

СО Д Е Р Ж А Н И Е

Обзорные и проблемные статьи

Физиологические аспекты применения аналогов гонадотропин-рилизинг-гормона в акушерско-гинекологической клинике и эксперименте	1393
<i>И. В. Майбородин, А. К. Пичигина, В. И. Майбородина, Е. Л. Лушникова</i>	
Регуляция дыхания человека с помощью электрической стимуляции	1410
<i>Н. Д. Шандыбина, М. В. Куропатенко, Т. Р. Мошонкина</i>	

Экспериментальные статьи

Уровни инсулина и лептина в крови и структурах мозга крыс с диета-индуцированным ожирением и влияние на них различных фармакологических препаратов	1426
<i>К. В. Деркач, В. Н. Сорокоумов, А. А. Бахтюков, В. М. Бондарева, А. О. Шпаков</i>	
Влияние сложности задачи на величину синхронизации ЭЭГ активности бета-диапазона в сенсомоторной коре	1442
<i>М. В. Пронина, В. А. Пономарев, Ю. Д. Кропотов</i>	
Влияние доксорубина на реактивность брыжеечных артерий крыс Вистар	1453
<i>Г. Т. Иванова</i>	
Вклад IK_{Ca} -каналов в дилатацию пиальных артерий у молодых крыс после ишемии/реперфузии	1468
<i>В. Н. Шуваева, О. П. Горшкова</i>	
Взаимосвязь микробиома крови и содержания нейротрофинов при различных метаболических типах ожирения	1482
<i>И. М. Колесникова, А. М. Гапонов, С. А. Румянцев, М. С. Карбышев, Т. В. Григорьева, В. В. Макаров, С. М. Юдин, О. В. Борисенко, А. В. Шестопалов</i>	
Роль оксида азота (NO) в механизмах структурных изменений интерстиция почечной медуллы в условиях гипотиреоза у крыс с различным уровнем вазопрессина в крови	1497
<i>П. Д. Правикова, Л. Н. Иванова</i>	
Анализ орексинергической системы гипоталамуса у крыс с различными формами генетически обусловленной эпилепсии	1511
<i>И. Ю. Морина, А. Л. Михрина, Е. В. Михайлова, С. И. Ватаев, З. Р. Хисматуллина, И. В. Романова</i>	
Поведение крыс в тестах на тревожность при непродолжительном интраназальном введении однослойных углеродных нанотрубок в двух небольших дозах	1525
<i>Е. В. Лосева, Н. А. Логинова, Л. И. Руссу, М. В. Мезенцева</i>	

Методическая статья

Моделирование гиперкортикостеронемии у крыс с помощью осмотических насосов	1542
<i>М. В. Онуфриев, Ю. В. Моисеева, Н. В. Гуляева</i>	

CONTENTS

Reviews

- Physiological Aspects of the Application of Gonadotropin-Releasing Hormone Agonists
in Obstetric-Gynecological Clinic and Experiment
I. V. Maiborodin, A. K. Pichigina, V. I. Maiborodina, and E. L. Lushnikova 1393
- Regulation of Human Respiration by Electrical Stimulation
N. D. Shandybina, M. V. Kuropatenko, and T. R. Moshonkina 1410
-

Experimental Articles

- The Levels of Insulin and Leptin in the Blood and Brain Structures of Rats
with Diet-Induced Obesity and the Effect of Various Drugs on Them
*K. V. Derkach, V. N. Sorokoumov, A. A. Bakhtyukov,
V. M. Bondareva, and A. O. Shpakov* 1426
- Effect of Task Complexity on the Post-Movement Beta Synchronization
in the Sensorimotor Cortex
M. V. Pronina, V. A. Ponomarev, and Yu. D. Kropotov 1442
- Effect of Doxorubicin on the Reactivity of the Mesenteric Arteries of Wistar Rats
G. T. Ivanova 1453
- Contribution of IK_{Ca} -Channels to Dilatation of Pial Arteries in Young Rats
after Ischemia/Reperfusion
V. N. Shuvaeva and O. P. Gorshkova 1468
- Relationship between Blood Microbiome and Neurotrophins
in Different Metabolic Types of Obesity
*I. M. Kolesnikova, A. M. Gaponov, S. A. Roumiantsev,
M. S. Karbyshev, T. V. Grigoryeva, V. V. Makarov,
S. M. Yudin, O. V. Borisenko, and A. V. Shestopalov* 1482
- Role of Nitric Oxide (NO) in the Mechanisms of Structural Changes in the Renal
Medullary Interstitium under Conditions of Hypothyroidism in Rats
with Different Blood Vasopressin Levels
P. D. Pravikova and L. N. Ivanova 1497
- Analysis of the Orexinergic System of the Hypothalamus in Rats with Various Forms
of Genetically Due to Epilepsy
*I. Yu. Morina, A. L. Mikhryna, E. V. Mikhailova, S. I. Vataev,
Z. R. Hismatullina, and I. V. Romanova* 1511
- Behavior of Rats in Tests for Anxiety after a Short Intranasal Injection
of Single-Walled Carbon Nanotubes in Two Small Doses
E. V. Loseva, N. A. Loginova, L. I. Russu, and M. V. Mezentseva 1525
-

Methodical Articles

- Modeling Hypercorticosteronemia in Rats Using Osmotic Pumps
M. V. Onufriev, Yu. V. Moiseeva, and N. V. Gulyaeva 1542
-
-

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ АНАЛОГОВ
ГОНАДОТРОПИН-РЕЛИЗИНГ-ГОРМОНА
В АКУШЕРСКО-ГИНЕКОЛОГИЧЕСКОЙ КЛИНИКЕ И ЭКСПЕРИМЕНТЕ

© 2022 г. И. В. Майбородин^{1, 2, *}, А. К. Пичигина¹,
В. И. Майбородина¹, Е. Л. Лушникова¹

¹*Институт молекулярной патологии и патоморфологии, Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины Министерства науки и высшего образования РФ, Новосибирск, Россия*

²*Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия*

*E-mail: imai@mail.ru

Поступила в редакцию 04.06.2022 г.

После доработки 15.09.2022 г.

Принята к публикации 16.09.2022 г.

Проведен поиск литературы для изучения работ, посвященных результатам применения агонистов гонадотропин-релизинг-гормона (ГнРГ) в акушерско-гинекологической клинике и эксперименте. Рассмотрены физиологические аспекты влияния ГнРГ на яичники и матку как в норме, так и при некоторых патологических состояниях. Сделано заключение, что агонисты ГнРГ при длительном применении подавляют овуляцию и вызывают состояние, сходное с менопаузой. Инфузия агониста ГнРГ является простым методом подавления продукции лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов, а также развития фолликулов. При этом в яичниках подавляется функциональная активность гранулезных клеток через супрессию синтеза ДНК и индукцию апоптоза с одновременной стимуляцией дифференцировки клеток в преовуляторных фолликулах. Такое состояние является обратимым, сохраняется фертильность. За счет быстрой инволюции матки после применения аналогов ГнРГ возможны задержка или даже остановка прогрессирования миомы с исчезновением ее симптомов. На фоне гипотрофии матки эндометрий соответствует атрофическому или покоящемуся пролиферативному типу. Вместе с этим есть прямо противоположные данные о том, что длительное использование ГнРГ способствует гиперплазии эндометрия и эндометриу. Препараты ГнРГ успешно применяют для лечения доброкачественных и онкологических процессов в яичниках и матке, а также для воздействия на метастазы. Но существуют и исследования, показывающие, что прямой эффект ГнРГ на опухоли мало выражен. Высказываются опасения, что гонадотропины могут даже стимулировать развитие рака яичников, воздействуя на определенные рецепторы. Большинство ученых сообщает о хорошей протективной способности агонистов ГнРГ в условиях химиотерапии, но также имеются данные о слабой эффективности или вообще отсутствии защитного действия препаратов данной группы. В любом случае противоречивость публикаций по каждому из аспектов эффекта ГнРГ свидетельствует о его малой изученности, целесообразности продолжения не только прикладных, но и фундаментальных исследований.

Ключевые слова: агонисты гонадотропин-релизинг-гормона, яичники, матка, фолликулы, репродукция, пролиферация, дифференцировка

DOI: 10.31857/S0869813922110061

Гонадотропин-рилизинг-гормон (ГнРГ) – гипоталамический декапептид, опосредующий синтез и высвобождение гипофизарного лютеинизирующего гормона (ЛГ). Подобные полипептиды действуют, главным образом, на переднюю часть гипофиза, вызывая кратковременное быстрое увеличение выброса ЛГ, пролактина, соматотропного и фолликулостимулирующего (ФСГ) гормонов. К концу 1980-х годов суперактивные аналоги ГнРГ и соответствующие депо-препараты стали широко доступными и использовались для медицинской гипофизэктомии (подавления секреции ЛГ и ФСГ), что приводило к подавлению функции половых желез у обоих полов. Эта стратегия обратимой медицинской кастрации была успешно внедрена в лечение различных заболеваний, зависящих от половых гормонов, включая рак предстательной железы и менопаузальный рак молочной железы, а также эндометриоз и миому матки. Отмена эстрогенов из-за обратимой медикаментозной кастрации с помощью агонистов ГнРГ также применялась в качестве консервативного лечения раннего рака эндометрия и его предраковых состояний у молодых женщин, желающих сохранить свою фертильность [1].

Однако когда агонисты ГнРГ вводят длительно в высоких супрафизиологических дозах, становится очевидным парадоксальный эффект чрезмерной стимуляции гипофиза. Метаболические механизмы включают в себя десенсибилизацию гипофиза к ГнРГ, подавление рецепторов ГнРГ в клетках-мишенях, резкое падение объема выделяемого ЛГ, нарушение механизмов физиологической обратной связи, при этом снижается высвобождение гонадотропина. У растущих самок крыс (30–40 сут) при использовании аналогов ГнРГ были обнаружены задержка открытия влагалища и ингибирование изменений массы яичников и матки. Эти эффекты используются для разработки методов контрацепции, лечения эндометриоза, преждевременного полового созревания и во время подготовки к процедуре экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Агонисты ГнРГ достоверно вызывают ановуляцию и открывают перспективу обратимой псевдоменопаузы, по существу, лишенной побочных эффектов. Аналоги ГнРГ оказывают существенное влияние на лечение различных эстрогензависимых гинекологических заболеваний (рис. 1, 2) [2–11].

