216>
14. *Bakhtyukov AA, Derkach KV, Gureev MA, Dar'in DV, Sorokoumov VN, Romanova IV, Morina IYu, Stepochkina AM, Shpakov AO* (2020) Comparative study of the steroidogenic effect of human chorionic gonadotropin and thieno[2,3-d]pyrimidine-based allosteric agonist of luteinizing hor-

- mone receptor in young adult, aging and diabetic male rats. *Int J Mol Sci* 21: 7493.
<https://doi.org/10.3390/ijms21207493>
15. *van Straten NC, Schoonus-Gerritsma GG, van Someren RG, Draaijer J, Adang AE, Timmers CM, Hanssen RG, van Boeckel CA* (2002) The first orally active low molecular weight agonists for the LH receptor: Thienopyr(im)idines with therapeutic potential for ovulation induction. *ChemBiochem* 3: 1023–1026.
[https://doi.org/10.1002/1439-7633\(20021004\)3:10<1023::AID-CBIC1023>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1439-7633(20021004)3:10<1023::AID-CBIC1023>3.0.CO;2-9)
 16. *van Koppen CJ, Zaman GJ, Timmers CM, Kelder J, Mosselman S, van de Lagemaat R, Smit MJ, Hanssen RG* (2008) A signaling-selective, nanomolar potent allosteric low molecular weight agonist for the human luteinizing hormone receptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 378: 503–514.
<https://doi.org/10.1007/s00210-008-0318-3>
 17. *van de Lagemaat R, Raafs BC, van Koppen C, Timmers CM, Mulders SM, Hanssen RG* (2011) Prevention of the onset of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) in the rat after ovulation induction with a low molecular weight agonist of the LH receptor compared with hCG and rec-LH. *Endocrinology* 152: 4350–4357.
<https://doi.org/10.1210/en.2011-1077>
 18. *Nataraja SG, Yu HN, Palmer SS* (2015) Discovery and development of small molecule allosteric modulators of glycoprotein hormone receptors. *Front Endocrinol (Lausanne)* 6 :142.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00142>
 19. *Shpakov AO* (2021) Improvement effect of metformin on female and male reproduction in endocrine pathologies and its mechanisms. *Pharmaceuticals (Basel)* 14: 42.
<https://doi.org/10.3390/ph14010042>
 20. *Tseng CH* (2021) The Effect of Metformin on Male Reproductive Function and Prostate: An Updated Review. *World J Mens Health* Epub ahead of print.
<https://doi.org/10.5534/wjmh.210001>
 21. *Annie L, Jeremy M, Gurusubramanian G, Derkach KV, Shpakov AO, Roy VK* (2020) Effect of metformin on testicular expression and localization of leptin receptor and levels of leptin in the diabetic mice. *Mol Reprod Dev* 87: 620–629.
<https://doi.org/10.1002/mrd.23342>
 22. *Derkach KV, Bakhtuykov AA, Bayunova LV, Zorina II, Shpakov AO* (2020) Normalization of testicular steroidogenesis and spermatogenesis in male rats with type 2 diabetes mellitus under the conditions of metformin therapy. *Dokl Biol Sci* 493: 110–113.
<https://doi.org/10.1134/S0012496620040031>
 23. *Derkach KV, Bondareva VM, Chistyakova OV, Berstein LM, Shpakov AO* (2015) The effect of long-term intranasal serotonin treatment on metabolic parameters and hormonal signaling in rats with high-fat diet/low-dose streptozotocin-induced type 2 diabetes. *Int J Endocrinol* 2015: 245459.
<https://doi.org/10.1155/2015/245459>
 24. *Derkach KV, Bakhtuykov AA, Roy V, Gryaznov AY, Bayunova LV, Shpakov AO* (2020) The testicular leptin system in rats with different severity of type 2 diabetes mellitus. *J Evol Biochem Physiol* 56: 22–30.
<https://doi.org/10.1134/S0022093020010032>
 25. *Narayana K, D'Souza UJ, Seetharama RK* (2002) Ribavirin-induced sperm shape abnormalities in Wistar rat. *Mutat Res* 513: 193–196.
[https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(01\)00308-4](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(01)00308-4)
 26. *Liu GL, Zhang YM, Dai DZ, Ding MJ, Cong XD, Dai Y* (2013) Male hypogonadism induced by high fat diet and low dose streptozotocin is mediated by activated endoplasmic reticulum stress and IκBβ and attenuated by argirein and valsartan. *Eur J Pharmacol* 713: 78–88.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.04.030>
 27. *Nna VU, Bakar ABA, Ahmad A, Mohamed M* (2020) Diabetes-induced testicular oxidative stress, inflammation, and caspase-dependent apoptosis: the protective role of metformin. *Arch Physiol Biochem* 126: 1–12.
<https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1543329>
 28. *Khorasani V, Jeddi S, Yaghmaei P, Tohidi M, Ghasemi A* (2019) Effect of long-term sodium nitrate administration on diabetes-induced anemia and glucose homeostasis in obese type 2 diabetic male rats. *Nitric Oxide* 86: 21–30.
<https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.02.003>
 29. *Jangir RN, Jain C* (2014) Diabetes mellitus induced impairment of male reproductive functions: a review. *Curr Diabetes Rev* 10: 147–157.
<https://doi.org/10.2174/1573399810666140606111745>
 30. *Newton CL, Whay AM, McArdle CA, Zhang M, van Koppen CJ, van de Lagemaat R, Segaloff DL, Millar RP* (2011) Rescue of expression and signaling of human luteinizing hormone G protein-coupled receptor mutants with an allosterically binding small-molecule agonist. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 7172–7176.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1015723108>

31. Yan WJ, Mu Y, Yu N, Yi TL, Zhang Y, Pang XL, Cheng D, Yang J (2015) Protective effects of metformin on reproductive function in obese male rats induced by high-fat diet. *J Assist Reprod Genet* 32: 1097–1104.
<https://doi.org/10.1007/s10815-015-0506-2>
32. Jiang X, Chen J, Zhang C, Zhang Z, Tan Y, Feng W, Skibba M, Xin Y, Cai L (2015) The protective effect of FGF21 on diabetes-induced male germ cell apoptosis is associated with up-regulated testicular AKT and AMPK/Sirt1/PGC-1 α signaling. *Endocrinology* 156: 1156–1170.
<https://doi.org/10.1210/en.2014-1619>
33. Guo Z, Yan X, Wang L, Wu J, Jing X, Liu J (2016) Effect of Telmisartan or Insulin on the Expression of Adiponectin and its Receptors in the Testis of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Horm Metab Res* 48: 404–412.
<https://doi.org/10.1055/s-0042-101549>
34. Tosca L, Chabrolle C, Uzbekova S, Dupont J (2007) Effects of metformin on bovine granulosa cells steroidogenesis: possible involvement of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (AMPK). *Biol Reprod* 76: 368–378.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.055749>
35. Bertoldo MJ, Faure M, Dupont J, Froment P (2015) AMPK: a master energy regulator for gonadal function. *Front Neurosci* 9: 235.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00235>
36. Yang W, Wang L, Wang F, Yuan S (2020) Roles of AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) in Mammalian Reproduction. *Front Cell Dev Biol* 8: 593005.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.593005>
37. Estienne A, Bongrani A, Ramé C, Kurowska P, Błaszczyk K, Rak A, Ducluzeau PH, Froment P, Dupont J (2021) Energy sensors and reproductive hypothalamo-pituitary ovarian axis (HPO) in female mammals: Role of mTOR (mammalian target of rapamycin), AMPK (AMP-activated protein kinase) and SIRT1 (Sirtuin 1). *Mol Cell Endocrinol* 521: 111113.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.111113>
38. Weaver EA, Ramachandran R (2020) Metformin attenuates steroidogenesis in ovarian follicles of the broiler breeder hen. *Reproduction* 160: 659–672.
<https://doi.org/10.1530/REP-20-0066>
39. Grandhaye J, Hmadeh S, Plotton I, Lévasseur F, Estienne A, LeGuevel R, Levern Y, Ramé C, Jeanpierre E, Guerif F, Dupont J, Froment P (2021) The adiponectin agonist, AdipoRon, inhibits steroidogenesis and cell proliferation in human luteinized granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 520: 111080.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.111080>
40. Przygodzka E, Hou X, Zhang P, Plewes MR, Franco R, Davis JS (2021) PKA and AMPK Signaling Pathways Differentially Regulate Luteal Steroidogenesis. *Endocrinology* 162:bqab015.
<https://doi.org/10.1210/endo/bqab015>
41. Hou X, Arvais EW, Davis JS (2010) Luteinizing hormone stimulates mammalian target of rapamycin signaling in bovine luteal cells via pathways independent of AKT and mitogen-activated protein kinase: modulation of glycogen synthase kinase 3 and AMP-activated protein kinase. *Endocrinology* 151: 2846–2857.
<https://doi.org/10.1210/en.2009-1032>
42. Ye J, Luo D, Xu X, Sun M, Su X, Tian Z, Guan Q (2019) Metformin Improves Fertility in Obese Males by Alleviating Oxidative Stress-Induced Blood-Testis Barrier Damage. *Oxid Med Cell Longev* 2019: 9151067.
<https://doi.org/10.1155/2019/9151067>

The Effect of Metformin Therapy on Luteinizing Hormone Receptor Agonists-Induced Stimulation of Testosterone Production and Spermatogenesis in Diabetic Rats

A. A. Bakhtyukov^a, K. V. Derkach^a, A. M. Stepochkina^a, V. N. Sorokoumov^{a, b},
L. V. Bayunova^a, I. A. Lebedev, and A. O. Shpakov^{a, *}

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

^b *Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

*e-mail: alex_shpakov@list.ru

The restoration of the functions of the male reproductive system in type 2 diabetes mellitus (DM2) is one of the urgent problems of modern endocrinology. For this, both the drugs that improve glucose homeostasis and insulin sensitivity, primarily metformin, and the activators of luteinizing hormone receptor (LHR), such as human chorionic go-

nadotropin (hCG) and low-molecular-weight allosteric agonists of LHR, can be used. The aim of the work was to study the effect of metformin therapy (4 weeks, 120 mg/kg/day) on the stimulating steroidogenesis and spermatogenesis effects induced by 5-day administration of 5-amino-*N*-tert-butyl-2-(methylsulfanyl)-4-(3-(nicotinamido)phenyl)thieno[2,3-*d*]pyrimidine-6-carboxamide (TP03), an allosteric LHR agonist (15 mg/kg/day), and hCG (20 IU/rat/day) to male Wistar rats with DM2. The DM2 was induced by a high-fat diet and a low-dose streptozotocin (25 mg/kg). Metformin treatment partially restored testosterone levels and normalized spermatogenesis in DM2 rats. On the first day, metformin treatment enhanced the steroidogenic effects of TP03 and hCG, but on the following days its potentiating effect was not detected. After five days of treatment of diabetic rats with TP03 and hCG, the number of epididymal spermatozoa was restored, including those with progressive motility, and the proportion of the defective forms of spermatozoa was decreased. Spermatogenesis rates when treated with metformin or LHR agonists separately were comparable to those when they were used together. Thus, metformin therapy enhances the production of testosterone induced by TP03 and hCG on the first day of treatment with these drugs, but subsequently the steroidogenic and spermatogenic effects of LHR agonists in the groups of diabetic rats with and without metformin treatment did not differ significantly.

Keywords: steroidogenesis, spermatogenesis, type 2 diabetes mellitus, metformin, chorionic gonadotropin, thienopyrimidine, testosterone

АНАЛИЗ НЕКОТОРЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ
ПОКАЗАТЕЛЕЙ У БОЛЬНЫХ ПНЕВМОНИЕЙ COVID-19
МАТЕМАТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

© 2021 г. М. С. Громов¹, С. М. Рогачева^{1, *}, М. А. Барулина^{1, 2}, А. А. Решетников³,
Д. А. Прохожев¹, А. Ю. Фомина¹

¹Саратовский медицинский университет “Реавиз”, Саратов, Россия

²Институт проблем точной механики и управления РАН, Саратов, Россия

³ГУЗ Саратовская городская клиническая больница № 2 им. В.И. Разумовского, Саратов, Россия

*E-mail: smro13@yandex.ru

Поступила в редакцию 03.08.2021 г.

После доработки 15.09.2021 г.

Принята к публикации 15.09.2021 г.

Целью работы было провести ретроспективный анализ данных больных пневмонией, вызванной вирусом SARS-CoV-2, математическими методами определить значимость некоторых физиологических и биохимических показателей в качестве маркеров неблагоприятного исхода болезни. Случайная выборка пациентов с пневмонией COVID-19 составила 209 человек. Для математического анализа использовали физиологические показатели пациентов, описанные при госпитализации, а также показатели коагуляции крови и развития воспалительной реакции. Анализируемые показатели были распределены на категории относительно интервала референсных значений физиологической нормы. Корреляционный анализ проводили по категориальным данным относительно исхода заболевания. Алгоритмы расчета статистических характеристик и визуализация результатов были реализованы на языке Python. Достоверность отличий признаков при сравнении выборок пациентов оценивали по критерию согласия χ^2 с поправкой Йетса. В исследовании показано, что возраст старше 50 лет и мужской пол можно считать факторами риска для пациентов с пневмонией COVID-19 ($p < 0.05$). Отмечено значимое влияние на исход болезни сердечно-сосудистых патологий ($p < 0.01$), в меньшей степени – диабета ($p < 0.10$). Выявлены максимальные коэффициенты корреляции уровня сатурации (-0.43) и частоты дыхания (0.43) с летальным исходом. Для пациентов старше 50 лет уровень сатурации при госпитализации ниже 80% стал маркером летальности. Показано, что повышение концентрации D-димера более 625 нг/мл у пациентов старше 80 лет ассоциировано с летальным исходом. Корреляции уровня С-реактивного белка (CRP) с исходом болезни не обнаружено. Проанализировано влияние кортикостероидов на исход болезни пациентов с различным содержанием CRP. Отмечено, что при использовании кортикостероидов уровень летальности пациентов с $CRP \leq 12.5$ мг/л в 2.7 раз выше, чем пациентов с $CRP > 12.5$ мг/л ($p < 0.01$). Таким образом, применение адекватных математических методов позволило уточнить некоторые физиологические и биохимические показатели больных COVID-19, ассоциированные с летальным исходом.

Ключевые слова: COVID-19, пневмония, физиологические и биохимические показатели, ретроспективные данные, математический анализ

DOI: 10.31857/S0869813921110030

SARS-CoV-2 – новый высокопатогенный β -коронавирус, вызывающий заболевание COVID-19 у человека, впервые был обнаружен в Китае в декабре 2019 г., быстро распространился по миру, вызвав пандемию.

Во всем мире проводятся активные исследования нового вируса и заболеваний, которое он вызывает. Известно, что вирион SARS-CoV-2 состоит из двух основных компонентов: 1) геномной РНК и белкового капсида, упакованных в нуклеокапсид; 2) фосфолипидного бислоя, который окружает нуклеокапсид. Фосфолипидный бислой включает спайк-белок (тример гликопротеина), фермент гемагглютинин-эстеразу и несколько структурных белков (Spike, Envelope и Membrane) [1].

Вирион взаимодействует с рецептором – ангиотензинпревращающим ферментом II типа (ACE2), его связыванию с ACE2 способствует клеточная трансмембранная сериновая протеаза типа 2 (TMPRSS), которая активирует S-белок вируса. ACE2 и TMPRSS представлены на поверхности различных клеток органов дыхания, пищевода, кишечника, сердца, надпочечников, мочевого пузыря, гипоталамуса и гипофиза, эндотелия и макрофагов [2, 3]. Это приводит к разнообразным клиническим проявлениям заболевания [4].