Кроме того, аналоги ГнРГ применяют для лечения широкого спектра онкологических процессов, связанных с половыми гормонами, включая распространенный рак яичников (рис. 1). Причем, эффект подавления яичников в процессе лечения онкологических и гинекологических заболеваний агонистами ГнРГ является обратимым [2–6].

У детей с преждевременным половым созреванием лейпрорелин (ежемесячные внутримышечные или подкожные инъекции лейпрорелина длительного действия с 3.75 до 15 мг) снижает среднюю скорость роста и выраженность признаков полового созревания, а также увеличивает прогнозируемый рост взрослого по сравнению с исходными измерениями. Хотя влияние на конечный рост взрослого человека предсказывается на основе имеющихся данных и требует подтверждения в долгосрочных последующих исследованиях, отсутствие эффективных альтернатив делает аналоги ГнРГ терапией первой линии для детей с этим редким заболеванием [3].

Кроме того, агонист ГнРГ (MR-409) в дозе 5 или 10 мкг/мышь/день при подкожном введении значительно снижает летальность, тяжесть ишемического инсульта и выраженность атрофии гиппокампа, а также улучшает восстановление неврологических функций у животных при транзиторной окклюзии средней мозговой артерии в эксперименте. Препарат может стимулировать эндогенный нейрогенез и улучшать потерю нейропластичности при экспериментальном инсульте. MR-409 также усиливает пролиферацию и ингибирует апоптоз нейтральных стволовых клеток в условиях ограничения – реперфузии кислорода и глюкозы [12]. Агонисты ГнРГ также оказывают благотворное воздействие на животных с моде-

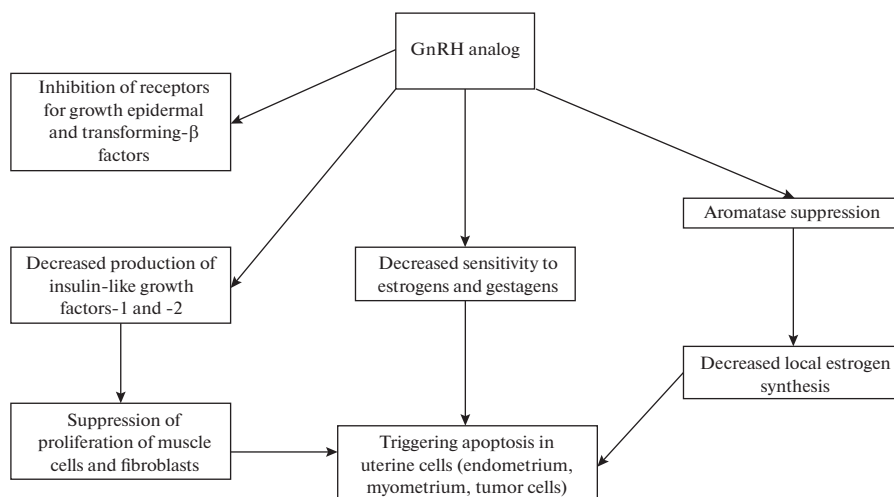


Рис. 1. Основные эффекты аналогов ГнРГ в акушерско-гинекологической клинике и эксперименте.

лированием ишемической и неишемической сердечной недостаточности, в том числе при хронической болезни почек [13].

Очень интересны появившиеся в последнее время сообщения, что и агонисты, и антагонисты ГнРГ обладают выраженным противовоспалительным эффектом. Препараты из группы антагонистов подавляют образование инфильтратов в легких крыс при пневмонии. Результаты исследований *ex vivo* показали, что аналоги и антагонисты ГнРГ ингибируют продукцию провоспалительных и окислительных факторов, индуцированную липополисахаридом, в изолированных образцах толстой кишки мыши. *In vivo* обе группы препаратов также способны снижать реакцию на ноцицептивный стимул в тесте с горячей пластиной, отмечено снижение чувствительности к острым и стойким воспалительным стимулам у самцов мышей в формалиновом тесте и модели колита, вызванного декстрансульфатом натрия: ослабевают клинические симптомы, признаки гистопатологического повреждения и присутствие провоспалительных и окислительных маркеров в образцах толстой кишки. Причем антагонисты ГнРГ обладают более выраженными противовоспалительными свойствами [14, 15].

Активация рецептора ГнРГ, который обнаружен в ганглиозных клетках сетчатки взрослых крыс, может быть связана с сохранением этих клеточных элементов при воспалении. После повреждения зрительного нерва подкожное введение агониста ГнРГ MR-409 или антагониста MIA-602 способствовало выживанию ганглиозных клеток сетчатки, что может быть связано с аддитивным эффектом на активацию макрофагов [16].

Для обобщения результатов исследований влияния ГнРГ на органы репродуктивной системы у женщин и самок экспериментальных животных проведен поиск литературы в базах данных “PubMed” и “PubMed Health” (www.ncbi.nlm.nih.gov). В обзор не включены данные по клиническому и экспериментальному лечению эндометриоза, применению ГнРГ для ЭКО и повышения вероятности наступления беременности. Также не учитывали результаты работ по искусственному осеменению в ветеринарии, повышению фертильности и синхронизация овуляторного цикла.

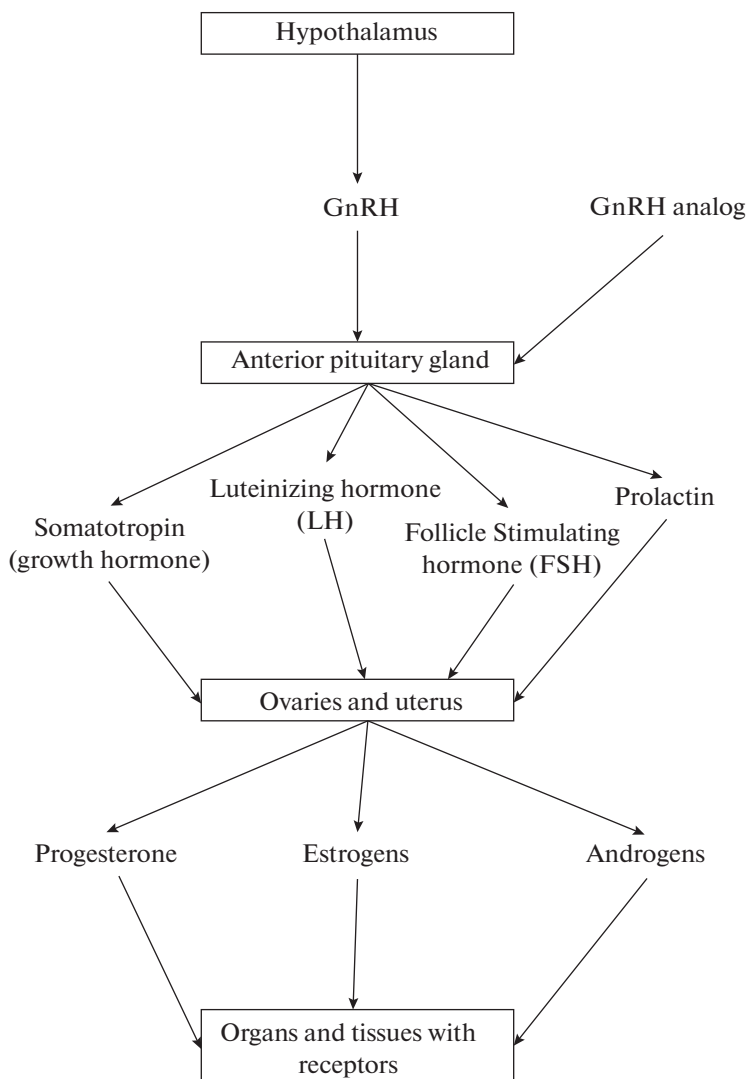


Рис. 2. Действие аналогов ГнРГ на органы и ткани репродуктивной системы женщин и самок животных.

ВЛИЯНИЕ АГОНИСТОВ ГОНАДОТРОПИН-РИЛИЗИНГ-ГОРМОНА НА ЯИЧНИКИ ЖЕНЩИН И САМОК ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Применение агониста ГнРГ бусерелина для индукции состояния обратимого гипогонадотрофизма перед введением экзогенных гонадотропинов является многообещающей стратегией в лечении бесплодия, связанного с синдромом поликистозных яичников и другими состояниями с лежащей в основе дисфункцией этих органов; такой подход также явно повышает эффективность программ ЭКО. Первоначальные исследования предполагают потенциальную полезность ГнРГ в качестве женского контрацептива при периодическом применении в сочетании с прогестагеном. Бусерелин представляет собой первую линию лечения преждевременного полового созревания [2].

Высокоактивный аналог ГнРГ (НОЕ766) вводили здоровым женщинам в двойном слепом исследовании. Каждая женщина получала с 1-го по 14-й день менструального цикла, согласно плану рандомизации, 10 мкг препарата или плацебо. Овуляция была подавлена в течение по крайней мере двух нед. у всех субъектов, получавших ГнРГ. Первоначально очень выраженное высвобождение ЛГ, измеренное через 4 ч после инъекции, уменьшилось в течение 3 дней примерно на 50% и оставалось на этом уровне в течение оставшейся части эксперимента, в то время как первоначально высокий ответ на ФСГ был практически полностью отменен во время дальнейшего лечения. У 3 из 5 женщин, получавших аналог ГнРГ, концентрация эстрадиола в сыворотке была сильно снижена, у остальных 2 — незначительно. В течение 5 дней после прекращения лечения гипофиз восстановил способность нормально реагировать на ГнРГ. Авторы делают вывод о нарушении созревания фолликулов в результате изменения физиологической секреции гонадотропина под действием НОЕ766 [17]. Подобные результаты выявлены и при введении ГнРГ животным [15].