Преимущественно инфекция передается воздушно-капельным путем, реже – контактным. Инкубационный период составляет 1–14 дней с пиком в 3–7 дней; в латентный период вирус становится очень заразным. У пациентов проявляются симптомы гриппа, боли в горле, лихорадка, кашель, утомляемость и одышка; в некоторых случаях у пациентов развиваются желудочно-кишечные проблемы, такие как диарея и рвота [5, 6]. При инфицировании альвеолярных эпителиальных клеток у пациентов возникает пневмония (15% случаев), в тяжелых случаях (5% случаев) развивается острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) и полиорганная недостаточность [1, 4].

Возникновение ОРДС обусловлено агрессивной воспалительной реакцией иммунной системы человека, которая развивается в ответ на высвобождение вирусных частиц после их репродукции в инфицированных клетках. Эта реакция заключается в образовании чрезмерного количества цитокинов, что приводит к развитию процесса, называемого цитокиновым штормом [7]. Повышенные уровни цитокинов способствуют притоку иммунных клеток, таких как макрофаги, нейтрофилы и Т-клетки, из кровотока к месту инфекции; этот процесс оказывает деструктивное воздействие на ткани человека, вызывает повреждение легких и тяжелый ОРДС, который проявляется в низком уровне насыщения кислородом и является важной причиной смертности пациентов с COVID-19 [6, 7]. Показателем наличия острой фазы воспалительного ответа является повышенный уровень С-реактивного белка в крови пациентов [4].

Известно, что у больных COVID-19 выявляются нарушения свертывающей и фибринолитической систем крови. Отмечено повышение уровня D-димера, уменьшение протромбинового времени и активированного частичного тромбопластинового времени у пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением COVID-19, у больных с неблагоприятным исходом [8, 9]. Поскольку эти изменения гемостаза соответствуют диссеминированному внутрисосудистому свертыванию крови, считают, что COVID-19 ассоциируется с венозным или артериальным тромбозом [10].

Пожилые люди и люди с сопутствующими заболеваниями, такими как диабет, гипертония, легочные заболевания, астма, бронхит и сердечно-сосудистые заболевания, склонны к развитию ОРДС и тромбозов, именно они становятся основными “заложенниками” вируса SARS-CoV-2 [6].

Пандемия COVID-19 продолжается, и большое количество пациентов попадают в больницы с серьезным поражением легких, поэтому актуальным является обнаружение и уточнение физиологических признаков заболевания, на которые необходимо обращать особое внимание при лечении пациентов, чтобы не допустить его

тяжелого развития и летального исхода. Насколько те или иные физиологические и биохимические показатели являются значимыми при прогнозе заболевания, при выборе стратегии лечения и ухода, позволяют определить математические методы анализа.

Нужно отметить, что в последнее время появилось большое количество работ, в которых авторы предлагают прогностические модели риска смерти и прогрессирования COVID-19 до тяжелого заболевания. В обзоре [11] проанализировано 107 таких моделей, из которых авторы выделили только одну модель оценки смертности 4C (Coronavirus Clinical Characterisation Consortium) как многообещающую [12]. Для всех остальных моделей был определен высокий риск систематической ошибки, в основном из-за нерепрезентативного отбора контрольных пациентов, исключения пациентов и нечеткой отчетности [11]. Авторы считают, что на данном этапе невозможно рекомендовать какие-либо модели для использования на практике, а дальнейшие исследования должны быть сосредоточены на проверке, сравнении, улучшении и обновлении лучших образцов, уточнении предикторов тяжести заболевания.

Целью работы явилось: провести ретроспективный анализ данных больных пневмонией, вызванной вирусом SARS-CoV-2, математическими методами определить значимость некоторых физиологических и биохимических показателей в качестве маркеров неблагоприятного исхода болезни.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использованы зашифрованные эпикризы пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19 и пневмонией, предоставленные ГУЗ Саратовская городская клиническая больница № 2 им. В.И. Разумовского. Пациенты были госпитализированы в период с 1 сентября по 1 декабря 2020 г. и получали лечение в соответствии с временными рекомендациями Минздрава РФ, включающее этиотропную, антикоагулянтную, иммуносупрессивную и симптоматическую терапию. Для анализа была использована случайная выборка пациентов – 209 человек.

По возрасту пациентов распределили на 5 возрастных категорий: 1 – $18 < 35$ лет; 2 – $35 < 50$ лет; 3 – $50 < 65$ лет; 4 – $65 < 80$ лет; 5 – ≥ 80 лет. При анализе учитывали также пол пациентов и наличие сопутствующего заболевания: диабета, сердечно-сосудистой (СС) патологии, онкологического заболевания. По признаку “пол” женщин отнесли к категории 1, мужчин – к категории 0. По признакам “СС-заболевание”, “диабет” и “онкология” пациентов с заболеванием отнесли к категории 1, без заболевания – к категории 0.

Для сравнительного математического анализа использовали физиологические и биохимические показатели пациентов, приведенные в эпикризах, значения которых сравнивали с референсными значениями физиологической нормы (табл. 1).

Анализируемые показатели были распределены на категории относительно интервала референсных значений. Результаты, соответствующие интервалу нормы, принимали за 0, отклонение от максимального значения нормы на 10, 20, 30% и т.д. в большую сторону записывали как 10, 20, 30..., отклонения от минимального значения нормы в меньшую сторону записывали как -10, -20, -30 и т.д.

Корреляционные диаграммы строили по категориальным данным относительно исхода заболевания: в интервале от 0 до 1 вероятность летального исхода растет с увеличением категории показателя; в интервале от 0 до -1 вероятность летального исхода растет с уменьшением категории показателя. Алгоритмы расчета статистических характеристик были реализованы на язык Python при использовании библиотек для математического и статистического анализа numpy, pandas (<https://numpy.org/>, <https://pandas.pydata.org/pandas-docs/stable/>). Визуализация по-

Таблица 1. Некоторые физиологические и биохимические показатели, определяемые во время лечения пациентов с COVID-19, и их референсные значения

№	Показатели	Обозначение	Референсные значения
1	Уровень сатурации, %	Sat	>94
2	Частота сердечных сокращений, мин ⁻¹	Heart_rate	60–80
3	Частота дыхания, мин ⁻¹	Breath_rate	16–20
4	Артериальное давление систолическое, мм рт. ст.	Sistolic_BP	120–130
5	Артериальное давление диастолическое мм рт. ст.	Diastolic_BP	75–80
6	Температура тела, °С	Temp	36.6
7	Индекс массы тела, кг/м ²	BM_index	18–25
Показатель развития процесса воспаления			
8	С-реактивный белок, мг/л	CRP	0–5
Показатели коагуляции крови			
9	Активированное частичное тромбопластиновое время, с	АРТТ	22.5–35.5
10	Протромбиновый индекс, %	PI	73–122
11	Фибриноген, г/л	Fibrinogen	2–4
12	Протромбиновое время, с	PT	11–15
13	D-димер, нг/мл	D-dimer	до 250

лученных результатов была реализована также на языке Python с использованием библиотек seaborn и matplotlib (<http://seaborn.pydata.org/>, <https://matplotlib.org/>). Целевой переменной при анализе данных служил исход заболевания: выписан, умер.

Достоверность отличий признаков при сравнении выборок пациентов оценивали по критерию согласия χ^2 с поправкой Йетса, которая вводится для уменьшения числа искажений в случаях с малыми выборками [13]. В отдельных случаях достоверность результатов оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа с использованием F-критерия Фишера. При уровне вероятности $p > 0.10$ различие выборок считали недостоверным [14].

Исследования проведены в соответствии с международными и российскими этическими принципами и нормами, одобрены комитетом по этике Медицинского университета “Реавиз”.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Первоначально была построена диаграмма корреляции физиологических признаков пациентов (209 человек) с неблагоприятным исходом болезни (рис. 1). Из диаграммы видно, что неблагоприятный исход болезни в наибольшей степени зависит от уровня сатурации (Sat) (коэффициент корреляции (K_c) = -0.43) и частоты дыхания (Breath_rate) (K_c = 0.39). Эти параметры взаимосвязаны: увеличение частоты дыхания у больных COVID-19, как правило, связано с уменьшением уровня сатурации.

В меньшей степени неблагоприятный исход ассоциирован с возрастом пациента (K_c = 0.25): чем выше возрастная категория, тем выше вероятность летального исхода; наличием сердечно-сосудистого (СС) заболевания (K_c = 0.20), наличием диабета (K_c = 0.16), снижением артериального диастолического давления (Dia-

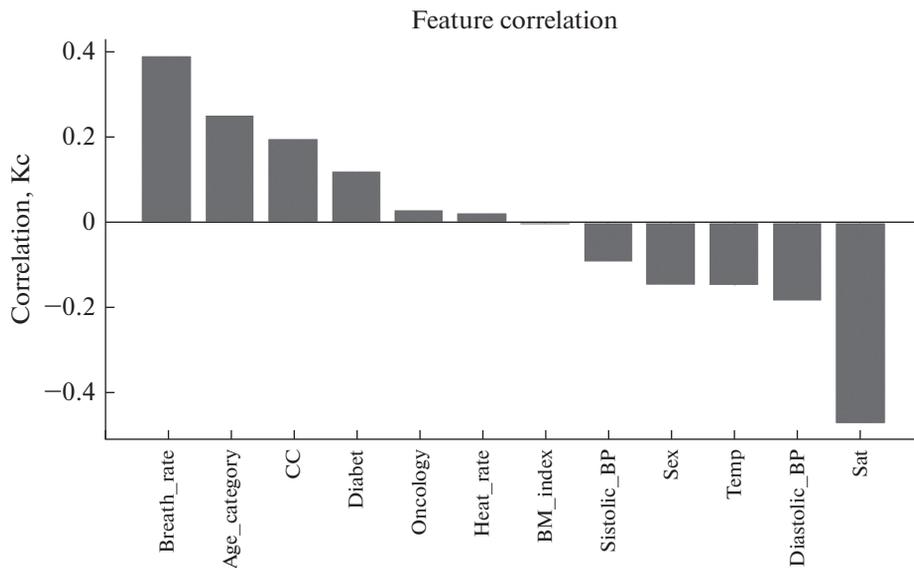


Рис. 1. Диаграмма корреляций физиологических признаков пациентов с исходом болезни.

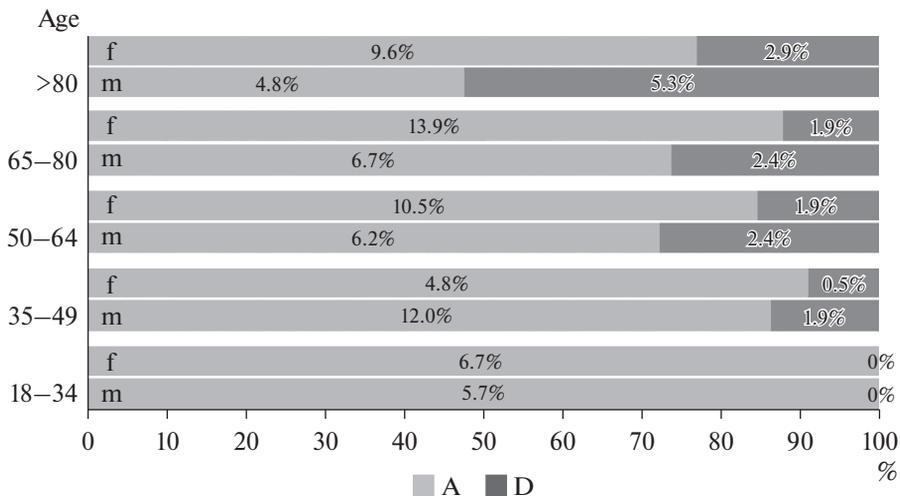


Рис. 2. Распределение пациентов по полу (m – мужчины, f – женщины), возрасту и исходу болезни (A – жив, D – умер). По горизонтальной оси определяется процент летальных исходов в каждой категории больных. На диаграмме приведены проценты благоприятных и летальных исходов из расчета всей выборки пациентов (209 человек).

stolic_BP) ($K_c = -0.19$). В центре диаграммы расположены показатели, в наименьшей степени коррелирующие с исходом болезни, например, частота сердечных сокращений (Heart_rate) и индекс массы тела (BM_index). Таким образом, корреляционная матрица позволяет нам сравнить влияние показателей на исход болезни и выявить наиболее значимые.

Таблица 2. Оценка влияния сопутствующего заболевания на исход болезни

Категория сопутствующего заболевания		Количество пациентов		Значимость влияния сопутствующего заболевания на исход	
		выписано	умерло	χ^2	p
СС	Есть	104	34	6.93	0.008
	Нет	65	6		
Диабет	Есть	30	12	3.02	0.082
	Нет	139	28		
Онкология	Есть	17	5	0.027	0.868
	Нет	152	35		

На рис. 2 приведено распределение пациентов исследуемой выборки (209 человек) по полу, возрасту с указанием исхода болезни. Женщин среди больных было больше – 110 человек, мужчин – 99 человек. Из диаграммы видно, что более 47% пациентов было старше 65 лет. Степень летальности рассчитывали по всей выборке (209 человек). В 1-ой возрастной группе не зафиксировано летальных исходов. С увеличением возраста увеличивался процент летальности, в каждой возрастной группе процент летальных исходов у мужчин был выше. В целом умерли 19.2% пациентов (40 человек), из них – мужчин 12.0%, женщин – 7.2%. Наибольшая летальность зафиксирована среди мужчин старше 80 лет – 52.4% от количества пациентов данной категории.

Большинство госпитализированных пациентов имели сопутствующее заболевание (табл. 2): СС заболевания – 66%, диабет – 20%, и онкологические – 11%. Из табл. 2 видно, что значимое влияние на исход болезни оказывает СС патология ($p < 0.01$), в меньшей степени – диабет ($p < 0.1$).

Рассмотрено влияние ожирения на исход COVID-19. В использованной выборке пациентов (209 человек) 73% имели повышенный индекс массы тела (ИМТ). Получено распределение выздоровевших и умерших пациентов в зависимости от отклонения этого показателя от нормы (рис. 3), которое не позволяет говорить о значимом влиянии степени ожирения на исход болезни.

Разделив пациентов на две группы: с ИМТ в пределах физиологической нормы (всего 56 человек, умерли 11) и повышенным (всего 153 человек, умерли 29), мы провели статистическую оценку влияния избыточной массы тела на неблагоприятный исход болезни. Значимого влияния отклонения ИМТ от нормы на летальность обнаружено не было ($\chi^2(1, n = 209) = 0.0126, p = 0.911$).

Исследовано влияние уровня сатурации на исход болезни. Результаты математического анализа представлены в виде Violin (скрипичной) диаграммы (рис. 4). Эта статистическая диаграмма используется для визуализации распределения данных и их плотности вероятности. Каждая “скрипка” представляет группу переменных значений одной категории данных. Колоколообразная форма распределения означает нормальное распределение.

Из рис. 4 и табл. 3 видно, что у большинства выздоровевших пациентов уровень сатурации при госпитализации был выше 85%, среднее значение находилось в пределах 91.3–95.2%, медианное значение – 93–97%. Видно, что с увеличением возраста снижается среднее значение уровня сатурации выписанных пациентов.

Кривая распределения показателя сатурации у умерших из 2-ой возрастной группы не отличается от таковой у выздоровевших пациентов (рис. 4), средние зна-

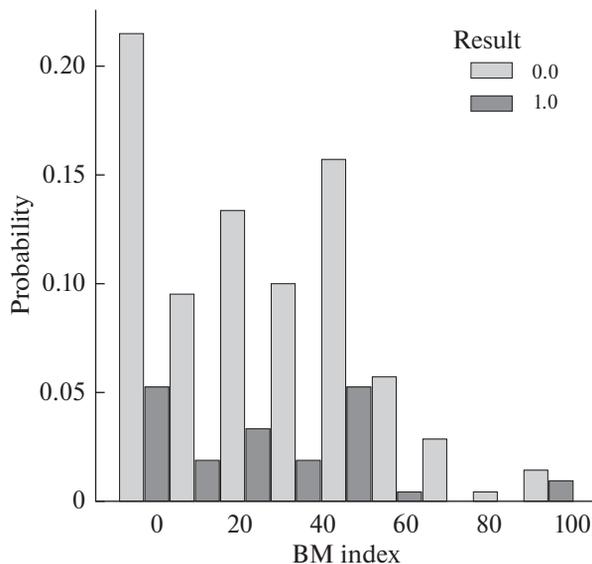


Рис. 3. Вероятность благоприятного (0) и летального (1) исходов болезни пациентов в зависимости от отклонения их индекса массы тела (BM_index) от нормы, %.

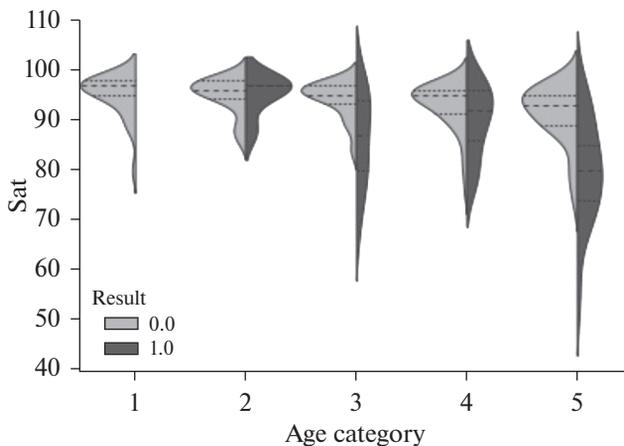


Рис. 4. Скрипичная диаграмма, отражающая зависимость исхода болезни (0 – выписан, 1 – умер) от уровня сатурации (Sat) и категории возраста пациентов: 1 – 18 < 35 лет; 2 – 35 < 50 лет; 3 – 50 < 65 лет; 4 – 65 < 80 лет; 5 – ≥ 80 лет.

чения уровня сатурации у этих групп совпадают (табл. 3). Видимо, состояние этих пациентов резко ухудшилось уже после госпитализации.

На скрипичной диаграмме наблюдается значительный разброс показателей сатурации умерших пациентов из трех старших групп. Средний уровень сатурации у них находился в пределах 86.2–79.9%, с возрастом понижался. Отмечено, что для пациентов старше 50 лет сатурация меньше 80% стала маркером летальности ($p < 0.01$).

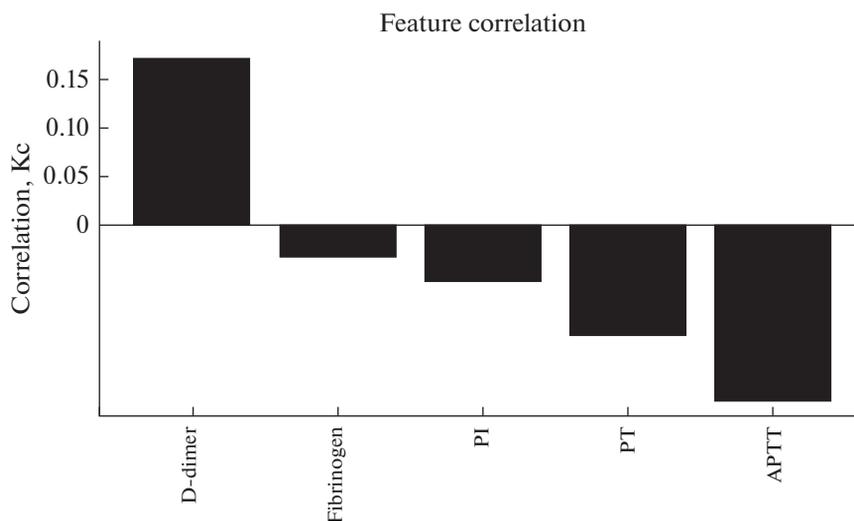


Рис. 5. Диаграмма корреляций показателей свертывающей системы крови пациентов с исходом болезни.

Исследовали корреляцию показателей свертывающей системы крови пациентов с исходом болезни (рис. 5), выборка составила 79 пациентов. Из диаграммы следует, что неблагоприятный исход болезни в значительной степени ассоциирован с увеличением концентрации D-димера ($K_c = 0.17$) и уменьшением АЧТВ (АРТТ) ($K_c = -0.17$).

Более подробно рассмотрено влияние концентрации D-димера в крови пациентов различных возрастных групп на исход болезни. Выборка составила 79 пациентов (39 летальных исходов). На рис. 6 в виде диаграммы рассеяния представлена зависимость исхода болезни от содержания D-димера и возраста пациентов. На диаграмме видно, что значительное увеличение уровня D-димера обнаружено в основном у пациентов старше 80 лет, и в большинстве случаев эти пациенты умерли, для пациентов данной возрастной категории повышение концентрации D-димера на 150% стало маркером летальности. У пациентов других возрастных категорий редко фиксировали повышение содержания D-димера более чем в 2 раза, летальных исходов среди них не было.

Таблица 3. Оценка влияния уровня сатурации (Sat), определяемого у больных разного возраста при госпитализации, на исход болезни

Категория возраста	Благоприятный исход болезни			Летальный исход болезни			p
	кол-во пациент.	среднее значение Sat $\pm S$, %	медиана Sat	кол-во пациент.	среднее значение Sat $\pm S$, %	медиана Sat	
18 < 35 лет	26	95.2 \pm 4.2	97.0	0	—	—	—
35 < 50 лет	35	95.0 \pm 3.7	96.0	5	95.2 \pm 4.0	97.0	0.812
50 < 65 лет	35	94.3 \pm 3.7	95.0	9	86.2 \pm 9.3	87.0	0.001
65 < 80 лет	43	93.0 \pm 4.9	95.0	9	89.8 \pm 7.1	92.0	0.026
≥ 80 лет	30	91.3 \pm 6.0	93.0	17	79.9 \pm 10.5	80.0	0.0003

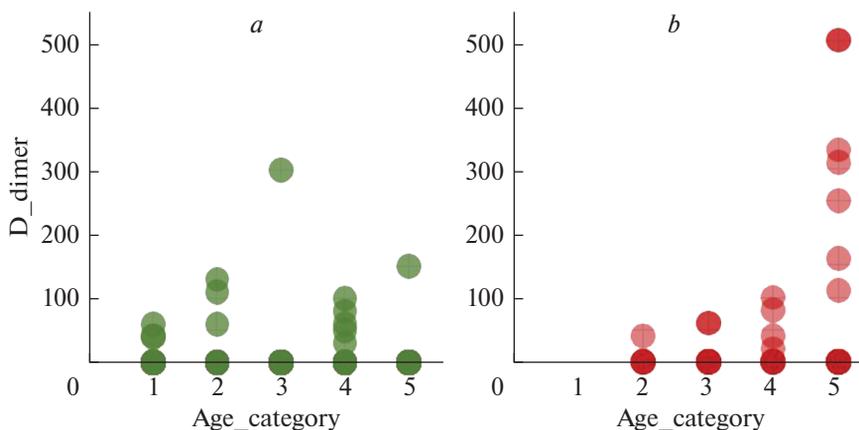


Рис. 6. Зависимость исхода болезни (а) – выписан, (б) – умер от превышения уровня D-димера в крови относительно нормы и от возраста пациентов: 1 – 18 < 35 лет; 2 – 35 < 50 лет; 3 – 50 < 65 лет; 4 – 65 < 80 лет; 5 – ≥ 80 лет.

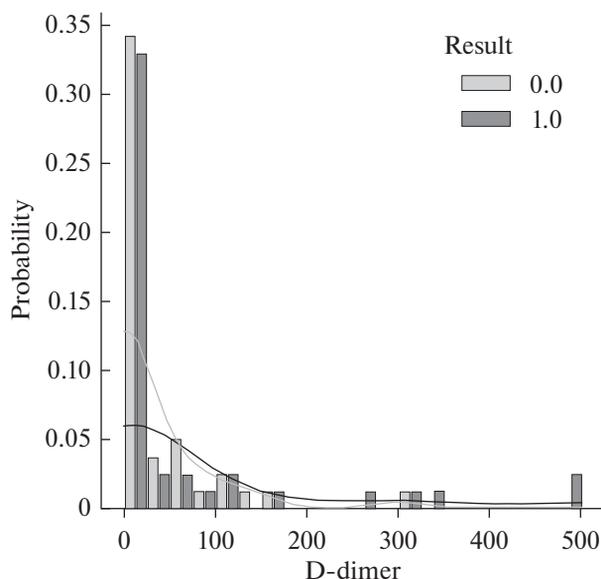


Рис. 7. Вероятность благоприятного (0) и летального (1) исходов болезни пациентов в зависимости от превышения уровня D-димера в крови относительно нормы.

Из рис. 7 видно, что при нормальном уровне D-димера количество благоприятных и летальных исходов практически одинаково, при уровне D-димера на 300% выше нормы летальность составляет 100% – все эти пациенты относятся к 5-ой возрастной группе (рис. 6).

Статистический анализ полученных данных не выявил значимого отличия вероятности летального исхода при нормальном уровне D-димера от таковой при повышенном уровне D-димера ($\chi^2(1, n = 79) = 0.023$ с поправкой Йетса, $p = 0.879$).

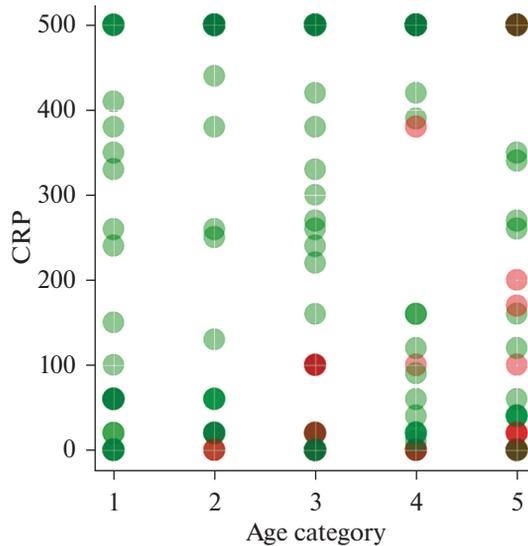


Рис. 8. Зависимость исхода болезни (красный – умер, зеленый – выписан) от превышения концентрации С-реактивного белка (CRP) в крови относительно нормы и от возраста пациентов: 1 – 18 < 35 лет; 2 – 35 < 50 лет; 3 – 50 < 65 лет; 4 – 65 < 80 лет; 5 – ≥ 80 лет.

Видимо, это обусловлено малой выборкой пациентов, в которую вошли практически все летальные исходы (39).

Проведен статистический анализ показателей АРТТ, выборка составила 186 человек. Большинство умерших пациентов (34 человека) имели данный показатель на уровне нормы, 5 пациентов – выше нормы, значимого отличия вероятности летального исхода для этих категорий пациентов не обнаружено ($\chi^2(1, n = 186) = 0.841$ с поправкой Йетса, $p = 0.359$). Все пациенты (14 человек) с АРТТ ниже нормы выздоровели, видимо, благодаря антикоагулянтной терапии. Таким образом, величина АРТТ не может являться маркером летальности.

Следующий показатель, который был рассмотрен – С-реактивный белок (CRP), выборка пациентов составила 181 человек. Была проанализирована зависимость исхода болезни от его содержания в крови пациентов разного возраста. Она представлена на рис. 8 в виде диаграммы рассеяния параметров. Из диаграммы видно, что пациенты выздоравливали и умирали с самыми разными значениями этого показателя, т.е. корреляции в данном случае не обнаружено, но мы обратили внимание на значительную летальность пациентов с низким уровнем CRP.

Поэтому мы решили проверить, как влияет применение кортикостероидов (внутримышечные инъекции преднизолона или дексаметазона) на исход болезни пациентов с разным уровнем CRP. На рис. 9 представлено нормированное распределение пациентов (181 человек) с благоприятным и летальным исходами болезни в зависимости от содержания CRP в крови при проведении терапии кортикостероидами. Из диаграммы видно, что количество умерших пациентов составляет более 50% от общего количества пациентов с низким уровнем CRP (0–5 мг/л). Большая часть летальных исходов находится в интервале концентрации С-реактивного белка 0–12.5 мг/л.

Нами проведен сравнительный анализ распределений пациентов, в терапии которых применялись и не применялись противовоспалительные стероиды, концентрацию CRP 12.5 мг/л использовали как пограничное значение (табл. 4).

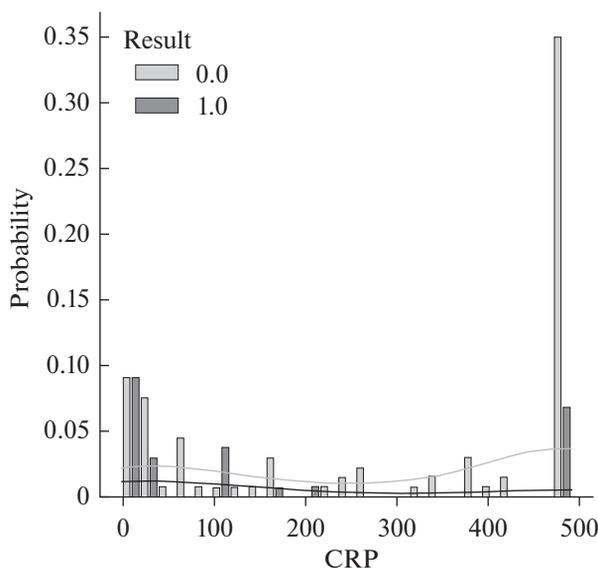


Рис. 9. Вероятность благоприятного (0) и летального (1) исхода заболевания в зависимости от превышения уровня С-реактивного белка (CRP) в крови относительно нормы на фоне лечения кортикостероидами.

Из табл. 4. видно, что среди пациентов с концентрацией в крови $CRP \leq 12.5$ мг/л, получавших кортикостероиды (дексаметодон, преднизолон), умерли 38.9%, из пациентов, не получавших стероиды, умерли 16%, достоверность отличий определена на уровне $p < 0.10$. Если CRP был выше 12.5 мг/л, то летальность при гормонотерапии составила 14.3%, а в отсутствие терапии стероидами умерли 12% пациентов, в данном случае из-за малого количества наблюдений, достоверность отличий определить невозможно. Достоверность отличия степени летальности пациентов в случае применения кортикостероидов при содержании в крови $CRP \leq 12.5$ мг/л

Таблица 4. Исход болезни пациентов с различным уровнем С-реактивного белка в крови в зависимости от лечения кортикостероидами; оценка достоверности отличий признаков групп пациентов

Исход болезни	Количество пациентов, в терапии которых кортикостероиды			
	применяли		не применяли	
	CRP ≤ 12.5 мг/л	CRP > 12.5 мг/л	CRP ≤ 12.5 мг/л	CRP > 12.5 мг/л
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>
Благоприятный	33	66	21	22
Летальный	21	11	4	3
Столбцы	Достоверность отличий признаков при сравнении выборок пациентов			
<i>a</i> и <i>b</i>	$\chi^2(1, n = 181) = 9.118$ с поправкой Йетса, $p = 0.0025$			
<i>a</i> и <i>c</i>	$\chi^2(1, n = 181) = 3.148$ с поправкой Йетса, $p = 0.076$			
<i>b</i> и <i>d</i>	$\chi^2(1, n = 181) = 0.002$ с поправкой Йетса, $p = 0.963$			
<i>c</i> и <i>d</i>	Малое количество наблюдений			

(38.9%) и при CRP > 12.5 мг/л (14.3%) определена на уровне доверительной значимости $p < 0.01$.