Кисспептины (kisspeptins) являются наиболее мощными нейротрансмиттерами, стимулирующими высвобождение ГнРГ. У мелких жвачных животных кисспептины или их аналоги индуцировали всплеск выброса ЛГ с последующей овуляцией, в то время как у лошадей этот трансмисмиттер только увеличивал уровни ЛГ в плазме, но не индуцировал овуляцию [19].

Яванские макаки (*Macaca fascicularis*) были разделены на группы в соответствии с проводимой процедурой стимуляции яичников (агонист или антагонист ГнРГ). В обеих группах рост и созревание ооцитов индуцировали введением ФСГ и хорионического гонадотропина человека. Получены данные, что процедура, включающая антагонист ГнРГ, имеет некоторые преимущества для указанного вида животных по сравнению с контролируемой стимуляцией на фоне применения аналога ГнРГ [20].

Изучали прямое действие агониста ГнРГ бусерелина и антагониста ГнРГ цетрореликса на пролиферацию и дифференцировку клеток в фолликулах яичника крыс. Преовуляторные фолликулы получали от незрелых крыс и инкубировали *in vitro* в присутствии или отсутствии хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) (10 МЕ/мл), бусерелина (10^{-9} – 10^{-6} М) или цетрореликса (10^{-9} – 10^{-6} М) в течение 12 ч. Бусерелин индуцировал мейотическое созревание яйцеклеток в фолликулах в зависимости от дозы, а также значительно стимулировал выработку простагландина E_2 (ПГЕ₂) и прогестерона фолликулами, но не выработку эстрадиола. Гранулезные клетки получали из преовуляторных фолликулов и культивировали в течение 5 дней. И бусерелин, и цетрореликс ингибировали пролиферацию таких клеток в зависимости от дозы в диапазоне 10^{-10} – 10^{-5} М, причем цетрореликс индуцировал большее ингибирование митотической активности, чем бусерелин. Электрофоретический анализ геномной ДНК, выделенной из гранулезных клеток, обработанных аналогом ГнРГ в концентрации 10^{-6} М, выявил фрагменты ДНК олигонуклеосомальной длины, характерные для апоптоза. Результаты демонстрируют, что как агонист, так и антагонист ГнРГ ингибируют пролиферацию клеток гранулезы посредством апоптоза, причем агонист ГнРГ, наряду с этим, стимулирует дифференцировку клеток в преовуляторном фолликуле [21].

Были проведены два эксперимента на взрослых самках крыс для изучения влияния длительного применения агонистов ГнРГ на количество и распределение по размеру фолликулов яичника. Введение продолжалось в течение 52 дней в первом эксперименте и в течение 229 дней во втором. Каждый шестнадцатый срез одного яичника каждой крысы исследовали на световом микроскопе, совмещенном с компьютерной системой анализа изображений BioQuant. Затем контрольных животных и крыс после воздействия ГнРГ спаривали с известными самцами-селек-

ционерами и оценивали количество и нормальность потомства. У крыс, получавших агонист ГнРГ, общее количество фолликулов, количество и процент фолликулов диаметром менее 35 мкм был значительно выше, а количество и процент фолликулов диаметром больше 50 мкм – значительно ниже, чем в контрольной группе. Количество забеременевших крыс и крысят в помете существенно не отличалось между опытными и контрольными животными. Агонисты ГнРГ ингибируют физиологический процесс рекрутирования и потери фолликулов, но фертильность сохраняется даже после длительного введения агонистов ГнРГ [22].

ГнРГ экспрессируется в яичнике и модулирует дифференцирование его клеток. Гранулезные клетки получали от незрелых крыс и культивировали в среде DMEM/F12, содержащей комбинации ФСГ, эстрадиола и трансформирующего фактора роста-бета (TGF-бета) как в присутствии, так и без ГнРГ. Аналог ГнРГ, лейпролид, в концентрации до 5×10^{-11} М вызывал дозозависимое ингибирование включения ^3H -тимидина в клетки, культивируемые в присутствии ФСГ (20 нг/мл) и TGF-бета (2.5 нг/мл). Аналогичным образом полное ингибирование гормонально-стимулированного синтеза ДНК наблюдали с другим аналогом ГнРГ (бусерелин, $1.58 \pm 0.22 \times 10^{-10}$ М) и нативным ГнРГ ($1.4 \pm 0.3 \times 10^{-6}$ М). Конкурентный антагонист ГнРГ (антид) использовали для нейтрализации эффектов агонистов ГнРГ. Антид в дозе 10^{-8} М может предотвращать ингибирование синтеза ДНК, вызванное 10^{-7} М лейпролида. То есть ГнРГ может играть роль в регуляции пролиферации гранулезных клеток крысы во время развития фолликула [23].

ГнРГ модулирует дифференцирование клеток яичников различных видов животных. Было изучено прямое влияние агониста ГнРГ на частоту апоптоза и активность стероидогенеза в клетках гранулезы яичников свиньи и человека. Клетки были получены от 6-месячных свиной, а также от женщин после ЭКО и культивированы в минимальной необходимой среде (MEM) с добавлением 5% эмбриональной бычьей сыворотки в течение 24 ч. ГнРГ бусерелин добавляли в MEM в различных концентрациях (0.5; 50; 500 пг/мл и 5 нг/мл). Ядра клеток гранулезы были исследованы методами флуоресцентной микроскопии после окрашивания Hoechst 33258. ГнРГ непосредственно увеличивал частоту апоптоза в клетках гранулезного типа. Концентрация ГнРГ при его клиническом использовании оказалась намного выше, чем концентрация, вызывающая апоптоз в культивируемых клетках гранулезы [24].

Проанализировано влияние аналога ГнРГ (10^{-9} М) на пролиферацию, апоптоз и дифференцирование культивируемых гранулезных клеток свиньи, полученных из фолликулов яичника на разных стадиях развития. Число клеточных элементов гранулезы, культивируемых в присутствии агониста ГнРГ и положительных по ядерному антигену пролиферирующих клеток, было ниже по сравнению с клетками, выращиваемыми в отсутствие препарата. Однако частота апоптоза была выше, а секреция эстрадиола и прогестерона культивируемыми клеточными элементами – ниже в присутствии агониста ГнРГ. Ингибирующее действие препарата на пролиферацию было заметно в культивируемых клетках гранулезы только из малых и средних, но не из крупных фолликулов. Напротив, антипролиферативный эффект агониста ГнРГ на секрецию эстрадиола и прогестерона был отмечен в культивируемых клетках, полученных только из крупных фолликулов. Однако стимулирующее действие агониста ГнРГ на апоптоз было одинаковым, независимо от стадий развития фолликулов. Эти результаты демонстрируют, что агонист ГнРГ оказывает различные воздействия на клетки гранулезы в течение роста фолликулов. Препарат подавляет пролиферацию клеточных элементов в незрелых фолликулах и стероидогенез – в зрелых, параллельно усиливается апоптоз гранулезных клеток независимо от стадий фолликулогенеза [25].

Овуляция не происходила ни в одном перфузированном препарате яичников кроликов, обработанных бусерелином или ацетатом лейпролида (10^2 – 10^4 нг/мл), в отсутствие гонадотропина. Агонисты ГнРГ обуславливают возобновление мейоза в фолликулярных ооцитах дозозависимым образом. Кроме того, добавление ГнРГ к перфузату значительно увеличивало процент фолликулярных ооцитов, которые демонстрировали признаки дегенерации по сравнению с интактным контролем. Продуцирование ПГЕ₂ и простагландина F₂-альфа перфузированными яичниками кролика было значительно стимулировано применением ГнРГ, тогда как не было отмечено увеличения выработки прогестерона или эстрадиола. ГнРГ действует непосредственно в яичнике кролика, вызывая мейотическое созревание в фолликулярных ооцитах, одновременно усиливая их дегенерацию [26].

Преовуляторные фолликулы кролика культивировали *in vitro* с ХГЧ (10^2 нг/мл) или без него, с бусерелином (10^2 – 10^5 нг/мл) или лейпролидом (10^2 – 10^5 нг/мл) в течение 14 ч. Агонисты ГнРГ индуцировали возобновление мейоза в ооцитах внутри фолликулов в зависимости от дозы. Процент ооцитов, достигших разрушения зародышевого пузырька после обработки 10^5 нг/мл бусерелина ($87.9 \pm 6.3\%$) или 10^5 нг/мл лейпролида ($86.0 \pm 4.1\%$), существенно не отличался от контроля ($87.3 \pm 3.8\%$) после введения ХГЧ. Зрелые ооциты первоначально были обнаружены в течение 2 ч после воздействия агонистом ГнРГ. Агонисты ГнРГ значительно стимулировали продуцирование как ПГЕ₂, так и F₂-альфа преовуляторными фолликулами ($p < 0.01$), но уровни секретируемого простагноида существенно не различались при воздействии различными концентрациями агонистов ГнРГ. Мейотическое созревание фолликулярных ооцитов после воздействия агонистами ГнРГ началось на 2 ч раньше, чем продуцирование простагландина, было дозозависимым, но при этом увеличивалась дегенерация ооцитов. Выработка простагландинов, стимулируемая агонистами ГнРГ, может быть значительно снижена индометацином. Однако зрелость ооцитов в присутствии агониста ГнРГ вместе с индометацином существенно не отличалась от действия одного агониста ГнРГ. Одновременное добавление 10^4 нг/мл антагониста ГнРГ блокировало стимулирующее действие агониста ГнРГ на созревание ооцитов и выработку простагландинов зрелыми фолликулами, а также обращало вспять скорость дегенерации ооцитов. Частота нормального оплодотворения и раннего эмбрионального развития была значительно снижена в ооцитах, созревших с помощью ГнРГ, по сравнению с ооцитами, созревшими с помощью ХГЧ. То есть аналоги-агонисты ГнРГ индуцируют возобновление мейоза в ооцитах фолликулов в яичниках кроликов по механизму, отличному от стимуляции простагландинами. Ооциты, созревшие *in vitro* с помощью ГнРГ, не обязательно являются цитоплазматически зрелыми [27].