Таким образом, при использовании кортикостероидов уровень летальности пациентов с CRP ≤ 12.5 мг/л в 2.7 раз выше, чем пациентов с CRP > 12.5 мг/л ($p < 0.01$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В последнее время наблюдается рост числа больных COVID-19 с признаками пневмонии. Особенности пневмонии при COVID-19 заключаются в следующем: происходит поражение интерстициальной (соединительной) ткани, при острой форме заболевания — альвеол; чаще наблюдается двусторонне поражение легких; на компьютерной томографии пораженные участки выглядят полупрозрачно, так называемое “матовое стекло”; проявляется высокая степень дыхательной недостаточности, она быстро развивается. Помимо повреждения легких, у некоторых пациентов обнаруживают повреждения других органов, включая печень, почки, сердце и систему кровотока, что свидетельствует о наличии системного воспаления [5, 6]. Перечисленные особенности связаны с патогенезом COVID-19, а именно развитием очень сильной воспалительной реакции организма на вирусные частицы, что приводит к поражению тканей собственного организма иммунокомпетентными клетками, вызывая ОРДС и полиорганную недостаточность [7].

При большом потоке больных с COVID-19 полезными являются маркеры развития заболевания, которые должны сигнализировать о возможности неблагоприятного исхода болезни [11]. Выявить такие маркеры, уточнить их параметры можно, проводя исследования на репрезентативных выборках пациентов с использованием адекватных методов статистического и корреляционного анализа.

В рамках представленного ретроспективного исследования эпикризов больных пневмонией, вызванной вирусом SARS-CoV-2 (случайная выборка составила 209 человек), нами проанализированы физиологические показатели пациентов, которые обязательно изучаются врачом при госпитализации, а также показатели коагуляции крови и развития воспалительной реакции — физиологических процессов, подверженных наибольшему изменению при COVID-19.

Корреляционная диаграмма (рис. 1), для построения которой были использованы возраст, пол пациентов, наличие сопутствующего заболевания (СС, диабет, онкология) и 7 физиологических показателей (табл. 1), позволила выявить физиологические признаки пациентов, в наибольшей степени ассоциированные с неблагоприятным исходом болезни: возраст ($K_c = 0.25$), наличие сопутствующего заболевания ($K_c = 0.16-0.20$), уровень сатурации ($K_c = -0.43$). Эти признаки были более детально проанализированы.

В частности, показано, что уровень смертности среди госпитализированных с пневмонией больных растет с увеличением возраста пациентов (рис. 2). Так, в возрастной категории 18 < 35 лет (26 человек) не зафиксировано летальных исходов, в возрастной группе 35 < 50 (40 человек) — их 12.5%, в группе 50 < 65 лет (44 человека) — 20.5%, в группе 65 < 80 лет (52 человека) — 17.3%, в группе > 80 лет (47 человек) — 36.2%. Отмечено также, что женщин среди пациентов трех старших групп (после 50 лет) почти в 1.5 раза больше, чем мужчин, а смертность в 2.2 раза меньше: в группе женщин зафиксировано 16.5% неблагоприятных исходов, в группе мужчин — 36.2% ($p < 0.05$). В 3-ей возрастной группе мужчин летальных исходов 27.8%, в 4-ой группе — 26.3%, в группе мужчин старше 80 лет (21 человек) — 52.4%.

Полученные нами результаты согласуются с данными других исследователей, определяющих пожилой возраст и мужской пол как факторы риска неблагоприятного исхода COVID-19 [11, 12, 15]. Так, мета-анализ, включающий 3027 пациентов, инфицированных SARS-CoV-2 [16], определил, что для курящих мужчин в воз-

расте >65 лет данное заболевание является наиболее опасным. В настоящем исследовании с достаточной степенью достоверности ($p < 0.05$) показано, что возраст старше 50 лет и мужской пол можно считать факторами риска для пациентов с диагностированной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2.

При рассмотрении влияния сопутствующего заболевания на исход болезни пациентов мы разделили заболевания на три категории: сердечно-сосудистая патология, диабет и онкология, не детализируя диагноз. 97% пациентов имели какую-либо патологию из перечисленных категорий, у многих в анамнезе присутствовали несколько заболеваний, так, у 90% больных диабетом была СС патология. При проведении статистического анализа мы рассматривали влияние каждой категории заболевания отдельно (табл. 2). Показано, что значимое влияние на исход болезни оказывает СС патология ($p < 0.01$). Смертность в группе таких больных в 3 раза выше, чем у пациентов без СС заболеваний. Смертность у больных диабетом в 1.7 раз выше, чем у пациентов без диабета ($p < 0.10$). Влияние онкологического заболевания на исход болезни не значимо ($p > 0.10$), возможно отсутствие статистически обоснованной корреляции в данном случае обусловлено малым количеством наблюдений.

СС заболевание, как наиболее значимый фактор, ухудшающий прогноз пациентов с COVID-19, отмечают разные авторы: в работе [17] установлено, что у умерших пациентов наиболее часто встречались артериальная гипертензия и заболевания сердца; в работе [18] артериальная гипертензия также указана как неблагоприятное заболевание с точки зрения прогноза; в исследовании [15] ишемическая болезнь сердца находится в списке заболеваний с наиболее высоким процентом летальности (26.3%).

Влияние диабета 2-го типа на исход болезни подробно рассмотрено в работах [15, 19], авторы отмечают увеличение летальности от COVID-19 у пациентов с данным заболеванием более чем в 2 раза. Полученные нами данные согласуются с результатами этих исследований.

Нами не выявлено значимого влияния на исход заболевания избыточной массы тела, об этом свидетельствуют результаты анализа, приведенные на корреляционной диаграмме (рис. 1) и в виде нормированного распределения (рис. 3), а также статистическая оценка достоверности отличий признаков. В работе [15] также не наблюдалось существенного различия по индексу массы тела между выписанными и умершими пациентами: средний показатель индекса массы тела выписанных пациентов составил 32.9 кг/м^2 , умерших — 30.9 кг/м^2 . Но обращает на себя внимание тот факт, что большая часть пациентов (73%) со среднетяжелой и тяжелой формы COVID-19 все-таки имеют избыточный вес. Ожирение в качестве значимого фактора риска неблагоприятного исхода COVID-19 отмечено в работе мексиканских авторов [18].

Известно, что снижение уровня сатурации до 95% при норме 98–99% является показанием к госпитализации больных COVID-19 в России [20]. Уровень сатурации свидетельствует о насыщении крови кислородом, падение показателя говорит о снижении одной из основных функций легких — переноса кислорода из воздуха в кровь. Снижение сатурации при COVID-19 обычно сопровождается одышкой, которая проявляется в увеличении частоты дыхания. Нами выявлены максимальные коэффициенты корреляции уровня сатурации ($K_c = -0.43$) и частоты дыхания ($K_c = 0.43$) — взаимосвязанных физиологических показателей — с летальным исходом (рис. 1). Детальное рассмотрение зависимости уровня сатурации выписанных и умерших пациентов от их возраста (рис. 4, табл. 3) позволило выявить некоторые закономерности: у большинства выздоровевших пациентов уровень сатурации при госпитализации был выше 85%, с увеличением возраста среднее значение уровня

сатурации выписанных пациентов снижалось от 95.2 до 91.3%; у умерших пациентов средний уровень сатурации в зависимости от категории возраста был 86.2–79.9%, для пациентов старше 50 лет уровень сатурации при госпитализации ниже 80% стал маркером летальности ($p < 0.01$). Необходимо отметить, что одышка как основной признак пневмонии при COVID-19 упомянута во многих публикациях [5, 6, 16, 17], в работе [12] частота дыхания и степень сатурации кислородом включены в 8 основных предикторов при построении прогностической модели летального исхода заболевания.

Помимо тяжелой гипоксии у больных COVID-19 отмечают коагулопатии с развитием синдрома диссеминированного свертывания крови [21]. Поэтому при госпитализации больных с подозрением на COVID-19 или с подтвержденным COVID-19 эксперты рекомендуют определять уровень D-димера в крови, фибриноген и другие показатели свертывающей системы крови, оценить количество тромбоцитов и в соответствии с результатами анализов проводить антитромботическую терапию [21]. Известно, что уровень D-димера в крови, более чем в 2 раза превышающий верхнюю границу нормы, указывает на повышенный риск тромбоза глубоких вен нижних конечностей и тромбоза легочных артерий [10, 21]. У больных COVID-19 предложено считать уровень D-димера в крови высоким, если он в 3–4 раза превышает верхнюю границу нормы, и крайне высоким при превышении верхней границы нормы в 5–6 раз и более [21]. Уровень D-димера 1 мг/мл введен в прогностическую модель летальности при COVID-19 [22].

В настоящем исследовании нами проанализированы показатели свертывающей системы крови в качестве предикторов летальности (рис. 5). На выборке из 79 пациентов установлены наибольшие коэффициенты корреляции для D-димера ($K_c = 0.17$) и АРТТ ($K_c = -0.17$), т.е. с увеличением содержания в крови D-димера и с уменьшением активированного частичного тромбопластинового времени (АРТТ) увеличивается вероятность летального исхода. Установлено, что повышение концентрации D-димера более чем в 2.5 раз относительно нормы (более 625 нг/мл) у пациентов старше 80 лет ассоциировано с летальным исходом (рис. 6). У пациентов других возрастных категорий редко фиксировали такое превышение, летальных исходов среди них не было. Статистически значимого отличия вероятности летального исхода при нормальном уровне D-димера от таковой при повышенном уровне D-димера обнаружено не было, возможно из-за недостаточного количества наблюдений (79 пациентов, из них 39 летальных исходов). Аналогичные результаты были получены при статистическом анализе показателя АРТТ (выборка составила 186 человек). Видимо, антитромботическая терапия является достаточно эффективной.

Основной причиной летальных исходов при COVID-19 является агрессивная воспалительная реакция организма – “цитокиновый шторм”. На это указывает корреляция тяжести заболевания COVID-19 и летальности с уровнем цитокинов, включая интерлейкин ИЛ-6 и ИЛ-8, аналогичное явление было обнаружено в предыдущих исследованиях ближневосточного респираторного синдрома (MERS) и тяжелого острого респираторного синдрома (SARS) [23]. У пациентов, инфицированных патогенными коронавирусами человека, цитокиновый шторм способствует острому повреждению легких и развитию ОРДС [1, 4, 23]. Следовательно, контроль цитокинового шторма предложен в качестве стратегии лечения пациентов с COVID-19, особенно в тяжелых случаях [23, 24].

Под действием противовоспалительных цитокинов увеличивается синтез С-реактивного белка – гликопротеина, вырабатываемого печенью и относящегося к белкам острой фазы воспаления. Его концентрация в крови возрастает в 10–100 раз в течение 24–48 ч после начала воспаления [25]. Содержание С-реактивного белка в крови, как правило, контролируют у госпитализированных пациентов, поэтому в качестве показателя развития воспалительного процесса нами был рассмотрен

именно CRP. Необходимо отметить, что уровень С-реактивного белка учитывается во многих прогностических моделях риска смерти от COVID-19 [11, 12, 22].

Выборка пациентов для статистического анализа составила 181 человек. Корреляция содержания CRP с исходом болезни обнаружено не было, но отмечалось значительное количество летальных исходов при нормальном уровне этого белка (рис. 8). Поэтому было проанализировано влияние кортикостероидов (внутримышечные инъекции преднизолона или дексаметазона), применяемых в терапии, на исход болезни пациентов с различным содержанием CRP. Известно, что кортикостероиды могут использоваться для подавления цитокинового шторма, однако, основываясь на данных, полученных от пациентов с MERS и SARS, их применение не улучшило выживаемость, а скорее замедляло выведение вируса [23, 24].

Статистический анализ показал (табл. 4), что применение кортикостероидов при уровне CRP ≤ 12.5 мг/л с большей вероятностью приведет к летальному исходу, чем их отсутствие в терапии при этом уровне С-реактивного белка ($p < 0.10$) и чем их применение при уровне CRP > 12.5 мг/л ($p < 0.01$). Влияние на исход болезни применения кортикостероидов при уровне CRP > 12.5 мг/л не нашло статистического подтверждения, возможно, из-за малого количества наблюдений. Следовательно, при содержании в крови пациентов CRP ниже 12.5 мг/л применение кортикостероидов может привести к ухудшению состояния больных COVID-19, что согласуется с результатами исследований, приведенными в работах [23, 24].

Таким образом, применение адекватных компьютерных программ и математических методов позволило нам проанализировать значительный массив физиологических и биохимических показателей пациентов с пневмонией COVID-19 и выявить некоторые закономерности, которые можно использовать в клинической практике и в дальнейших исследованиях нового инфекционного заболевания.

ОГРАНИЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ограничения связаны с ретроспективным дизайном исследования. Не все лабораторные исследования были выполнены у всех пациентов, поэтому частные выборки варьировали по количеству пациентов. Кроме того, значения лабораторных тестов могут быть искажены предшествующим лечением этих пациентов вне стационара. Интерпретация наших результатов также может быть ограничена из-за относительно небольшого размера общей выборки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Математический анализ ретроспективных данных 209 пациентов с пневмонией, вызванной вирусом SARS-CoV-2, позволил конкретизировать некоторые физиологические и биохимические показатели, свидетельствующие о неблагоприятном исходе болезни: возраст старше 50 лет, мужской пол, наличие у пациентов сердечно-сосудистой патологии, для пациентов старше 50 лет – сатурация меньше 80%, для пациентов старше 80 лет – уровень D-димера в 2.5 раза выше нормы. Отмечено, что при содержании в крови пациентов С-реактивного белка ниже 12.5 мг/л применение кортикостероидов приводит к увеличению вероятности летального исхода.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнялась в рамках программы исследований “Поиск индикаторных показателей тяжести течения COVID-19”, запланированных в Саратовском медицинском университете “Реавиз”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и обсуждение результатов (М.С.Г.), планирование эксперимента, обсуждение результатов и написание манускрипта (С.М.Р.), математическая обработка, графическое представление и обсуждение результатов (М.А.Б.), обсуждение результатов (А.А.Р.), сбор данных (Д.А.П., А.Ю.Ф.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mishra SK, Tripathi T* (2021) One year update on the COVID-19 pandemic: Where are we now? *Acta Tropica* 214: 105777. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105778>
2. *Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, Guo L, Guo R, Chen T, Hu J, Xiang Z, Mu Z, Chen X, Chen J, Hu K, Jin Q, Wang J, Qian Z* (2020) Characterisation of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immunecrossreactivity with SARS-CoV-2. Version 2. *Nature Communicat* 11(1): 1620. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15562-9>
3. *Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Kru N, Erichsen S, Schiergens TS, Herrler G, Wu N, Nitsche A, Mu MA, Drosten C, Pohlmann S* (2020) SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* 181(2): 271–280. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
4. *Фролова ЕВ, Филиппова ЛВ, Учеваткина АВ, Пономаренко ВА, Борзова ЮВ, Шуницкая ОА, Тараскина АЕ, Гайковая ЛБ, Федоренко АС, Гомонова ВВ, Латария ЭЛ, Васильева НВ* (2021) Иммунологические особенности пациентов с COVID-19 в зависимости от степени тяжести заболевания. *Пробл мед микол* 23(1):3-13. [*Frolova EV, Filippova LV, Uchevatkina AV, Ponomarenko VA, Borzova YuV, Shurpitskaya OA, Taraskina AE, Gaykovaya LB, Fedorenko AS, Gomonova VV, Latariia EL, Vasilyeva NV* (2021) Immunological features of patients with COVID-19, depending on the severity of the disease. *Probl Med Mycol* 23(1): 3–13. (In Russ)].
5. *Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, Qiu Y, Wang J, Liu Y, Wei Y, Xia J, Yu T, Zhang X, Zhan L* (2020) Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* 395: 507–513. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7)
6. *Huang C, Wang Y, Li X., Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, Fan G, Xu J, Gu X, Cheng Z, Yu T, Xia J, Wei Y, Wu W, Xie X, Yin W, Li H, Liu M, Xiao Y, Gao H, Guo L, Xie J, Wang G, Jiang R, Gao Z, Jin Q, Wang J, Cao B* (2020) Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 395: 497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
7. *Ragab D, Eldin SH, Taeimah M, Khattab R, Salem R* (2020) The COVID-19 Cytokine Storm; What We Know So Far. *Front Immunol* 11: 1446. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01446>
8. *Guo T, Fan Y, Chen M, Wu X, Zhang L, He T, Wang H, Wan J, Wang X, Lu Z* (2020) Cardiovascular implications of fatal outcomes of patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *J.A.M.A. Cardiology* 5(7): 811–818. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2020.1017>
9. *Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, Xiang J, Wang Y, Song B, Gu X, Guan L, Wei Y, Li H, Wu X, Xu J, Tu S, Zhang Y, Chen H, Cao B* (2020) Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet* 395(10229): 1054–1062. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-31](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-31)
10. *Канорский СГ* (2021) COVID-19 и сердце: прямое и косвенное влияние. *Кубанск научн мед вестник* 28(1): 16–31. [*Kanorskii SG* (2021) COVID-19 and the heart: direct and indirect impact. *Kuban Scient Med Bull* 28(1):16–31. (In Russ)]. <https://doi.org/10.25207/1608-6228-2021-28-1-16-31>
11. *Wynants L, Van Calster B, Collins G S, Riley R D, Heinze G, Schuit E, Bonten MMJ, Dahly DL, Damen JA, Debray TPA, de Jong VMT, De Vos M, Dhiman P, Haller MC, Harhay MO, Henckaerts L, Heus P, Kammer M, Kreuzberger N, Lohmann A, Luijken K, Ma J, Martin GP, McLernon DJ, Navarro CLA, Reitsma JB, Sergeant JC, Shi C, Skoetz N, Smits LJM, Snell KIE, Sperrin M, Spijker R, Steyerberg EW, Takada T, Tzoulaki I, van Kuijk SMJ, van Bussel BCT, van der Horst ICC, van Royen FS, Verbaekel JY, Wallisch C, Wilkinson J, Wolff R, Hooft L, Moons KGM, van Smeden M* (2020) Prediction models for diagnosis and prognosis of covid-19: systematic review and critical appraisal. *Br Med*

- J 369: m1328.
<https://doi.org/10.1136/bmj.m1328>
12. Knight SR, Ho A, Pius R, Buchan I, Carson G, Drake TM, Dunning J, Fairfield CJ, Gamble C, Green CA, Gupta R, Halpin S, Hardwick HE, Holden KA, Horby PW, Jackson C, Mclean KA, Mer-son L, Nguyen-Van-Tam JS, Norman L, Noursadeghi M, Oliaro PL, Pritchard MG, Russell CD, Shaw CA, Sheikh A, Solomon T, Sudlow C, Swann OV, Turtle LCw, Openshaw PJm, Baillie JK, Semple MG, Docherty AB, Harrison EM (2020) Risk stratification of patients admitted to hospital with covid-19 using the ISARIC WHO Clinical Characterisation Protocol: development and validation of the 4C Mortality Score. *Br Med J* 370 :m3339
<https://doi.org/10.1136/bmj.m3339>
 13. Крамер Г (1975) Математические методы статистики. М. Мир. [Cramér H (1975) Mathematical methods of statistics. M. Mir. (In Russ)].
 14. Greenwood PE, Nikulin MS (1996) A guide to chi-squared testing. New York. John Wiley & Sons.
 15. Демидова Т Ю, Лобанова КГ, Переходов СН, Анциферов МБ, Ойноткинова ОИ (2021) Клинико-лабораторная характеристика пациентов с COVID-19 и сопутствующим сахарным диабетом 2 типа. Кардиоваскулярная терапия и профилактика 20(1): 2750. [Demidova TY, Lobanova KG, Perekhodov SN, Antsiferov MB, Oynotkinova OS (2021) Clinical and laboratory characteristics of patients with COVID-19 and concomitant type 2 diabetes. *Cardiovasc Therapy and Prevention*. 20(1): 2750. (In Russ)].
<https://doi.org/10.15829/1728-8800-2021-2750>
 16. Zheng Z, Peng F, Xu B, Zhao J, Liu H, Peng J, Li Q, Jiang C, Zhou Y, Liu S, Ye C, Zhang P, Xing Y, Guo H, Tang W (2020) Risk factors of critical & mortal COVID-19 cases: A systematic literature review and meta-analysis. *J Infect* 81(2): e16–e25.
<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.04.021>
 17. Chen T, Wu D, Chen H, Yan W, Yang D, Chen G, Ma K, Xu D, Yu H, Wang H, Wang T, Guo W, Chen J, Ding C, Zhang X, Huang J, Han M, Li S, Luo X, Zhao J, Ning Q (2020) Clinical characteristics of 113 deceased patients with coronavirus disease 2019: retrospective study. *Br Med J* 368: m1091.
<https://doi.org/10.1136/bmj.m1091>
 18. Parra-Bracamonte GM, Lopez-Villalobos N, Parra-Bracamonte FE (2020) Clinical characteristics and risk factors for mortality of patients with COVID-19 in a large data set from Mexico. *Ann Epidemiol* S1047-2797(20)30286-6.
<https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2020.08.005>
 19. Шестакова МВ, Викулова ОК, Исаков МА, Дедов ИИ (2020) Сахарный диабет и COVID-19: анализ клинических исходов по данным регистра сахарного диабета Российской Федерации. *Пробл эндокринологии* 66(1): 35–46. [Shestakova MV, Vikulova OK, Isakov MA, Dedov II (2020) Diabetes and COVID-19: analysis of the clinical outcomes according to the data of the Russian Diabetes Registry. *Probl Endocrinol* 66(1): 35–46. (In Russ)].
<https://doi.org/10.14341/probl12458>
 20. Официальный интернет-портал правовой информации. Дата опубликования: 26.05.2020. Номер опубликования: 0001202005260023. [Official internet portal of legal information. Publication date: 26.05.2020. Number of publication: 0001202005260023. (In Russ)].
<http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202005260023?index=4&rangeSize=1>
 21. Шляхто ЕВ, Арутюнов ГП, Беленков ЮН., Тарловская ЕИ, Конради АО, Панченко ЕП, Явелов ИС, Терещенко СН, Ардашев АВ, Арутюнов АГ, Григорьева НЮ, Джунусбекова ГА, Дракпина ОМ, Желяков ЕГ, Канорский СГ, Колоцей ЛВ, Козилова НА, Комаров АЛ, Кропачева ЕС, Мальчикова СВ, Митьковская НП, Орлова ЯА., Петрова ММ, Ребров АП, Сисакян АС, Скибицкий ВВ, Снежский ВА, Сугралиев АВ, Фомин ИВ, Чесникова АИ, Шапошник ИИ (2020) Применение статинов, антикоагулянтов, антиагрегантов и антиаритмических препаратов у пациентов с COVID-19. Согласованная позиция экспертов Российского кардиологического общества, Евразийской ассоциации терапевтов, Национального общества по атеротромбозу, Общества специалистов по неотложной кардиологии, Евразийской аритмологической ассоциации. *Кардиология* 60(6): 4–14. [Shlyakhto EV, Arutyunov GP, Belenkov YuN, Tarlovskaya EI, Konradi AO, Panchenko EP, Yavelov IS, Tereshchenko SN, Ardashev AV, Arutyunov AG, Grigorieva NYu, Dzhunusbekova GA, Drapkina OM, Koziolova NA, Komarov AL, Kropacheva ES, Malchikova SV, Mitkovskaya NP, Orlova YaA, Petrova MM, Rebrov AP, Sisakian H, Skibitsky VV, Sugraliyev AV, Fomin IV, Chesnikova AI, Shaposhnik II, Zhelyakov EG, Kanorskii SG, Kolotsey LV, Snezhitskiy VA (2020) Use of Statins, Anticoagulants, Antiaggregants and Antiarrhythmic Drugs in Patients With COVID-19. The Agreed Experts' Position of Russian Society of Cardiology, Eurasian Association of Therapists, National Society on Atherothrombosis, Societies of Experts in Urgent Cardiology, Eurasian Arrhythmology Association. *Kardiologiya* 60(6): 4–14. (In Russ)].
<https://doi.org/10.18087/cardio.2020.6.n1180>
 22. Hu C, Liu Z, Jiang Y, Shi O, Zhang X, Xu K, Suo C, Wang Q, Song Y, Yu K, Mao X, Wu X, Wu M, Shi T, Jiang W, Mu L, Tully DC, Xu L, Jin L, Li S, Tao X, Zhang T, Chen X (2021) Early prediction of mortality risk among patients with severe COVID-19, using machine learning. *Int J Epidemiol*

- 49(6): 1918–1929.
<https://doi.org/10.1093/ije/dyaa171>
23. Russell CD, Millar JE, Baillie JK (2020) Clinical evidence does not support corticosteroid treatment for 2019-nCoV lung injury. *Lancet* 395(10223): 473–475.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30317-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30317-2)
 24. Miao Y, Fan L, Li J-Y (2020) Potential Treatments for COVID-19 Related Cytokine Storm – Beyond Corticosteroids. *Front Immunol*11: article 1445.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01445>
 25. Кишкун АА (2006) Иммунологические и серологические исследования в клинической практике. ООО “Медицинское информационное агентство”. [Kishkun AA (2006) Immunological and serological studies in clinical practice. ООО “Meditsinskoye informatsionnoye agentstvo”. (In Russ)].

Analysis of Some Physiological and Biochemical Characteristics of Patients with Pneumonia COVID-19 Using Mathematical Methods

M. S. Gromov^a, S. M. Rogacheva^{a, *}, M. A. Barulina^{a, b}, A. A. Reshetnikov^c,
D. A. Prokhozhev^a, and A. Yu. Fomina^a,

^a Saratov Medical University “Reaviz”, Saratov, Russia

^b Institute for Problems of Precision Mechanics and Control RAS, Saratov, Russia

^c Razumovsky Saratov City Clinical Hospital № 2 named after Razumovsky V.I., Saratov, Russia

*e-mail: smro13@yandex.ru

The aim of the work was to conduct a retrospective analysis of the data of patients with pneumonia caused by the SARS-CoV-2 virus, and to determine using mathematical methods the significance of some physiological and biochemical characteristics as markers of an unfavorable outcome of the disease. A random cohort of patients with COVID-19 pneumonia was 209 people. For the mathematical analysis, the physiological characteristics of patients described during hospitalization, as well as indicators of blood coagulation and the development of an inflammatory reaction, were used. The analyzed characteristics were divided into categories relative to the interval of the reference values of the physiological norm. Correlation analysis was performed using categorical data on the disease outcome. The algorithms for calculating statistical characteristics and visualizing the results were implemented in the Python language. Significance of differences in signs when comparing patient cohorts was assessed by the criterion of agreement χ^2 with Yates' correction. The study showed that age over 50 and male gender can be considered risk factors for patients with COVID-19 pneumonia ($p < 0.05$). There was a significant effect of cardiovascular pathologies on the disease outcome ($p < 0.01$), to a lesser extent – of diabetes ($p < 0.10$). The maximum correlation coefficients of the saturation level (-0.43) and respiratory rate (0.43) with a mortal outcome were revealed. For patients over 50 years old, the saturation level during hospitalization below 80% has become a marker of mortality. It has been shown that an increase in D-dimer level over 625 ng/mL in blood of the elder patients (over 80 years) is associated with mortal outcomes. No correlation was found between C-reactive protein (CRP) content and disease outcome. The effect of corticosteroids on the disease outcome in patients with different levels of CRP was analyzed. It was noted that when using corticosteroids, the mortality rate in patients with CRP ≤ 12.5 mg/L is 2.7 times higher than in patients with CRP > 12.5 mg/L ($p < 0.01$). Thus, the use of adequate mathematical methods made it possible to detect some physiological and biochemical characteristics of patients with COVID-19 pneumonia associated with mortality.

Keywords: COVID-19, pneumonia, physiological and biochemical characteristics, retrospective data, mathematical analysis

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВКЛАДА NO И КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ В ДИЛАТАЦИЮ ПИАЛЬНЫХ АРТЕРИАЛЬНЫХ СОСУДОВ У КРЫС

© 2021 г. В. Н. Шуваева¹, *, О. П. Горшкова¹

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

*E-mail: shuvaevavn@infran.ru

Поступила в редакцию 13.08.2021 г.

После доработки 14.09.2021 г.

Принята к публикации 14.09.2021 г.

Важную роль в передаче сигналов от продуцируемого эндотелием NO к гладкомышечным клеткам сосудов играют кальций-зависимые калиевые каналы большой проводимости (BK_{Ca}-каналы). Целью работы было изучение возрастных изменений вклада NO и BK_{Ca}-каналов в вызванную ацетилхолином (АХ) дилатацию пиальных артерий и оценка роли eNOS- и iNOS-продуцируемого NO у крыс Вистар в возрасте 4-х и 9-ти месяцев. Для этого выключали механизмы регуляции сосудистого тонуса с помощью аппликации блокаторов и методом прижизненной микрофотосъемки регистрировали изменение диаметра пиальных артерий на АХ на фоне блокады BK_{Ca}-каналов тетраэтиламонием (ТЭА), NO – L-NAME, iNOS – аминогуанидином (AG). Определяли число дилатаций и степень дилатации пиальных артерий в ответ на действие АХ. Эти данные сравнивали с данными, полученными в отсутствие блокады. Оценивали вклад механизмов, опосредованных активацией BK_{Ca}-каналов, eNOS и iNOS, в дилатацию 3-ех групп пиальных артерий: мелких (диаметром менее 20 мкм), средних (20–40 мкм) и крупных (более 40 мкм). У молодых крыс NO, продуцируемый eNOS, вносит значительный вклад в регуляцию АХ-индуцированной вазодилатации средних и крупных артерий, тогда как у мелких артерий преобладает активация BK_{Ca}-каналов. С возрастом снижается вклад eNOS-опосредованных механизмов в дилатацию средних и крупных артерий, но в процесс дилатации включается iNOS, а также повышается вклад в поддержание базального тонуса и функциональной активности BK_{Ca}-каналов средних и крупных пиальных артерий, которая зависит от NO, продуцируемого iNOS.

Ключевые слова: вазодилатация, пиальные артерии, кальций-чувствительные калиевые каналы большой проводимости, индуцибельная и эндотелиальная NO-синтазы, старение

DOI: 10.31857/S0869813921110091

ВВЕДЕНИЕ

Эндотелий продуцирует большое количество вазоактивных веществ [1, 2]. При старении, когда усиливается дисфункция эндотелия и зачастую нарушается мозговое кровообращение, способность сосудов регулировать кровоснабжение мозга приобретает жизненно важное значение, а исследование механизмов регуляции сосудистого тонуса, в частности вазодилатации, становится актуальным.

Возникновение дисфункции эндотелия (ЭД) при старении связывают со снижением биодоступности оксида азота (NO) [3, 4]. Эндогенный NO генерируется син-

тазой оксида азота (NOS). В сосудистой системе существует несколько видов NOS: эндотелиальная (eNOS), нейрональная (nNOS) и индуцибельная (iNOS) [5, 6]. Первичным источником эндогенного NO является эндотелиальная eNOS [6, 7]. С возрастом снижается уровень eNOS и повышается уровень iNOS [4]. Согласно экспериментальным и клиническим данным, в то время как активация eNOS генерирует небольшое количество NO в течение коротких периодов времени, стимуляция iNOS приводит к замедленному и длительному высвобождению большого количества NO [6, 7]. Чрезмерное количество NO усугубляет окислительно/нитрозативный стресс, приводящий к снижению биодоступности NO и ухудшению вазодилататорной функции эндотелия [6–8].

Значимую роль в передаче сигналов от продуцируемых эндотелием вазоактивных веществ к гладкомышечным клеткам (ГМК) сосудов играют кальций-зависимые калиевые каналы большой проводимости (BK_{Ca}-каналы). NO в сосудах головного мозга воздействует на BK_{Ca}-каналы либо непосредственно, либо через рианодиноразносимые PKG-зависимые механизмы [9, 10], стимулируя чувствительные к рианодину запасы Ca²⁺ в саркоплазматическом ретикулуме и вызывая дискретные токи Ca²⁺, активирующие соседние кластеры BK_{Ca}-каналов [9]. Изменение активности BK_{Ca}-каналов, в свою очередь, также может изменять NO зависимую дилатацию сосудов [11]. Особенности возрастных изменений вклада NO и BK_{Ca}-каналов в дилатацию сосудов головного мозга к настоящему времени изучены не в полной мере. Учитывая, что уровень NO, продуцируемого eNOS, с возрастом снижается, интересным представляется исследовать, как изменяется вклад iNOS-продуцированного NO в дилататорную реакцию сосудов головного мозга у стареющих особей.

Целью данной работы было изучение возрастных изменений вклада NO и кальций-зависимых калиевых каналов большой проводимости в дилатацию мозговых сосудов. Проводилось сравнительное исследование вклада BK_{Ca}-каналов и NO в дилатацию пиальных артерий на воздействие ацетилхолина (АХ), а также оценивалась роль NO, продуцируемого eNOS- и iNOS, в дилатации на АХ у крыс Вистар в возрасте 4-х и 9-ти месяцев. Для этого использовали выключение механизмов регуляции сосудистого тонуса с помощью блокаторов и регистрировали реакцию пиальных артерий на воздействие АХ на фоне блокады BK_{Ca}-каналов, eNOS и iNOS и в ее отсутствие.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании использованы самцы крыс Вистар в возрасте 4-ех ($n = 18$, масса тела 240 ± 20 г) и 9-ти месяцев ($n = 18$, масса тела 450 ± 30 г) из ЦКП “Биоколлекция ИФ РАН”. Работа выполнена в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных” (Европейская конвенция, 19.07.2014) и требованиями Комиссии по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН. Были соблюдены все применяемые в исследованиях международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище по 6 особей в клетках Т4 на стандартной лабораторной диете в условиях искусственного освещения (цикл: 12 ч свет/12 ч темнота).

Крыс наркотизировали хлоралгидратом (43 мг/100 г массы тела, внутривенно). Среднее артериальное давление (АД) у наркотизированных крыс измеряли инвазивным методом через катетер в бедренной артерии, соединенный с датчиком DTXPlus™ (Argon Critical Care Systems, Сингапур), подключенным к компьютеру, работающему с оригинальной программой визуализации значений АД, разрабо-

танной в нашей лаборатории. Среднее АД составило у наркотизированных крыс в возрасте 4-х месяцев – 97 ± 4 мм рт. ст., у крыс в возрасте 9-ти месяцев – 99 ± 4 мм рт. ст. Методом прижизненной микрофото съемки через трепанационное отверстие площадью примерно 1.6 см^2 в теменной области черепа у каждого животного фотографировали пиальные сосуды в стандартных условиях при непрерывном орошении поверхности мозга раствором (температура раствора 37°C) Кребса (фоновое изображение) и их реакцию на воздействие – аппликацию того или иного вещества. Исследовали дилатацию пиальных артерий на АХ [12], который в концентрации 10^{-7} М вызывает преимущественно дилатацию артерий, в том числе церебральных [13], стимулируя образование в эндотелиальных клетках вазодилаторов, в частности NO.

Поочередно ингибируя с помощью блокаторов механизмы вазодилатации, мы регистрировали изменение числа дилатированных пиальных артерий и степени их дилатации в ответ на аппликацию АХ. Индуцированную АХ дилатацию в отсутствие блокады считали базовой реакцией (100% дилатаций), и с ней сравнивали результаты, полученные при ингибировании механизмов вазодилатации. Экспериментальные крысы разделили на 6 групп: 3 группы крыс в возрасте 4-х мес. и 3 группы крыс в возрасте 9-ти мес., в каждой группе было по 6 особей. У 2-х групп крыс в возрасте 4-х и 9-ти мес. изучали реакции артерий на орошение поверхности головного мозга раствором хлорида ацетилхолина (АХ, Sigma, 10^{-7} М, 5 мин) в отсутствие и на фоне блокады VK_{Ca} -каналов хлоридом тетраэтиламмония [14] (ТЕА, “Вектон”, Россия, 2 мМ, предварительное орошение поверхности мозга в течение 10 мин с последующим добавлением АХ в раствор блокатора). У 2-х других групп крыс в возрасте 4-х и 9-ти мес. изучали реакции артерий на АХ в отсутствие и на фоне последовательной блокады NO-зависимой вазодилатации раствором метилового эфира нитро-L-аргинина [15, 16] (L-NAME, ICN Biomed. Inc, 10^{-3} М, предварительное орошение поверхности мозга в течение 10 мин с последующим добавлением АХ в раствор блокатора) и затем совместной блокады NO и VK_{Ca} -каналов (L-NAME (10^{-3} М) + ТЭА (2 мМ), предварительное орошение поверхности мозга в течение 10 мин с последующим добавлением АХ в раствор блокаторов). У 2-х последних групп крыс в возрасте 4-х и 9-ти мес. изучали реакции пиальных артерий на АХ в отсутствие и на фоне блокады iNOS раствором бикарбоната аминоксидина [16] (AG, ICN Biomed. Inc, 1 мМ, предварительное орошение поверхности мозга в течение 10 мин с последующим добавлением АХ в раствор блокатора) и дополнительной блокады VK_{Ca} -каналов хлоридом тетраэтиламмония (ТЕА, “Вектон”, Россия, 2 мМ, предварительное орошение поверхности мозга в течение 10 мин с последующим добавлением АХ в раствор блокаторов).

В реакциях пиальных артерий на АХ в отсутствие блокады у крыс одного возраста значимых различий между животными внутри отдельных групп в сериях с введением различных блокаторов не обнаружено (проверка по критерию Краскела–Уоллеса). Эксперимент длился примерно 90 мин, после его окончания животных усыпляли передозировкой раствора хлоралгидрата.

На изображениях участков пиальной сосудистой сети измеряли (программа Inspector Matrox) ширину потока эритроцитов, соответствующую внутреннему диаметру сосуда. Об изменении роли VK_{Ca} -каналов и NO в дилатации сосудов судили по изменению числа дилатированных сосудов и степени их дилатации в ответ на воздействие АХ до и после применения блокаторов. У каждой крысы было измерено в среднем 40 ± 2 участка пиальной артериальной сосудистой сети. Для анализа исследованные артериальные сосуды были разделены на 3 группы в соответствии с их начальными диаметрами: 1) <20 мкм (мелкие), 2) $20\text{--}40$ мкм (средние) и 3) >40 мкм (крупные).

Изменение числа сосудов, расширившихся в ответ на воздействие, выражали в процентах относительно общего числа исследованных сосудов в группе. Степень дилатации ΔD оценивали как разность между значениями диаметра после (D_2) и до (D_1) воздействия препарата, отнесенную к диаметру сосуда D_1 перед воздействием, %:

$$\Delta D = (D_2 - D_1) / D_1 \times 100.$$

Считали, что реакция на воздействие отсутствует, если изменения диаметра не превышали $5.0 \pm 0.5\%$. Это значение, как мы предварительно установили, регистрируется в покое в отсутствие каких-либо воздействий.

Данные по отдельной группе сосудов усреднялись для каждого животного и использовались для статистических сравнений. Анализ данных проводили с использованием программы InStat 3.02 ("GraphPad Software Inc.", США), данные представляли в виде среднего арифметического значения и его ошибки. Сравнение средних данных независимых выборок при нормальном характере распределения вариант в совокупности данных (выборке) рассчитывали при помощи дисперсионного анализа с последующим попарным сравнением групп согласно критерию Тьюки. При распределении вариант в выборке, отличном от нормального, при сравнении нескольких групп применяли критерий Краскела–Уоллиса. При попарном сравнении 2-х групп данных применяли U -критерий Манна–Уитни. Достоверным уровнем отличий считали вероятность не менее 95% ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У 9-месячных крыс число дилатаций на АХ было достоверно меньше чем у 4-месячных ($p < 0.05$). Число дилатированных участков у артерий разных калибров составило в среднем $35.4 \pm 1.6\%$ от количества исследованных участков у 9-месячных крыс и $41.3 \pm 2.2\%$ у 4-месячных животных. Степень дилатации на АХ артерий различных диаметров снижалась от мелких к более крупным сосудам во всех группах крыс обоих возрастов. Выключая поочередно изучаемые механизмы вазодилатации, сравнивали данные об АХ-индуцированной дилатации пиальных артерий на фоне блокады с результатами реакции на АХ в ее отсутствие (число дилатаций в отсутствие блокады принимали за 100%).

Аппликация ТЕА у крыс в возрасте 4-ех месяцев вызывала констрикцию 65% мелких сосудов и в среднем около 40% средних и крупных артерий. Число дилаторных реакций на воздействие АХ на фоне предварительного введения ТЕА снижалось на 42, 34 и 23% у мелких, средних и крупных артерий соответственно (рис. 1а).

На фоне блокады NOS посредством L-NAME число АХ-индуцированных дилатаций у 4-месячных крыс снижалось значительно: у мелких и средних артерий примерно в равной степени на 54 и 51% соответственно. Сильнее всего, на 86%, была подавлена АХ-индуцированная дилатация крупных артерий (рис. 1а). Одновременная блокада VK_{Ca} -каналов и NO у молодых крыс приводила к подавлению АХ-индуцированной дилатации во всех группах сосудов. (рис. 1а). Наиболее выраженные изменения отмечены в группе крупных сосудов (на 78%). С уменьшением диаметра различия в реакциях на АХ до и после одновременной блокады VK_{Ca} -каналов и NO достоверно снижались ($p < 0.05$, KW = 12.1, критерий Краскела–Уоллиса), и в группе мелких сосудов снижение числа дилатаций составляло 39%. При этом уменьшение дилатации у мелких артерий было примерно таким же, как при блокаде только VK_{Ca} -каналов, а у средних и крупных соответствовало значениям, полученным при блокаде только eNOS (U -критерий Манна–Уитни).

На фоне блокады iNOS у молодых крыс в возрасте 4-ех месяцев число АХ-индуцированных дилатаций во всех группах артерий не изменялось по сравнению с реакцией на АХ в отсутствие блокады. Совместная блокада VK_{Ca} -каналов и iNOS

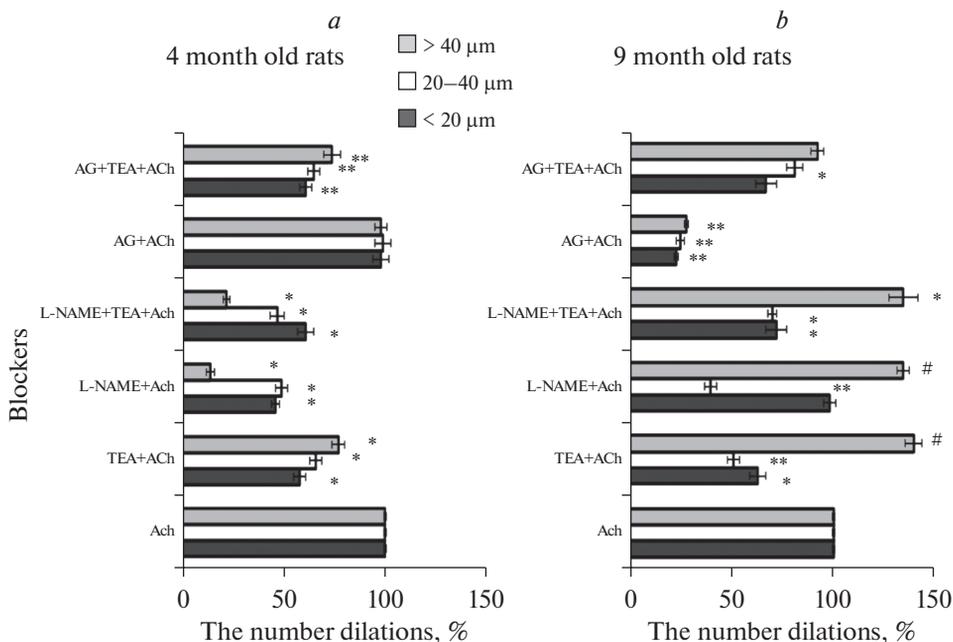


Рис. 1. Изменение числа индуцированных АХ дилатаций пиальных артерий разных калибров на фоне блокады VK_{Ca} -каналов (TEA + ACh), либо eNOS (L-NAME + ACh), либо одновременной блокады eNOS и VK_{Ca} -каналов (L-NAME + TEA + ACh), либо iNOS (AG + ACh), либо одновременной блокады iNOS и VK_{Ca} -каналов (AG + TEA + ACh) относительно дилатации на АCh в отсутствие блокады (100%) у крыс в возрасте 4-ех (а) и 9-ти месяцев (b). По оси ординат: примененные блокаторы, по оси абсцисс: число АCh-индуцированных дилатаций при блокаде (%) относительно числа дилатаций в отсутствие блокады (100%). Число дилатированных участков у мелких сосудов, < 20 мкм – темная заливка, у средних сосудов, 20–40 мкм – белая заливка, у крупных сосудов, > 40 мкм – серая заливка. # – $p < 0.05$, * – $p < 0.01$, ** – $p < 0.001$.

приводила к снижению АХ-индуцированной дилатации мелких и средних артерий в среднем на 35%, а крупных пиальных артерий на 26% (рис. 1а). Это снижение соответствовало уменьшению числа дилатаций на фоне блокады только VK_{Ca} -каналов (U-критерий Манна–Уитни, рис. 1а).

Степень дилатации на АХ при блокировании VK_{Ca} -каналов у 4-месячных крыс снижалась на 28.7 ± 4.0 , 25.6 ± 3.4 и $40.2 \pm 2.2\%$ соответственно у мелких, средних и крупных артерий (рис. 2а). Применение L-NAME в качестве блокатора не вызывало достоверного изменения степени дилатации во всех группах артерий по сравнению с АХ-индуцированной дилатацией в отсутствие блокады. Совместная блокада VK_{Ca} -каналов и eNOS у молодых крыс приводила к снижению степени дилатации мелких артерий на $13.0 \pm 3.3\%$, средних – на $23.2 \pm 3.8\%$ и крупных – на $27.3 \pm 2.5\%$, тогда как блокада iNOS не изменяла степень дилатации у сосудов всех калибров. На фоне совместной блокады VK_{Ca} -каналов и iNOS снижение степени дилатации было примерно таким же, как на фоне блокады только VK_{Ca} -каналов: на 23.9 ± 4.4 , 26.4 ± 3.2 и $39.6 \pm 4.2\%$ у мелких, средних и крупных пиальных артерий соответственно (рис. 2а).