13 кроликам подкожно вводили имплантат с длительным высвобождением агониста ГнРГ деслорелина (4.7 мг) для изучения влияния на функцию яичника. Семи животным до наступления половой зрелости (группа 1) были внедрены имплантаты с медленным высвобождением ГнРГ в течение 273 дней. После подтверждения возобновления функции яичников источники препарата повторно имплантировали в возрасте 430 дней. Шести взрослым кроликам (>177 дней; группа 2) внедряли имплантаты деслорелина на срок в 273 дня. Функцию яичников до, во время и после лечения имплантатом оценивали посредством измерения уровня прогестерона в сыворотке периферической крови спустя 10 дней после контрольной инъекции короткодействующего ГнРГ (0.8 мкг бусерелина внутримышечно). Животных в 1-й группе подвергали овариогистерэктомии во время второго курса введения препарата, яичники исследовали гистологическими методами. В яичниках присутствовали неатретические и атретические фолликулы на разных стадиях развития, но без активного желтого тела. Овариогистерэктомию животным 2-й группы проводили через

2–12 мес. после удаления имплантата. Их яичники содержали фолликулы на разных стадиях развития и белые тела. Следовательно, обратимое подавление функций яичников может быть достигнуто у самок кроликов посредством применения имплантатов с медленным высвобождением ГнРГ, вводимых до или после полового созревания [28].

Таким образом, агонисты ГнРГ при длительном применении подавляют овуляцию и вызывают состояние, сходное с менопаузой, у женщин и самок животных. Инфузия агонистов ГнРГ является простым методом подавления продукции ЛГ и ФСГ, а также развития фолликулов. В яичниках ингибируются клетки гранулезы через супрессию синтеза ДНК и индукцию апоптоза с одновременной стимуляцией дифференцировки клеток в преовуляторных фолликулах (рис. 1). Такое состояние является обратимым, сохраняется фертильность, после прекращения лечения гипофиз очень быстро восстанавливает способность реагировать на этот релизинг.

АГОНИСТЫ ГОНАДОТРОПИН-РИЛИЗИНГ-ГОРМОНА И МАТКА В КЛИНИКЕ И ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Как уже упоминалось, аналоги ГнРГ используются для лечения широкого спектра заболеваний, обусловленных половыми гормонами, включая эндометриоз и преждевременное половое созревание [3]. При продолжительном применении они могут вызывать гипопитарную десенсибилизацию и/или снижение регуляции, что приводит к подавлению циркулирующих уровней гонадотропинов и половых гормонов.

У пациентов с миомой матки введение лейпрорелина или гозерелина уменьшает объем матки и симптомы, связанные с заболеванием, но, как и в случае других аналогов ГнРГ, эти эффекты исчезают после прекращения инъекций. В результате терапии у всех пациентов было достигнуто состояние, похожее на менопаузу, о чем свидетельствовали приливы, депрессия, сухость влагалища, атрофия эндометрия по гистероскопическим данным, соответствующие изменения гормональных показателей (ФСГ, ЛГ, эстрадиол). Препараты аналогов ГнРГ могут быть полезны для сокращения объема хирургической интервенции за счет уменьшения размеров миомы матки, хотя это не исключает полностью саму операцию [2, 3]. Лейпрорелин является эффективной альтернативой другим методам лечения женщин с эндометриозом, но рекомендуемая продолжительность его применения в данной клинической ситуации ограничена 6 месяцами, поскольку он снижает минеральную плотность костной ткани [3].

Самкам крыс линии Вистар при эструсе или диэструсе (по данным вагинальной цитологии) ежедневно подкожно вводили 20 мг ацетата бусерелина в течение 4, 8 или 12 дней. Крыс выводили из эксперимента через 24 ч или 5 дней после окончания курса. Контрольная группа животных получала растворитель препарата в течение 12 дней. Прогрессирующая гипотрофия тканей матки возникла во время наблюдения и сопровождалась эстрогенной гиперактивностью в течение 5 дней после окончания эксперимента. Цитология влагалища и гистология эндометрия выявили интенсивно вакуолизированную слизистую оболочку и железистый эпителий, границы кист и строма эндометрия были плотно инфильтрированы эозинофилами. Бусерелин, по-видимому, вызывает прогрессирующую блокаду секреции гонадотропина и важный эффект отдачи, причем усиленное высвобождение эстрогена проявляется уже в первом эстральном цикле после окончания введения [29].

В дополнение к внутриматочной антибиотикотерапии 30 коровам с послеродовым эндометритом вводили 20 мкг аналога ГнРГ бусерелина между 10 и 12 днями после родов, а затем 10 дней спустя, 500 мкг аналога простагландина F₂-альфа, клопростенола. 40 контрольных животных лечили только введением антибиотиков в матку. Инволюция матки улучшилась после гормонального лечения: на 42-й день

после родов завершение инволюции матки было обнаружено у 93.3% животных, получавших гормоны, и у 82.5% коров, получавших только антибиотик ($p \leq 0.05$). Клиническое выздоровление составило 96.6% в экспериментальной и 82.5% в контрольной группе ($p \leq 0.05$). Показатели первой беременности были значительно лучше у получавших гормональное лечение, чем у контрольных животных (51.7% против 36.4%, $p \leq 0.05$). Однако значения общих показателей беременности и индекса осеменения не были значительно улучшены после применения ГнРГ и простагландина F₂-альфа. Сделано заключение, что последовательное применение гормональных препаратов у коров с послеродовым эндометритом положительно влияло на функцию яичников и инволюцию матки, что привело к улучшению показателей фертильности [30].

8 макакам вводили ежедневно по 5 или 20 мкг аналога ГнРГ в течение, приблизительно, одного года для предотвращения овуляции. В последний день лечения (7 обезьян) или во время середины лютеиновой фазы первого цикла после лечения (1 животное) была выполнена лапаротомия. Размер матки был меньше ($p < 0.01$), чем в контроле с нормальным циклом ($n = 6$). Клиновидный фрагмент на полную толщину передней стенки матки иссекали и исследовали гистологически. У 5 обезьян, получавших агонист, эндометрий соответствовал атрофическому или покоящемуся пролиферативному типу, но у 2 животных варьировал от раннего пролиферативного до выраженного секреторного типов. Все изменения оказались только доброкачественными. У животного, изученного в лютеиновой фазе после прекращения лечения, был обнаружен нормальный секреторный эндометрий. Яичники от 2 животных после воздействия агонистом ГнРГ также были исследованы гистологическими методами, и было обнаружено, что они состоят из фолликулов на разных стадиях созревания. Наличие эндометриальной активности у 2 из 8 обезьян, получавших агонист ГнРГ, подчеркивает необходимость тщательной оценки эндометрия во время терапии, включающей повторное введение агонистов ГнРГ у пациентов женского пола [31].

Влияние антагонистов ГнРГ, используемых в протоколах ЭКО, на ремоделирование ткани эндометрия, имплантацию эмбриона и программирование ранней беременности до сих пор недостаточно изучено, что вызывает определенное беспокойство за течение беременности и исходы у младенцев после лечения антагонистом ГнРГ для ЭКО [32]. Недавно установлено, что ГнРГ и сплайс-вариант 1-го рецептора ГнРГ экспрессируются в децидуальных стромальных клетках человека, выделенных из децидуальных тканей беременных женщин на ранних сроках, перенесших хирургический аборт [33]. Показано, что агонист ГнРГ-II способствует клеточной подвижности стромальных клеток децидуального эндометрия человека посредством рецептора ГнРГ-R и фосфорилирования внеклеточной регулируемой сигналом протеинкиназы 1/2 и JNK-зависимой активации MMP-2 и MMP, что оказывает сильное влияние на имплантацию эмбриона [32].

В результате длительного, до 2 лет несколькими циклами, введения ГнРГ у 5 из 7 кроликов наблюдали гиперплазию эндометрия и эндометрит. Гистопатологическое исследование 4 животных, кастрированных во время индуцированной псевдобеременности, не выявило признаков изменений матки. У двух животных, перенесших овариогистерэктомию, через 12 мес. после удаления имплантата диагностирован эндометрит. Развитие возрастной патологии матки невозможно предотвратить подавлением функций яичников посредством длительного использования препаратов ГнРГ [28].

ГнРГ экспрессируется в децидуальных стромальных клетках человека, выделенных из децидуальных тканей беременных женщин, перенесших хирургический аборт на ранних сроках. Обработка клеточных элементов стромы антагонистом

ГнРГ (JMR-132) индуцировала апоптоз с увеличением активности каспаз-3 и -9 и снижала жизнеспособность клеток в зависимости от времени и дозы [32].

За счет быстрой инволюции матки после применения аналогов ГнРГ возможны задержка или даже остановка прогрессирования миомы с исчезновением ее симптомов, при этом кровоток в матке не меняется. На фоне гипотрофии матки, эндометрий соответствует атрофическому или покоящемуся пролиферативному типу (рис. 1). Вместе с этим есть прямо противоположные данные, свидетельствующие о том, что длительное использование ГнРГ способствует гиперплазии эндометрия и эндометриту, подавление функций яичников не предотвращает развитие возрастной патологии матки. В любом случае в процессе лечения ГнРГ необходим тщательный контроль состояния эндометрия. Также возможно введение агонистов ГнРГ для ускорения восстановления матки после родов, даже в условиях антибиотикотерапии эндометрита.

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ЭФФЕКТ АГОНИСТОВ ГОНАДОТРОПИН-РЕЛИЗИНГ-ГОРМОНА

Рецепторы ЛГРГ экспрессируются примерно в 80% случаев рака эндометрия и яичников человека и составляют более 50% случаев рака молочной железы, включая тройной негативный рак молочной железы [34]. Кроме гипофиза и репродуктивных органов, никакие другие органы или гемопоэтические стволовые клетки не экспрессируют рецепторы ЛГРГ (ГнРГ). Таким образом, эти рецепторы можно рассматривать как идеальную мишень для персонализированного медицинского подхода в терапии рака.