Апликация ТЕА у крыс в возрасте 9-ти месяцев вызывала констрикцию 52% мелких и средних артерий и 60% крупных. В группе средних и крупных артерий

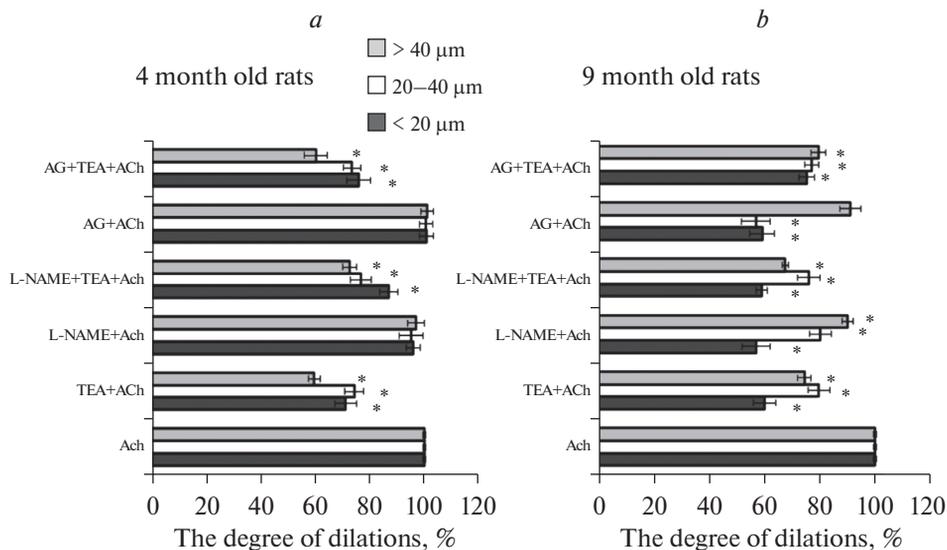


Рис. 2. Изменение степени индуцированных АХ дилатаций пиальных артерий разных калибров на фоне блокады VK_{Ca} -каналов (TEA + ACh), либо eNOS (L-NAME + ACh), либо одновременной блокады eNOS и VK_{Ca} -каналов (L-NAME + TEA + ACh), либо iNOS (AG + ACh), либо одновременной блокады iNOS и VK_{Ca} -каналов (AG + TEA + ACh) относительно дилатации на ACh в отсутствие блокады (100%) у крыс в возрасте 4-ех (a) и 9 месяцев (b). По оси ординат: примененные блокаторы, по оси абсцисс: степень АХ-индуцированных дилатаций при блокаде (%) относительно степени дилатации в отсутствие блокады (100%). Степень дилатации мелких сосудов, < 20 мкм – темная заливка, средних сосудов, 20–40 мкм – белая заливка, крупных сосудов, > 40 мкм – серая заливка. * – $p < 0.01$.

число констрикций достоверно превышало значения (43 и 46%), полученные на более молодых крысах ($p < 0.01$, $U = 45.1$, U-критерий Манна–Уитни). Число дилатаций на воздействие АХ на фоне предварительного введения ТЕА у крыс в возрасте 9-ти месяцев в группах мелких и средних артерий уменьшилось по сравнению с базовой дилатацией на АХ (на 37 и 49% соответственно). Число дилатированных участков крупных артерий на фоне блокады VK_{Ca} -каналов увеличилось до 139% (рис. 1b). Уменьшение числа и степени дилатаций в среднем на 40% на фоне блокады VK_{Ca} -каналов в группе мелких артерий у 9-месячных крыс соответствовало значениям аналогичных показателей у 4-месячных животных (U-критерий Манна–Уитни), а в группе средних артерий – уменьшение числа дилатаций (в среднем на 49%) было достоверно более значительным, чем у молодых крыс (на 34%, $p < 0.01$, $U = 1$, U-критерий Манна–Уитни). Степени дилатации средних и крупных артерий у 9- и 4-месячных крыс достоверно не различались (U-критерий Манна–Уитни).

На фоне блокады eNOS у 9-месячных крыс число АХ-индуцированных дилатаций мелких артерий не менялось по сравнению с реакцией в отсутствие блокады, у средних уменьшалось на 60% и существенно увеличивалось до 134% у крупных пиальных артерий (рис. 1b). Снижение числа дилатаций средних артерий до $40 \pm 3\%$ у 9-месячных крыс соответствовало аналогичному значению у 4-месячных животных. Число дилатаций крупных артерий у 9-месячных крыс было достоверно больше ($134 \pm 3\%$, $p < 0.01$, $U = 18$, U-критерий Манна–Уитни), степень дилатации средних и крупных артерий не отличалась от аналогичных значений у 4-месячных крыс (U-критерий Манна–Уитни).

Совместная блокада VK_{Ca} -каналов и eNOS у 9-месячных крыс приводила к подавлению АХ-индуцированной дилатации в группах мелких и средних артерий: соответственно на 28 и 30%, а в группе крупных артерий – к увеличению количества дилатаций на 34% (рис. 1*b*). При этом число дилатаций мелких артерий ($72 \pm 5\%$) было примерно таким же, как при блокаде только VK_{Ca} -каналов ($63 \pm 4\%$, U -критерий Манна–Уитни) (рис. 1*b*), но много меньше, чем при блокаде только eNOS ($98.0 \pm 1.1\%$, $p < 0.01$, $U = 11.22$, U -критерий Манна–Уитни). А в группе средних артерий уменьшение числа АХ-индуцированных дилататорных ответов на фоне совместной блокады eNOS и VK_{Ca} -каналов было достоверно меньше (на $30 \pm 1\%$), чем при применении каждого из блокаторов в отдельности (L-NAME на $60.0 \pm 1.1\%$, $p < 0.01$, $U = 27.54$, U -критерий Манна–Уитни, ТЭА на $49.0 \pm 1.1\%$, $p < 0.01$, $U = 19.2$, U -критерий Манна–Уитни). Число дилатаций крупных артерий при совместной блокаде eNOS и VK_{Ca} -каналов ($134 \pm 2.6\%$) соответствовало значениям, полученным при применении каждого из блокаторов в отдельности (ТЭА: 139.0 ± 1.5 , $p > 0.05$, $U = 8$, U -критерий Манна–Уитни; L-NAME: $134.0 \pm 1.1\%$, $p > 0.05$, $U = 18$, U -критерий Манна–Уитни).

У крыс в возрасте 9-ти месяцев на фоне блокады iNOS число дилатированных участков артерий всех калибров значительно снизилось во всех группах сосудов в среднем на 75% (рис. 1*b*). Совместная блокада iNOS и VK_{Ca} -каналов достоверно снижала число дилатаций мелких артерий на 33% ($p < 0.001$, $U = 16$, U -критерий Манна–Уитни) и средних артерий на 19% ($p < 0.001$, $U = 25$, U -критерий Манна–Уитни), достоверного снижения числа дилатаций крупных артерий не зарегистрировано (рис. 1*b*). В группе мелких сосудов это снижение (на $33.0 \pm 1.8\%$) соответствовало значениям, полученным при применении только блокатора VK_{Ca} -каналов (на $42.0 \pm 1.1\%$, $p < 0.01$, $U = 0$, U -критерий Манна–Уитни).

Степень АХ-индуцированной дилатации у 9-месячных крыс на фоне блокады VK_{Ca} -каналов снижалась у мелких артерий на $39.8 \pm 4.0\%$, средних – на $20.2 \pm 4.0\%$ и крупных – на $25.5 \pm 2.4\%$. Блокада eNOS приводила к снижению степени дилатации мелких артерий на $42.9 \pm 5.0\%$, средних – на $19.7 \pm 4.0\%$ и крупных – на $9.8 \pm 2.0\%$ (рис. 2*b*). На фоне совместной блокады VK_{Ca} -каналов и eNOS степень дилатации уменьшалась на $40.9 \pm 2.0\%$ у мелких, на $23.8 \pm 4.0\%$ – у средних и на $32.4 \pm 1.2\%$ – у крупных артерий. Степень АХ-индуцированной дилатации у 9-месячных крыс на фоне блокады iNOS у мелких и средних артерий снижалась в среднем на 40%, тогда как у крупных артерий снижение степени дилатации составило только $8.9 \pm 3.8\%$ (рис. 1*b*, 2*b*). Совместная блокада VK_{Ca} -каналов и iNOS приводила к снижению степени дилатации сосудов всех исследованных диаметров в среднем на 20% (рис. 2*b*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Большое количество экспериментов на животных и клинических исследований показали, что старение вызывает дисфункцию эндотелия (ЭД), приводящую к снижению вазодилатации. Наше исследование подтвердило предыдущие сообщения. У крыс в возрасте 9-ти месяцев число пиальных артерий, расширившихся в ответ на воздействие АХ, было достоверно меньше, чем у более молодых животных.

Известно, что воздействуя на сосудистую стенку, АХ вызывает активацию мускариновых рецепторов. Стимуляция последних приводит к увеличению цитозольного кальция, что является необходимым условием для высвобождения из эндотелия вазодилататоров, таких как NO, простагландины, эндотелиальный гиперполяризующий фактор и др. [17]. В качестве ключевого фактора развития ЭД при старении в настоящее время рассматривается уменьшение генерации NO эндотелием и нарушение его диффузии от эндотелия к ГМК, т.е. изменение уровня и

биодоступности NO [4]. В наших экспериментах у 4-месячных крыс на фоне блокады eNOS значительно снижалось число дилатаций во всех группах артерий без изменения степени дилатации (рис. 1a, 2a). Число АХ-индуцированных дилатаций мелких и средних артерий снизилось примерно вдвое по сравнению с реакцией в отсутствие блокады, наибольшее снижение числа дилатаций (на 86%) отмечено у крупных артерий. По сравнению с 4-месячными крысами у 9-месячных животных на фоне применения L-NAME в группе мелких сосудов уменьшалась только степень дилатации, без изменения числа дилатированных сосудов (рис. 1b, 2b). Снижение числа и степени дилатации средних артерий у 9-месячных крыс соответствовало аналогичным значениям у более молодых животных, тогда как число дилатаций крупных артерий на фоне блокады NO увеличивалось. Таким образом, нами были обнаружены возрастные изменения NO-опосредованной дилатации мелких и крупных пиальных артерий. Увеличение количества дилатаций крупных сосудов на фоне блокады eNOS у стареющих животных может быть связано с дисбалансом активных форм кислорода и оксида азота, характерном для стареющих особей [18]. Было показано, что дисбаланс в соотношении NO и супероксид-анионов из-за преобладания супероксид-анионов приводит к изменению реакционной способности сосудов [5]. Также, несмотря на то, что одной из основных причин нарушения эндотелий-зависимой вазодилатации считается снижение активности eNOS, в последнее время было установлено, что с возрастом в сосудистой ткани повышается экспрессия другого типа NO-синтаз – индуцибельной NO-синтазы [5]. Это предполагает, что iNOS может вносить вклад в вызванную старением эндотелиальную дисфункцию [5, 6, 18, 19].

В наших экспериментах применение селективного блокатора iNOS – аминогуанидина достоверно уменьшало число и степень АХ-индуцированной дилататорной реакции исследованных артериальных сосудов у 9-месячных крыс, тогда как у молодых крыс число и степень дилатаций сосудов достоверно не изменялись. Следовательно, можно утверждать, что у крыс в возрасте 4-ех месяцев индуцибельная NO-синтаза либо не образуется, либо ее активность крайне невысока, старение же сопровождается включением iNOS в процесс дилатации пиальных артерий всех калибров. Ингибирование iNOS уменьшает уровень вазоактивного NO в клетках, тем самым повышая сосудистый тонус и уменьшая эндотелий-зависимую дилатацию [20].

Значимую роль в передаче сигналов от продуцируемых эндотелием вазоактивных веществ к ГМК сосудов играют VK_{Ca} -каналы [21]. Применение ТЕА, являющегося блокатором калиевых каналов, преимущественно ингибирующим VK_{Ca} -каналы, у крыс в возрасте 4-ех месяцев в наших экспериментах приводило к констрикции в среднем 65% мелких и 45% средних и крупных пиальных артериальных сосудов. Число и амплитуда АХ-опосредованных дилататорных реакций сосудов, предварительно подвергнутых воздействию ТЕА, у 4-месячных крыс снижались во всех группах исследованных сосудов (рис. 1a, 2a). Эти данные показывают, что в физиологических условиях VK_{Ca} -каналы участвуют в поддержании базального тонуса и обеспечении вазодилататорных реакций пиальных артериальных сосудов на воздействие АХ. У 9-месячных крыс, по сравнению с более молодыми животными, число констрикций в ответ на применение блокатора VK_{Ca} -каналов увеличивалось в среднем на 50–60% только в группах средних и крупных пиальных артериальных сосудов. Число АХ-опосредованных дилатаций мелких и средних артерий на фоне блокады VK_{Ca} -каналов у крыс в возрасте 9-ти месяцев уменьшалось в среднем на 44% (рис. 1b). Уменьшение числа дилатаций в группе мелких артерий у 9-месячных крыс соответствовало значениям у 4-месячных животных, а в группе средних артерий было выражено сильнее, чем у молодых крыс. Следовательно, можно предпо-

ложить, что с возрастом вклад VK_{Ca} -каналов в АХ-индуцированный дилататорный ответ увеличивается только в группе средних пиальных артериальных сосудов.

Число расширившихся на воздействие АХ крупных артерий на фоне блокады VK_{Ca} -каналов возрастало (рис. 1*b*). Известно, что в АХ-индуцированной эндотелий-зависимой вазодилатации наряду с другими факторами немаловажную роль играет механизм эндотелиальной гиперполяризации. Гиперполяризация распространяется по щелевым контактам вдоль эндотелия и радиально по миоэндотелиальным соединениям, вызывая расслабление ГМК [22–24]. Для распространения гиперполяризации важно наличие активированных ионных каналов. Ведущую роль в этом процессе отводят чувствительным к электрическому напряжению K^+ -каналам (K_V) и VK_{Ca} -каналам [22, 25, 26]. Роль и функции VK_{Ca} -каналов весьма разнообразны [27]. Активация VK_{Ca} -каналов внутриклеточными, локальными и временными токами (“искрами”) Ca^{2+} оказывает гиперполяризующее влияние на мембранный потенциал ГМК, снижая активность потенциал-зависимых кальциевых каналов и ограничивая приток Ca^{2+} , тем самым способствуя релаксации ГМК и расширению сосудов. VK_{Ca} -каналы регулируются различными факторами, которые могут изменять условия их открытия, чувствительность к Ca^{2+} и экспрессию субъединиц. Вероятность открытия VK_{Ca} -каналов определяется как мембранным напряжением, так и внутриклеточной концентрацией Ca^{2+} и Mg^{2+} [28]. При старении пути передачи сигнала между эндотелиальными и ГМ клетками могут меняться. Экспериментально было показано, что с возрастом изменяются экспрессия и функции VK_{Ca} -каналов [28], и активация VK_{Ca} -каналов может снижать эффективность дилатации [22]. В литературе имеются сведения о том, что в покое у старых животных, по сравнению с молодыми особями, открыто больше калиевых каналов [25]. Это приводит к тому, что радиальные миоэндотелиальные переходы сохраняются [23] и местная дилатация осуществляется локальными токами Ca^{2+} [29], но продольное проведение электрических сигналов по эндотелию для координации расслабления ГМК, необходимого для дилатации сосуда, с возрастом нарушается [22, 24, 25, 30]. Электрические сигналы, проходя вдоль эндотелия, рассеиваются, область передачи сигнала уменьшается [25]. У старых особей происходит большая утечка и рассеяние сигнала в силу того, что у них открыто больше K^+ -каналов. Блокада K^+ -каналов у старых животных, предотвращая диссипацию электрического сигнала, может приводить к восстановлению и даже увеличению продольной электропроводности, и, следовательно, к увеличению дилатации [22, 25, 31]. Полученные нами данные указывают на нарушение способности эндотелия проводить электрические сигналы, связанное с изменением активности калиевых каналов, в частности VK_{Ca} -каналов, опосредующих дилатацию крупных пиальных артерий у 9-месячных крыс.