Аналоги ГнРГ действуют на гормонозависимые опухоли и влияют на их рост. Некоторые препараты с длительным действием были эффективны при лечении опухолей яичников. Современные аналоги ГнРГ демонстрируют очень низкий эндокринный, но высокий противоопухолевый эффект как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo*. Меченные тритием производные ГнРГ выявляют специфические сайты связывания на линиях опухолевых клеток человека. Были синтезированы аналоги ГнРГ третьего поколения с эффективной селективной противоопухолевой активностью, которая не изменяет цикл яичников у крыс, но ингибирует образование колоний в клеточных линиях рака и обладает значительным антипролиферативным эффектом (рис. 1). Используя аналоги радиоактивно меченных пептидных гормонов, обнаружили, что линии опухолевых клеток человека и ксенотрансплантаты специфически связывают конъюгаты ГнРГ. Новые аналоги ГнРГ, действующие без какого-либо гормонального эффекта, могут представлять собой прорыв в исследовании противоопухолевых пептидов, оказывающих прямое влияние на опухолевые клетки [35].

Необходимо особо отметить данные литературы с описанием успешного лечения аналогами ГнРГ метастазов в легкие, кости и другие органы опухолей матки [36–38].

Количество клеток рака яичников человека (линия HRA) и поглощение ими ^3H -тимидина значительно возросли после добавления ФСГ, но эффект подавлялся бусерелином. Рецепторы к ФСГ и ГнРГ были идентифицированы в клетках HRA, и количество рецепторов было значительно снижено при обработке бусерелином [39]. Исследовали пролиферацию клеточных линий HNUA (эндометриальная карцинома) в культуре низкой и высокой плотности в условиях применения агониста ГнРГ бусерелина. Препарат отрицательно влиял на формирование колоний в зависимости от дозы при низкой плотности клеток, но был неэффективен при высокой плотности клеточных элементов. Культуральная среда клеток HNUA ингибировала действие бусерелина. Эти результаты позволяют предположить, что клеточная линия в процессе культивирова-

ния секретирует некоторые вещества, которые регулируют пролиферацию клеток, и что эти вещества также могут изменять эффекты этого аналога ГнРГ [40].

В яичнике, имплантированном в селезенку овариэктомированной крысы, развивается лютеинизированная опухоль, растущая в ответ на гонадотропины. Бусерелин сдерживает рост опухоли, возможно, вследствие прямого ингибирующего влияния на клетки лютеомы. Клеточные элементы, полученные из экспериментальной лютеинизированной опухоли яичника, более чувствительны к эндокринному действию ГнРГ, чем интактные лютеиновые клетки. Трансформация клеток яичника в лютеому подразумевает приобретение новых характеристик в системе генерации рецепторов к ГнРГ [41].

Бусерелин *in vitro* индуцировал уменьшение количества клеток яичников, полученных от препубертатных крыс, и клеток лютеиноклеточной опухоли яичника в одинаковой степени. Хотя уровни базального апоптоза были выше в клетках яичников, чем в лютеиноклеточной опухоли, индуцированный бусерелином апоптоз был обнаружен только в клетках лютеомы после 48-часового воздействия [42].

Аналоги ГнРГ могут оказывать прямые противоопухолевые эффекты на клетки различных линий рака яичников. Бусерелин вызывал статистически значимое снижение роста клеток в двух из шести клеточных линий этого рака, но никакой зависимости от дозы не наблюдали. Лейпролид (агонист ГнРГ) приводил к значительному дозозависимому ингибированию роста всех шести клеточных линий, когда дозы были увеличены до супрафизиологического уровня, но продемонстрировал отсутствие значительного ингибирования в клинически приемлемых дозах. Антид (антагонист ГнРГ) в таких же дозах не влиял на рост опухоли. Анализ конкурентного взаимодействия не выявил специфического связывания изучаемых препаратов с любой из шести протестированных клеточных линий рака яичников [43].

Slotman с соавт. [44] наблюдали только небольшое прямое ингибирующее действие агониста ГнРГ бусерелина в высоких концентрациях на пролиферацию трех клеточных линий рака яичников человека. Авторы делают заключение о маловероятности того, что прямой противоопухолевый эффект является основным механизмом действия ГнРГ при лечении рака.

Вместе с этим имеются данные, что бусерелин не ингибирует рост ДМВА-индуцированной аденокарциномы яичника у крыс, но гистологически в группе, получавшей бусерелин, наблюдали усиление некроза центральной части опухоли, уменьшение количества опухолевых клеток и пролиферацию соединительной ткани. Ежедневное введение *in vivo* бусерелина значительно подавляло высвобождение ФСГ, ЛГ и прогестерона по сравнению с контрольной группой. *In vitro* бусерелин подавлял ФСГ-индуцированную пролиферацию клеток ДМВА [45].

В эксперименте были исследованы 18 случаев злокачественных новообразований яичников для определения возможной роли гонадотропинов в развитии опухоли. 12 случаев серозной цистаденокарциномы, 2 муцинозной цистаденокарциномы, 2 эндометриодной карциномы, одна злокачественная опухоль Бреннера и одна опухоль желточного мешка были исследованы после имплантации под капсулу почек самок мышей для определения их реакции на бусерелин. Результаты показали, что в группе, получавшей аналог ГнРГ, размер ксенотрансплантатов увеличился ($p < 0.05$). Возможно, что гонадотропины играют определенную роль в стимулировании онкогенеза злокачественных новообразований яичников, связываясь со специфическими рецепторами [46].

Так как агонисты ГнРГ ингибируют функции яичников и вызывают инволюцию матки, эти препараты можно успешно применять для лечения доброкачественных и онкологических процессов в этих органах, а также для воздействия на метастазы (рис. 1). Но одновременно представлены результаты исследований, показывающие, что прямой эффект ГнРГ на опухоли мало выражен. Есть мнение, что гонадо-

тропины могут даже стимулировать развитие рака яичников, воздействуя на определенные рецепторы.

ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТОВ ГОНАДОТРОПИН-РИЛИЗИНГ-ГОРМОНА НА РЕПРОДУКТИВНЫЕ ОРГАНЫ В УСЛОВИЯХ ХИМИОТЕРАПИИ

Чтобы исследовать механизм защитного действия агонистов ГнРГ против вызванного химиотерапией повреждения яичников, самкам крыс имплантировали 1 мг агониста ГнРГ (гранулы золадекса). Всем крысам имплантировали осмотические мини-насосы, загруженные ^3H -тимидином, за 48 ч до вывода из эксперимента в стадии диэструса. ГнРГ через 5 дней после имплантации гранул значительно снижал поглощение тритированного тимидина яичниками. Ауторадиография показала, что почти весь ^3H -тимидин оказался в гранулезных клетках. Не исключено, что ГнРГ подавляет митотическую активность клеток яичников. Поскольку цитотоксические агенты преимущественно разрушают быстро делящиеся клетки, эти результаты могут представлять собой механизм защиты яичников при химиотерапии (рис. 1) [47].

Возможность снижения бусерелином овариотоксичности противоопухолевого препарата этопозидом была изучена на самках крыс породы Вистар. Количественный анализ структурных и функциональных элементов яичников на серийных срезах всего органа показал, что через 3 мес. после комбинированного лечения этопозидом и бусерелином морфологическая картина овариальных желез не отличалась от таковой у интактных животных того же возраста, тогда как монотерапия этопозидом привела к более раннему развитию атрофических процессов. Через шесть месяцев после лечения количество двух- и многослойных фолликулов было значительно выше у крыс, получавших комбинированную терапию, по сравнению с животными после применения только этопозидом [48].

В процессе проведения метаанализа результатов 13 рандомизированных контролируемых исследований по сравнительной оценке эффекта применения аналогов ГнРГ и химиотерапии (609 пациентов) с только химиотерапией (599 участников) были получены доказательства, хотя и низкого качества (по мнению самих авторов), о целесообразности использования агонистов ГнРГ до и/или во время химиотерапии для снижения риска первичной недостаточности яичников и увеличения вероятности спонтанной беременности в краткосрочной перспективе [49].

Однако в исследованиях Waxman с соавт. [50] бусерелин оказался неэффективным для сохранения фертильности при цитотоксической химиотерапии. 18 женщин были случайным образом распределены для получения аналога агониста ГнРГ до и во время цитотоксической химиотерапии при прогрессирующей болезни Ходжкина. Бусерелин назначали в однократном режиме 8 женщинам. Стандартный тест на ГнРГ проводили за 1 нед. до и в 1-й день каждого цикла химиотерапии. Используемая схема привела к первоначальному подавлению пиковых ответов ФСГ на ГнРГ, которое не поддерживалось все время наблюдения. При последующей оценке в течение 3 лет после завершения лечения у 4 из 8 пациентов женского пола после применения бусерелина и у 6 из 9 контрольных женщин была зарегистрирована аменорея.

Неэффективность аналогов ГнРГ во время химиотерапии для защиты яичников подтверждена Elgindy с соавт. [51] в обзоре большого количества данных с метаанализом. Сравнивали опубликованные рандомизированные контролируемые результаты исследований восстановления овариальных функций между группами пациентов женского пола после проведения химиотерапии в сочетании с агонистами ГнРГ и без этих препаратов. Сделано заключение, что включение в схему терапии аналогов ГнРГ является ненадежным методом сохранения фертильности.

Необходимо также отметить и работы, свидетельствующие о недостаточности доказательств для выводов об эффективности или отсутствии таковой в отношении защиты яичников при совместном применении агонистов ГнРГ с химиотерапевтическими препаратами. Авторы отмечают необходимость дальнейших исследований, которые, кроме всего прочего, должны учитывать частоту наступления беременности и изменение результативности противоопухолевой терапии [52].