При совместной блокаде eNOS и VK_{Ca} -каналов у крыс в возрасте 4-х месяцев число АХ-индуцированных дилатаций и степень дилататорной реакции во всех группах артерий существенно снижались относительно реакции на АХ в отсутствие блокады (рис. 1*a*, 2*a*). При этом уменьшение дилатации у мелких артерий было примерно таким же, как при блокаде только VK_{Ca} -каналов, а у средних и крупных соответствовало значениям, полученным при блокаде только eNOS. Эти данные указывают на преимущественный вклад механизма активации NO в регуляцию АХ-индуцированной дилатации средних и крупных артерий у молодых крыс [6] и преобладание механизма активации VK_{Ca} -каналов в дилатации мелких артерий [32].

У 9-месячных крыс при совместной блокаде eNOS и VK_{Ca} -каналов зафиксировано снижение АХ-индуцированной дилатации в группах мелких и средних арте-

рий. При этом число дилатаций мелких артерий было примерно таким же, как при блокаде только VK_{Ca} -каналов (рис. 1*b*, 2*b*), но много меньше, чем при блокаде только eNOS, что указывает на существенный вклад VK_{Ca} -каналов в дилатацию мелких пиальных артерий у этих животных. А в группе средних артерий уменьшение числа АХ-индуцированных дилататорных ответов на фоне совместной блокады eNOS и VK_{Ca} -каналов было достоверно меньше, чем при применении каждого из блокаторов в отдельности. Число дилатаций крупных артерий при совместной блокаде eNOS и VK_{Ca} -каналов увеличивалось и соответствовало значениям, полученным при применении каждого из блокаторов в отдельности, что может свидетельствовать о равном участии обоих исследованных механизмов в АХ-индуцированной дилатации крупных пиальных артерий. Следовательно, на основании полученных данных можно утверждать, что старение сопровождается снижением роли NO-опосредованных механизмов в дилатации средних и крупных пиальных артерий.

На фоне одновременной блокады VK_{Ca} -каналов и iNOS у 4-месячных крыс число АХ-индуцированных дилатаций и их степень во всех группах пиальных артерий снижались примерно до значений, полученных на фоне блокады только VK_{Ca} -каналов (рис. 1*a*, 2*a*). У крыс в возрасте 9-ти месяцев совместная блокада iNOS и VK_{Ca} -каналов приводила к уменьшению числа АХ-индуцированных дилатаций только в группе мелких артерий (рис. 1*b*, 2*b*). Это снижение соответствовало значениям, полученным при применении только блокаторов VK_{Ca} -каналов. Уменьшение числа и степени дилатации средних сосудов проявлялось в меньшей степени, чем в случае применения каждого из блокаторов в отдельности. А в группе крупных сосудов совместное применение блокаторов iNOS и VK_{Ca} -каналов позволило исключить увеличение числа АХ-опосредованных дилатаций, наблюдаемое на фоне применения только блокатора VK_{Ca} -каналов. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что при старении NO, продуцируемый iNOS, наряду с NO, синтезируемым eNOS, играет роль в регуляции активности VK_{Ca} -каналов и в индуцированной АХ дилатации пиальных артериальных сосудов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнительное исследование вклада NO и VK_{Ca} -каналов в дилатацию пиальных артериальных сосудов показало, что у молодых крыс механизм, опосредованный NO, продуцируемым eNOS, играет значительную роль в регуляции АХ-индуцированной вазодилатации средних и крупных артерий. С уменьшением диаметра сосудов возрастает роль регуляторных процессов, связанных с активацией VK_{Ca} -каналов.

С возрастом снижается вклад eNOS-опосредованных механизмов в дилатацию средних и крупных артерий, но в процесс дилатации включается iNOS. Старение также сопровождается повышением вклада в поддержание базального тонуса и функциональной активности VK_{Ca} -каналов средних и крупных пиальных артерий, которая зависит от NO, продуцируемого iNOS.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Программы “Фундаментальные научные исследования для долгосрочного развития и обеспечения конкурентоспособности общества и государства” (47_110_ДРиОК, раздел 64.1).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликта интересов относительно публикации этой статьи не существует.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование экспериментов – О.П.Г.; проведение экспериментов, получение данных – В.Н.Ш., О.П.Г.; обработка результатов экспериментов – В.Н.Ш.; написание и редактирование статьи – В.Н.Ш., О.П.Г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhang DX, Gutterman DD (2011) Transient receptor potential channel activation and endothelium-dependent dilation in the systemic circulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 57(2): 133–139. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3181fd35d1>
2. Thakore P, Earley S (2019) Transient Receptor Potential Channels and Endothelial Cell Calcium Signaling. *Compr Physiol* 9(3): 1249–1277. <https://doi.org/10.1002/cphy.c180034>
3. Puzserova A, Plovska V, Balis P, Slezak P, Bernatova I (2014) Age-related alterations in endothelial function of femoral artery in young SHR and WKY rats. *Biomed Res Int* 2014(1): 658479. <https://doi.org/10.1155/2014/658479>
4. Sertedaki E, Veroutis D, Zagouri F, Galyfos G, Filis K, Papalambros A, Aggeli K, Tsioli P, Charalambous G, Zografos G, Sigala F (2020) Carotid Disease and Ageing: A Literature Review on the Pathogenesis of Vascular Senescence in Older Subjects. *Curr Gerontol Geriatr Res* 13; 2020: 8601762. <https://doi.org/10.1155/2020/8601762>
5. Tian J, Yan Z, Wu Y, Zhang SL, Wang K, Ma XR, Guo L, Wang J, Zuo L, Liu J, Quan L, Liu HR (2010) Inhibition of iNOS protects endothelial-dependent vasodilation in aged rats. *Acta Pharmacol Sin* 31(10): 1324–1328. <https://doi.org/10.1038/aps.2010.111>
6. Cau SB, Carneiro FS, Tostes RC (2012) Differential modulation of nitric oxide synthases in aging: therapeutic opportunities. *Front Physiol* 3: 218. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00218>
7. Tejero J, Shiva S, Gladwin MT (2019) Sources of Vascular Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species and Their Regulation. *Physiol Rev* 1: 99(1): 311–379. <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2017>
8. Feletou M, Kohler R, Vanhoutte PM (2012) Nitric oxide: Orchestrator of endothelium-dependent responses. *Ann Med* 44: 694–716. <https://doi.org/10.3109/07853890.2011.585658>
9. Yuill KH, McNeish AJ, Kansui Y, Garland CJ, Dora KA (2010) Nitric oxide suppresses cerebral vasomotion by sGC-independent effects on ryanodine receptors and voltage-gated calcium channels. *J Vasc Res* 47(2): 93–107. <https://doi.org/10.1159/000235964>
10. Tykocki NR, Boerman EM, Jackson WF (2017) Smooth muscle ion channels and regulation of vascular tone in resistance arteries and arterioles. *Compr Physiol* 7(2): 485–581. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160011>
11. Schmid J, Müller B, Heppeler D, Gaynullina D, Kassmann M, Gagov H, Mladenov M, Gollasch M, Schubert R (2018) The unexpected role of calcium-activated potassium channels: limitation of NO-induced arterial relaxation. *J Am Heart Assoc* 7(7): e007808. <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.007808>
12. Sadow SL, Senadheera S, Grayson TH, Welsh DG, Murphy TV (2012) Calcium and endothelium-mediated vasodilator signaling. *Adv Exp Med Biol* 740: 811–831.
13. Шуваева ВН, Горшкова ОП (2018) Модуляция тонуса церебральных артерий ацетилхолином у крыс разных линий. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 104(7): 807–816. [Shuvaeva VN, Gorshkova OP (2018) Modulation of cerebral artery tone by acetylcholine in rats of different strains. *Russ J Physiol* 104(7): 807–816. (In Russ)].
14. Wang J, Kim D (2018) Activation of voltage-dependent K⁽⁺⁾ channels strongly limits hypoxia-induced elevation of [Ca⁽²⁺⁾]_i in rat carotid body glomus cells. *J Physiol* 596(15): 3119–3136. <https://doi.org/10.1113/JP275275>
15. Kaneguchi A, Ozawa J, Minamimoto K, Yamaoka K (2020) Nitric oxide synthase inhibitor L-NG-nitroarginine methyl ester (L-NAME) attenuates remobilization-induced joint inflammation. *Nitric Oxide* 96: 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2020.01.003>
16. Gericke A, Goloborodko E, Sniatecki JJ, Steege A, Wojnowski L, Pfeiffer N (2013) Contribution of nitric oxide synthase isoforms to cholinergic vasodilation in murine retinal arterioles. *Exp Eye Res* 109: 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.01.012>

17. *Matz RL, Schott C, Stoclet JC, Andriantsitohaina R* (2000) Age-related endothelial dysfunction with respect to nitric oxide, endothelium-derived hyperpolarizing factor and cyclooxygenase products. *Physiol Res* 49(1): 11–18.
18. *Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L* (2018) Oxidative stress, aging and diseases. *Clin Interv Aging* 13: 757–772.
<https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>
19. *Васина ЛВ, Петрищев НН, Власов ТД* (2017) Эндотелиальная дисфункция и ее основные маркеры. Регионарное кровообращение и микроциркуляция 16(1): 4–15. [*Vasina LV, Petrishchev NN, Vlasov TD* (2017) Endothelial dysfunction and its main markers. *Regional blood circul and microcircul* 16(1): 4–15. (In Russ)].
<https://doi.org/10.24884/1682-6655-2017-16-1-4-15>
20. *Солодков АР, Ятковская НМ* (2013) Изменения эндотелий-зависимой дилатации и альфа-1 адренореактивности аорты крысы, вызванные ингибированием индуцибельной NO-синтазы после ограничения двигательной активности. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 99(7): 859–868. [*Solodkov AP, Iatskovskaia NM* (2013) Changes in endothelium-dependent dilation and alpha1-adrenoreactivity of rat aorta caused by inducible NO-synthase inhibition after motor activity restrictions. *Russ J Physiol* 99(7): 859–868. (In Russ)].
21. *Earley S* (2011) Endothelium-dependent cerebral artery dilation mediated by transient receptor potential and Ca²⁺-activated K⁺ channels. *J Cardiovasc Pharmacol* 57(2): 148–153.
<https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3181f580d9>
22. *Beleznai TZ, Yarova PL, Yuill KH, Dora KA* (2011) Smooth muscle Ca²⁺-activated and voltage-gated K⁺ channels modulate conducted dilation in rat isolated small mesenteric arteries. *Microcircul* 18: 487–500.
<https://doi.org/10.1111/j.1549-8719.2011.00109.x>
23. *de Wit C, Griffith TM* (2010) Connexins and gap junctions in the EDHF phenomenon and conducted vasomotor responses. *Pflugers Arch – Eur J Physiol* 459: 897–914.
<https://doi.org/10.1007/s00424-010-0830-4>
24. *Fehér A, Broskova Z, Bagi Z* (2014) Age-related impairment of conducted dilation in human coronary arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 306: H1595–H1601.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00179.2014>
25. *Behringer EJ, Shaw RL, Westcott EB, Socha MJ, Segal SS* (2013) Aging impairs electrical conduction along endothelium of resistance arteries through enhanced Ca²⁺-activated K⁺ channel activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33(8): 1892–1901.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301514>
26. *Longden TA, Dabertrand F, Koide M, Gonzales A, Tykocki NR, Brayden JE, Hill-Eubanks D, Nelson MT* (2017) Capillary K⁺-sensing initiates retrograde hyperpolarization to locally increase cerebral blood flow. *Nat Neurosci* 20(5): 717–726.
<https://doi.org/10.1038/nn.4533>
27. *Krishnamoorthy-Natarajan G, Koide M* (2016) BK Channels in the Vascular System. *Int Rev Neurobiol* 128: 401–438.
<https://doi.org/10.1016/bs.irn.2016.03.017>
28. *Carvalho-de-Souza JL, Varanda WA, Tostes RC, Chignalia AZ* (2013) BK Channels in Cardiovascular Diseases and Aging. *Aging Dis* 4(1): 38–49.
29. *Dabertrand F, Nelson MT, Brayden JE* (2012) Acidosis dilates brain parenchymal arterioles by conversion of calcium waves to sparks to activate BK channels. *Circ Res* 110(2): 285–294.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.258145>
30. *Behringer EJ, Hakim MA* (2019) Functional interaction among KCa and TRP channels for cardiovascular physiology: modern perspectives on aging and chronic disease. *Int J Mol Sci* 20(6): 1380.
<https://doi.org/10.3390/ijms20061380>
31. *Behringer EJ, Segal SS* (2012) Tuning electrical conduction along endothelial tubes of resistance arteries through Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Circ Res* 110: 1311–1321.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.262592>
32. *Ye Y, Gao M, Feng L, Feng B, Ma X* (2019) Isoliquiritigenin-induced vasodilation by activating large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in mouse mesenteric arteries. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 46(11): 1044–1052.
<https://doi.org/10.1111/1440-1681.13156>

Age Changes in the Contribution of NO and Potassium Channels to the Dilatation of the Pial Arterial Vessels in Rats

V. N. Shuvaeva^a, * and O. P. Gorshkova^a

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

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

Calcium-dependent high-conductance potassium channels (BK_{Ca}-channels) play an important role in signaling from NO produced by endothelium to vascular smooth muscle cells. The aim of this work was to study age-related changes in the contribution of NO and BK_{Ca}-channels to acetylcholine (ACh)-induced dilatation of pial arteries and to assess the role of eNOS- and iNOS-produced NO in Wistar rats at the age of 4 and 9 months. For this, the mechanisms of regulation of vascular tone were turned off using blockers, and the change in the diameter of the pial arteries to acetylcholine (ACh) against the background of blockade of BK_{Ca}-channels with tetraethylammonium (TEA), NO – L-NAME, iNOS – aminoguanidine (AG) was recorded by the method of intravital microphotography. The number of dilatations and the degree of dilatation of the pial arteries in response to ACh were determined. These data were compared with data obtained in the absence of blockade. The contribution of the mechanisms mediated by the activation of BK_{Ca}-channels, eNOS and iNOS, to the dilatation of 3 groups of pial arteries: small (less than 20 μm in diameter), medium (20–40 μm), and large (more than 40 μm) was evaluated. In young rats, NO produced by eNOS makes a significant contribution to the regulation of ACh-induced vasodilation of medium and large arteries, while in small arteries, activation of BK_{Ca}-channels predominates. With age, the contribution of eNOS-mediated mechanisms to the dilatation of the middle and large arteries decreases, but iNOS is included in the dilatation process, and the contribution to the maintenance of the basal tone and functional activity of the BK_{Ca}-channels of the middle and large pial arteries increases, which is dependent of NO produced iNOS.

Keywords: inducible and endothelial NO-synthase, calcium-sensitive high conductance potassium channels, vasodilation, pial arteries, aging