Таким образом, при изучении результатов применения аналогов ГнРГ для защиты от повреждающих воздействий химиотерапии на органы репродуктивной системы существует определенная противоречивость. Идея такого использования связана опять же с подавлением активности клеток яичников и эндометрия, тогда как повреждающие факторы оказывают более сильное неблагоприятное влияние именно на пролиферативно и функционально активные клеточные элементы. Большинство ученых сообщает о хорошей протекции агонистов ГнРГ в условиях химиотерапии, но имеются данные о слабой эффективности или вообще отсутствии защитного действия препаратов данной группы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Можно сделать заключение, что основные исследования эффекта агонистов ГнРГ на репродуктивные органы женщин и самок экспериментальных животных были проведены еще в конце прошлого столетия. В настоящее время работы, в основном, посвящены изучению частных особенностей применения аналогов ГнРГ и результатам применения новых препаратов для лечения тех или иных патологических процессов. В многочисленных статьях отмечено, что агонисты ГнРГ при длительном применении подавляют овуляцию и вызывают состояние, сходное с менопаузой. Инфузия агониста ГнРГ является простым методом подавления продукции ЛГ и ФСГ, а также развития фолликулов. В яичниках происходит ингибция клеток гранулезы через супрессию синтеза ДНК и индукцию апоптоза с одновременной стимуляцией дифференцировки клеток в преовуляторных фолликулах. Такое состояние является обратимым, сохраняется фертильность: после прекращения лечения гипофиз очень быстро восстанавливает способность реагировать на этот релизинг. За счет быстрой инволюции матки после применения аналогов ГнРГ возможны задержка или даже остановка прогрессирования миомы с исчезновением ее симптомов, при этом кровоток в матке не меняется. На фоне гипотрофии матки эндометрий соответствует атрофическому или покоящемуся пролиферативному типу. Вместе с этим есть прямо противоположные данные о том, что длительное использование ГнРГ способствует гиперплазии эндометрия и эндометриту, а подавление функций яичников не предотвращает развитие возрастной патологии матки. В любом случае в процессе лечения ГнРГ необходим тщательный контроль состояния эндометрия. Также возможно введение агонистов ГнРГ для ускорения восстановления матки после родов даже в условиях антибиотикотерапии эндометрита. Препараты ГнРГ успешно применяют для лечения доброкачественных и онкологических процессов в яичниках и матке, а также для воздействия на метастазы. Вместе с этим представлены результаты исследований, показывающие, что прямой эффект ГнРГ на опухоли мало выражен, есть мнение, что гонадотропины могут даже стимулировать развитие рака яичников, воздействуя на определенные рецепторы. Большинство ученых сообщает о хорошей протективной способности агонистов ГнРГ в условиях химиотерапии, но имеются данные о слабой эффективности или вообще отсутствии защитного действия препаратов данной группы. В любом случае противоречивость публикаций по каждому из аспектов эффекта ГнРГ свидетельствует о его малой изученности, целесообразности продолжения не только прикладных, но и фундаментальных исследований.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке ПФНИ ГАН на 2022–2024 гг. “Изучение морфологических и молекулярных особенностей органопатий при изолированном и сочетанном воздействии ведущих метаболических факторов риска хронических неинфекционных заболеваний” (код темы FGMU-2022-0030, № гос. регистрации 122032300164-6) и в рамках Госзадания ФГБУН ИХБФМ СО РАН 1.6.12. “Фундаментальные основы здоровьесбережения”. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП “Протеомный анализ”, поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691). Финансовой поддержки со стороны компаний-производителей оборудования, реактивов и лекарственных препаратов авторы не получали.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн исследования – И.В.М., Е.Л.Л.; сбор и обработка материала – И.В.М., В.И.М., Е.Л.Л.; написание текста – И.В.М., А.К.П., Е.Л.Л.; редактирование – И.В.М., А.К.П., В.И.М., Е.Л.Л.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Emons G, Gründker C* (2021) The Role of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) in Endometrial Cancer. *Cells* 10(2): 292. <https://doi.org/10.3390/cells10020292>
2. *Brogden RN, Buckley MM, Ward A* (1990) Buserelin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and clinical profile. *Drugs* 39(3): 399–437. <https://doi.org/10.2165/00003495-199039030-00007>
3. *Plosker GL, Brogden RN* (1994) Leuprorelin. A review of its pharmacology and therapeutic use in prostatic cancer, endometriosis and other sex hormone-related disorders. *Drugs* 48(6): 930–967. <https://doi.org/10.2165/00003495-199448060-00008>
4. *Sand E, Linninge C, Lozinska L, Egecioglu E, Roth B, Molin G, Weström B, Ekblad E, Ohlsson B* (2015) Buserelin treatment to rats causes enteric neurodegeneration with moderate effects on CRF-immunoreactive neurons and Enterobacteriaceae in colon, and in acetylcholine-mediated permeability in ileum. *BMC Res Notes* 8: 824. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1800-x>
5. *Ohlsson B* (2016) Gonadotropin-Releasing Hormone and Its Physiological and Pathophysiological Roles in Relation to the Structure and Function of the Gastrointestinal Tract. *Eur Surg Res* 57(1–2): 22–33. <https://doi.org/10.1159/000445717>
6. *Jönsson A, Sand E, Ekblad E, Ohlsson B* (2016) Long-term follow-up of buserelin-induced enteric neuropathy in rats. *Mol Med Rep* 13(4): 3507–3513. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.4968>
7. *Ezoe K, Murata N, Yabuuchi A, Kobayashi T, Kato K* (2019) Evaluation of uterine receptivity after gonadotropin releasing hormone agonist administration as an oocyte maturation trigger: a rodent model. *Sci Rep* 9(1): 12519. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48918-3>
8. *Lopes TP, Padilla L, Bolarin A, Rodriguez-Martinez H, Roca J* (2020) Weaned Sows with Small Ovarian Follicles Respond Poorly to the GnRH Agonist Buserelin. *Animals (Basel)* 10(11): 1979. <https://doi.org/10.3390/ani10111979>
9. *Kaps M, Okada CTC, Gautier C, Aurich J, Scarlet D, Kuhl J, Aurich C* (2021) Transient suppression of ovulatory ovarian function in pony mares after treatment with slow-release deslorelin implants. *Domest Anim Endocrinol* 74: 106505. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2020.106505>
10. *Abdulkhalkova D, Bokal EV, Stimpfel M, Ciglar P, Korosec S* (2022) Reproductive Outcome After GnRH Agonist Triggering With Co-Administration of 1500 IU hCG on the Day of Oocyte Retrieval in High Responders: A Long-Term Retrospective Cohort Study. *Front Endocrinol (Lausanne)* 13: 826411. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.826411>
11. *Kong J, Su F, Liu Y, Yang Y, Cao Y, Qiu J, Wang Y, Zhang L, Wang J, Cao X* (2022) The pharmacokinetics of buserelin after intramuscular administration in pigs and cows. *BMC Vet Res*

- 18(1): 136.
<https://doi.org/10.1186/s12917-022-03237-0>
12. Liu Y, Yang J, Che X, Huang J, Zhang X, Fu X, Cai J, Yao Y, Zhang H, Cai R, Su X (2021) Agonistic analog of growth hormone-releasing hormone promotes neurofunctional recovery and neural regeneration in ischemic stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118(47): e2109600118.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2109600118>
 13. Rieger AC, Bagno LL, Salerno A, Florea V, Rodriguez J, Rosado M, Turner D, Dulce RA, Takeuchi LM, Kanashiro-Takeuchi RM, Buchwald P, Wanschel ACBA, Balkan W, Schulman IH, Schally AV, Hare JM (2021) Growth hormone-releasing hormone agonists ameliorate chronic kidney disease-induced heart failure with preserved ejection fraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118(4): e2019835118.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2019835118>
 14. Cai R, Zhang X, Wang H, Cui T, Halmos G, Sha W, He J, Popovics P, Vidaurre I, Zhang C, Mirsaeidi M, Schally AV (2022) Synthesis of potent antagonists of receptors for growth hormone-releasing hormone with antitumor and anti-inflammatory activity. *Peptides* 150: 170716.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2021.170716>
 15. Recinella L, Chiavaroli A, Di Valerio V, Veschi S, Orlando G, Ferrante C, Gesmundo I, Granata R, Cai R, Sha W, Schally AV, Lattanzio R, Brunetti L, Leone S (2021) Protective effects of growth hormone-releasing hormone analogs in DSS-induced colitis in mice. *Sci Rep* 11(1): 2530.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-81778-4>
 16. Cen LP, Ng TK, Liang JJ, Xu C, Zhuang X, Liu YF, Chen SL, Xu Y, Yang Q, Yuan XL, Qin YJ, Chan SO, Chen H, Zhang M, Schally AV, Pang CP (2021) Agonist of growth hormone-releasing hormone enhances retinal ganglion cell protection induced by macrophages after optic nerve injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118(28): e1920834118.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1920834118>
 17. Baumann R, Kuhl H, Taubert HD, Sandow J (1980) Ovulation inhibition by daily i.m. administration of a highly active LH-RH analog (d-ser(TBU)6-LH-RH-(1-9)-nonapeptide-ethylamide). *Contraception* 21(2): 191–197.
[https://doi.org/10.1016/0010-7824\(80\)90131-6](https://doi.org/10.1016/0010-7824(80)90131-6)
 18. Kaps M, Okada CTC, Gautier C, Aurich J, Scarlet D, Kuhl J, Aurich C (2021) Transient suppression of ovulatory ovarian function in pony mares after treatment with slow-release deslorelin implants. *Domest Anim Endocrinol* 74: 106505.
<https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2020.106505>
 19. Fanelli D, Beltramo M, Conte G, Cerretini B, Lomet D, Rota A, Aucagne V, Camillo F, Panzani D (2022) The Kisspeptin analogue C6 induces ovulation in jennies. *Theriogenology* 189: 107–112.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.06.014>
 20. Shimozawa N, Iwata T, Yasutomi Y (2022) A controlled ovarian stimulation procedure suitable for cynomolgus macaques. *Exp Anim*. Epub ahead of print.
<https://doi.org/10.1538/expanim.21-0198>
 21. Yano T, Yano N, Matsumi H, Morita Y, Tsutsumi O, Schally AV, Taketani Y (1997) Effect of luteinizing hormone-releasing hormone analogs on the rat ovarian follicle development. *Horm Res* 48 Suppl 3: 35–41.
<https://doi.org/10.1159/000191298>
 22. Ataya KM, Sakr W, Blacker CM, Mutchnick MG, Latif ZA (1989) Effect of GnRH agonists on the thymus in female rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 121(6): 833–840.
<https://doi.org/10.1530/acta.0.1210833>
 23. Saragüeta PE, Lanuza GM, Barañao JL (1997) Inhibitory effect of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) on rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis. *Mol Reprod Dev* 47(2): 170–174.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199706\)47:2<170::AID-MRD7>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199706)47:2<170::AID-MRD7>3.0.CO;2-J)
 24. Zhao S, Saito H, Wang X, Saito T, Kaneko T, Hiroi M (2000) Effects of gonadotropin-releasing hormone agonist on the incidence of apoptosis in porcine and human granulosa cells. *Gynecol Obstet Invest* 49(1): 52–56.
<https://doi.org/10.1159/000010213>
 25. Takekida S, Deguchi J, Samoto T, Matsuo H, Maruo T (2000) Comparative analysis of the effects of gonadotropin-releasing hormone agonist on the proliferative activity, apoptosis, and steroidogenesis in cultured porcine granulosa cells at varying stages of follicular growth. *Endocrine* 12(1): 61–67.
<https://doi.org/10.1385/ENDO:12:1:61>
 26. Yoshimura Y, Nakamura Y, Yamada H, Nanno T, Ubukata Y, Ando M, Suzuki M (1991) Gonadotropin-releasing hormone agonists induce meiotic maturation and degeneration of oocytes in the in vitro perfused rabbit ovary. *Fertil Steril* 55(1): 177–183.
[https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)54079-5](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)54079-5)
 27. Yoshimura Y, Nakamura Y, Ando M, Shiokawa S, Koyama N, Nanno T (1992) Direct effect of gonadotropin-releasing hormone agonists on the rabbit ovarian follicle. *Fertil Steril* 57(5): 1091–1097.
[https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)55029-8](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)55029-8)

28. Geyer A, Poth T, Otdorff C, Daub L, Reese S, Braun J, Walter B (2016) Histopathologic examination of the genital tract in rabbits treated once or twice with a slow-release deslorelin implant for reversible suppression of ovarian function. *Theriogenology* 86(9): 2281–2289. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.07.024>
29. Trindade CR, Camargos AF, Pereira FE (2008) The effect of buserelin acetate on the uterus of adult rats: morphological aspects. *Clin Exp Obstet Gynecol* 35(3): 198–201.
30. Janowski T, Zduńczyk S, Mwaanga ES (2001) Combined GnRH and PGF₂α application in cows with endometritis puerperalis treated with antibiotics. *Reprod Domest Anim* 36(5): 244–246. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2001.00290.x>
31. Kerr-Wilson RH, MacKenzie L, Fraser HM (1981) Effects of chronic LHRH agonist treatment on the endometrium and ovaries of the stump-tailed macaque. *Contraception* 24(6): 647–655. [https://doi.org/10.1016/0010-7824\(81\)90016-0](https://doi.org/10.1016/0010-7824(81)90016-0)
32. Wu HM, Chen LH, Schally AV, Huang HY, Soong YK, Leung PCK, Wang HS (2022) Impact of growth hormone-releasing hormone antagonist on decidual stromal cell growth and apoptosis *in vitro*. *Biol Reprod* 106(1): 145–154. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioab214>
33. Wu HM, Chen LH, Schally AV, Huang HY, Soong YK, Leung PCK, Wang HS (2022) Impact of growth hormone-releasing hormone antagonist on decidual stromal cell growth and apoptosis *in vitro*. *Biol Reprod* 106(1): 145–154. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioab214>
34. Engel J, Emons G, Pinski J, Schally AV (2012) AEZS-108: a targeted cytotoxic analog of LHRH for the treatment of cancers positive for LHRH receptors. *Expert Opin Investig Drugs*. 21(6): 891–899. <https://doi.org/10.1517/13543784.2012.685128>
35. Teplán I (2000) Peptides and antitumor activity. Development and investigation of some peptides with antitumor activity. *Acta Biol Hung* 51(1): 1–29.
36. Okamoto S, Komura M, Terao Y, Kurisaki-Arakawa A, Hayashi T, Saito T, Togo S, Shiokawa A, Mitani K, Kobayashi E, Kumasaka T, Takahashi K, Seyama K (2017) Pneumothorax caused by cystic and nodular lung metastases from a malignant uterine perivascular epithelioid cell tumor (PEComa). *Respir Med Case Rep* 22: 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.rmcr.2017.06.011>
37. Yuan X, Sun Y, Jin Y, Xu L, Dai H, Wang J, Zhang Z, Chen X (2019) Multiple organ benign metastasizing leiomyoma: A case report and literature review. *J Obstet Gynaecol Res* 45(10): 2132–2136. <https://doi.org/10.1111/jog.14066>
38. Aoki K, Yamamoto T, Terauchi R, Mori T, Shirai T, Kitawaki J (2021) Benign metastasizing leiomyoma in femur and thigh with a history of uterine leiomyoma: A case report and literature review. *J Obstet Gynaecol Res* 47(2): 812–817. <https://doi.org/10.1111/jog.14545>
39. Ohtani K, Sakamoto H, Satoh K (1992) Stimulatory effects of follicular stimulating hormone on the proliferation of ovarian cancer cell line *in vitro* and *in vivo*. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 44(6): 717–724.
40. Enomoto M, Mori T, Park MK (2001) GnRH agonist Buserelin affects colony-forming efficiency of HHUA and Jurkat cells. *Biochem Biophys Res Commun* 289(5): 1180–1187. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6131>
41. Chamson-Reig A, Pignataro OP, Libertun C, Lux-Lantos VA (1999) Alterations in intracellular messengers mobilized by gonadotropin-releasing hormone in an experimental ovarian tumor. *Endocrinology* 140(8): 3573–3580. <https://doi.org/10.1210/endo.140.8.6909>
42. Soriano EM, Fernandez MO, Catalano PN, Mongiat LA, Somoza GM, Libertun C, Lux-Lantos VA (2005) Differential gonadotropin releasing hormone (GnRH) expression, autoregulation and effects in two models of rat luteinized ovarian cells. *Life Sci* 77(17): 2141–2155. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.03.018>
43. Connor JP, Buller RE, Conn PM (1994) Effects of GnRH analogs on six ovarian cancer cell lines in culture. *Gynecol Oncol* 54(1): 80–86. <https://doi.org/10.1006/gyno.1994.1170>
44. Slotman BJ, Poels LG, Rao BR (1989) A direct LHRH-agonist action on cancer cells is unlikely to be the cause of response to LHRH-agonist treatment. *Anticancer Res* 9(1): 77–80.
45. Maruuchi T, Sugiyama T, Kataoka A, Nishida T, Yakushiji M (1998) Effects of a gonadotropin-releasing hormone agonist on rat ovarian adenocarcinoma cell lines *in vitro* and *in vivo*. *Jpn J Cancer Res* 89(9): 977–983. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1998.tb00657.x>
46. Ohtani K (1990) Effects of gonadotropin on the growth of malignant ovarian neoplasms assessed by subrenal capsule assay. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 42(6): 579–585.
47. Ataya KM, Palmer KC, Blacker CM, Moghissi KS, Mohammad SH (1988) Inhibition of rat ovarian [3H]thymidine uptake by luteinizing hormone-releasing hormone agonists: a possible mechanism for preventing damage by cytotoxic agents. *Cancer Res* 48(24 Pt 1): 7252–7256.

48. Borovskaya TG, Timina EA, Perova AV, Pakhomova AV, Shchemerova YA, Gol'dberg VE (2007) Pharmacological correction of etoposide ovariotoxicity. *Bull Exp Biol Med* 143(5): 614–616. <https://doi.org/10.1007/s10517-007-0196-6>
49. Senra JC, Roque M, Talim MCT, Reis FM, Tavares RLC (2018) Gonadotropin-releasing hormone agonists for ovarian protection during cancer chemotherapy: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 51(1): 77–86. <https://doi.org/10.1002/uog.18934>
50. Waxman JH, Ahmed R, Smith D, Wrigley PFM, Gregory W, Shalet S, Crowther D, Rees LH, Besser GM, Malpas JS, Lister TA (1987) Failure to preserve fertility in patients with Hodgkin's disease. *Cancer Chemother Pharmacol* 19(2): 159–162. <https://doi.org/10.1007/BF00254570>
51. Chen H, Xiao L, Li J, Cui L, Huang W (2019) Adjuvant gonadotropin-releasing hormone analogues for the prevention of chemotherapy-induced premature ovarian failure in premenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev* 3(3): CD008018. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008018.pub3>
52. Elgindy E, Sibai H, Abdelghani A, Mostafa M (2015) Protecting Ovaries During Chemotherapy Through Gonad Suppression: A Systematic Review and Meta-analysis. *Obstet Gynecol* 126(1): 187–195. <https://doi.org/10.1097/AOG.000000000000090526241272>

Physiological Aspects of the Application of Gonadotropin-Releasing Hormone Agonists in Obstetric-Gynecological Clinic and Experiment

I. V. Maiborodin^{a, b, *}, A. K. Pichigina^a, V. I. Maiborodina^a, and E. L. Lushnikova^a

^a*Institute of Molecular Pathology and Pathomorphology, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia*

^b*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, The Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russia*

*e-mail: imai@mail.ru

A literature search was carried out to study works on the results of the use of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonists in an obstetric-gynecological clinic and experiment. Physiological aspects of the GnRH influence on the ovaries and uterus, both in normal and in some pathological conditions, are considered. It is concluded that long-term use of GnRH agonists suppresses ovulation and induces a condition similar to menopause. GnRH agonist infusion is a simple method of suppressing the production of luteinizing and follicle-stimulating hormones, as well as the development of follicles. In the ovaries the granulosa cells are inhibited through suppression of DNA synthesis and induction of apoptosis with simultaneous stimulation of cell differentiation in preovulatory follicles. This condition is reversible, fertility is preserved. Due to the rapid involution of the uterus after the use of GnRH analogues, it is possible to delay or even stop the progression of uterine myoma with the disappearance of its symptoms. In the time of uterine hypotrophy, the endometrium corresponds to an atrophic or resting proliferative type. Along with this, there are directly opposite data that long-term use of GnRH contributes to endometrial hyperplasia and endometritis. Drugs with GnRH are successfully used to treat non-oncological and oncological tumors in the ovaries and uterus, as well as to affect metastases. But there are also research results showing that the direct effect of GnRH on tumors is not very pronounced, there is believed that gonadotropins can even stimulate the development of ovarian cancer by acting on certain receptors. Most scientists report a good protective ability of GnRH agonists at chemotherapy, but there is evidence of little or no protective effect of drugs in this group. In any case, the inconsistency of publications on each of the aspects of the GnRH effect indicates its little study, the expediency of continuing not only applied research, but also fundamental ones.

Keywords: gonadotropin-releasing hormone agonists, ovaries, uterus, follicles, reproduction, proliferation, differentiation

**ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ**

**РЕГУЛЯЦИЯ ДЫХАНИЯ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ
ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ**

© 2022 г. Н. Д. Шандыбина^{1, 2, *}, М. В. Куропатенко², Т. Р. Мошонкина¹

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

²*Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия*

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

Поступила в редакцию 12.07.2022 г.

После доработки 28.09.2022 г.

Принята к публикации 29.09.2022 г.

В обзоре рассмотрены современные методы электростимуляции, используемые для регуляции функции внешнего дыхания у человека, а именно абдоминальная функциональная стимуляция дыхательных мышц, стимуляция диафрагмы, стимуляция диафрагмального нерва, эпидуральная и чрескожная стимуляция спинного мозга. Для каждого из методов описаны физиологические основы их применения, приведены примеры использования в клинике, в том числе указаны параметры стимуляции и локализация электродов. Проанализирована целесообразность применения каждого из методов электростимуляции у пациентов с парезом дыхательной мускулатуры и особенности их применения в зависимости от уровня травмы спинного мозга, сохранности нервных волокон. Методу эпидуральной стимуляции спинного мозга уделено особое внимание, так как этот метод применяется в электрофизиологических исследованиях на животных моделях и дает знания о спинальных уровнях регуляции функции внешнего дыхания. В обзоре обоснован большой потенциал использования метода чрескожной электрической стимуляции спинного мозга как в фундаментальных исследованиях функции внешнего дыхания, так и в клинической практике.

Ключевые слова: дыхание, стимуляция спинного мозга, электрическая стимуляция диафрагмы, чрескожная стимуляция, искусственная вентиляция легких, травма спинного мозга

DOI: 10.31857/S0869813922110115

Этот обзор задуман как анализ способов регуляции внешнего дыхания человека методами электрической стимуляции. В настоящее время электростимуляцию дыхания производят как инвазивными, так и неинвазивными методами [1]. К наиболее исследованным из них относятся инвазивная электростимуляция диафрагмального нерва и эпидуральная электростимуляция спинного мозга. Активацию дыхания возможно осуществлять методами абдоминальной функциональной электрической стимуляции (аФЭС) и чрескожной электростимуляции диафрагмы. Каждый из этих методов обладает своими ограничениями, достоинствами и недостатками. Разработанный в последнем десятилетии метод чрескожной стимуляции

Список сокращений: ИВЛ – искусственная вентиляция легких; ССМ – стимуляция спинного мозга; ТСМ – травма спинного мозга; аФЭС – абдоминальная функциональная электростимуляция; ЧССМ – чрескожная стимуляция спинного мозга, ЧЭС – чрескожная электрическая диафрагмальная стимуляция.

спинного мозга (ЧССМ) является перспективным методом регуляции дыхательной функции из-за его неинвазивности и возможности активировать несколько спинальных центров регуляции дыхания, что важно для полноценной регуляции акта дыхания.

Целью написания обзора был критический анализ частоты и обоснованности использования каждого из методов электростимуляции дыхания в клинической практике на основании работ, опубликованных в последнее десятилетие. Особое внимание уделено методам электростимуляции спинного мозга, в том числе новому методу чрескожной стимуляции спинного мозга, так как этот метод может одинаково успешно быть использован как в фундаментальных исследованиях функции внешнего дыхания, так и в клинической практике.

Настоящий обзор был проведен в соответствии с правилами PRISMA (Предпочтительные элементы отчетности для систематических обзоров и мета-анализов) [2]. Основной вопрос, на который был направлен этот обзор: “как влияет каждый из методов электрической стимуляции на дыхательную систему”. Систематический поиск литературы на русском и английском языках проводили среди публикаций, появившихся с мая 2012 г. по сентябрь 2022 г. в следующих электронных базах: Pubmed, Google Scholar, Scopus, Web of Science, RSCI. В обзор вошли исследования на животных моделях, здоровых добровольцах и пациентах с парезом дыхательной мускулатуры, также были проанализированы ретроспективные клинические исследования и обзоры литературы.

Чтобы выбрать статьи, соответствующие цели обзора, поиск проводили с использованием в качестве основных ключевых слов: “электрическая стимуляция” и “электростимуляция”, в качестве дополняющих терминов: “дыхательная система”, “дыхание”, “диафрагма”, “диафрагмальный нерв”, “мышцы вдоха”, “мышцы выдоха”, “чрескожная стимуляция”. Критериями включения в обзор клинических статей являлись представление рандомизированных и/или многоцентровых исследований. Для сравнения эффективности методов электростимуляции, длительности курса воздействия и фактора оценки сохранности достигнутого эффекта статьи отбирали по принципу наличия контрольной группы. Отдельно анализировали ретроспективные исследования, которые были проведены для оценки качества жизни пациентов с вживленными электростимуляторами диафрагмального нерва и пациентов, прошедших курс эпидуральной стимуляции спинного мозга. Методу эпидуральной стимуляции спинного мозга уделено большое внимание, так как этот метод применяется как в клинических задачах регуляции дыхательной системы при парезе дыхательных мышц, так и в электрофизиологических исследованиях топической локализации дыхательных интернейронов. Статьи, в которых приводились результаты по изучению топических эффектов эпидуральной стимуляции в моделях на животных, включали в обзор только в тех случаях, когда авторы декларировали соблюдение этических стандартов работы с лабораторными животными.

Части обзора представляют результаты, полученные при стимуляции разных структур, обеспечивающих функцию внешнего дыхания: дыхательные мышцы, нервы, иннервирующие эти мышцы, и спинномозговые дыхательные центры.

ЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ СТИМУЛЯЦИЯ ДЫХАТЕЛЬНЫХ МЫШЦ

Абдоминальная функциональная электростимуляция

Электростимуляция мышц много лет успешно применяется в качестве тренирующего и восстановительного метода, способствующего улучшению функционального состояния скелетной мускулатуры. Абдоминальную функциональную электростимуляцию (аФЭС) мышц применяют при нарушениях функционирования

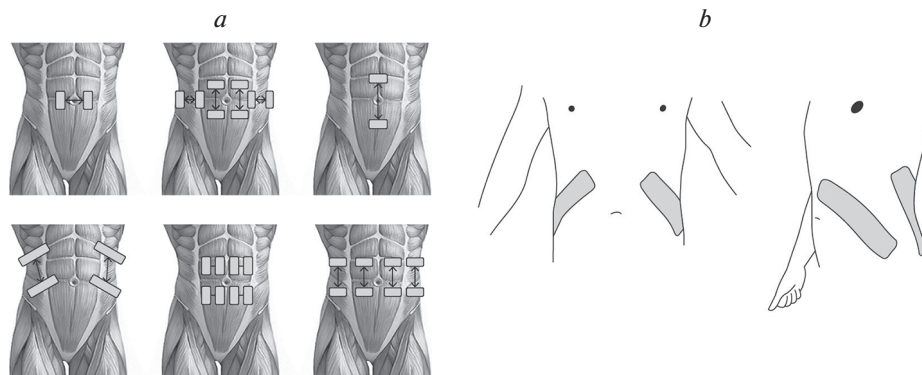


Рис. 1. (а) – варианты наложения стимуляционных электродов для проведения аФЭС, по [3]; (б) – постериолатеральное наложение электродов для активации экспираторной мускулатуры с максимальной эффективностью, по [4].

дыхательной системы различной этиологии и патогенеза: после травмы спинного мозга (ТСМ), при тетраплегии, парапарезе. Чрескожная аФЭС способна вызывать сокращения мышц брюшного пресса даже при их парезе после ТСМ [3]. Авторы показали, что у пациентов с тетраплегией в остром периоде после ТСМ курс аФЭС (20–40 мин в день, 5 раз в неделю в течение 4 нед., 30 Гц, 30–105 мА, длительность импульсов 100–500 мкс) уменьшил длительность искусственной вентиляции легких (ИВЛ) на 11 дней по сравнению с контрольной группой, пациенты которой не получали аФЭС.

Долгое время при применении метода аФЭС отсутствовала стандартизация протокола наложения стимуляционных электродов. Одну пару или несколько пар анодов и катодов размещали в пределах одной или соседних мышц живота (рис. 1а). В исследовании с участием здоровых добровольцев были проанализированы эффекты, достигаемые при различных положениях электродов на стенке живота. Было продемонстрировано, что при постериолатеральном наложении пары анод–катод достигается максимальная активация экспираторной мускулатуры [4] (рис. 1б). Использовали электроды размером 4×18 или 4×14 см; диагонально располагая электроды такого размера, экспериментаторы при стимуляции одновременно активировали многие мышцы живота.

Именно эта схема наложения стимуляционных электродов используется в современных исследованиях аФЭС. Например, Butler с соавт. обнаружили, что поверхностная стимуляция постериолатеральных мышц живота у пациентов с ТСМ на уровне сегмента Т6 или выше приводит к увеличению пикового и среднего потоков выдоха на 36 и 80% соответственно, увеличивает дыхательные объемы на 41%, а также уменьшает риск респираторных осложнений [5].

Анализ клинических исследований, проведенный в 2019 г., показал, что у пациентов с парезом дыхательной мускулатуры вследствие ТСМ при прохождении курса аФЭС длительностью от 6 недель облегчается самостоятельное дыхание, происходит очищение дыхательных путей, улучшается секреторная функция легких [6].

Таким образом, основная цель, для которой может быть использована аФЭС в клинике – это снижение риска респираторных осложнений, вызванных плохо отделяемым секретом в дыхательных путях при парезе дыхательной мускулатуры.

Чрескожная электростимуляция диафрагмы

Чрескожная электрическая диафрагмальная стимуляция (ЧЭДС) направлена на активацию и тренировку интактных мышечных волокон, вызывающих сокращение диафрагмы. Применение ЧЭДС предотвращает мышечную гипотрофию, в том числе у пациентов с нервно-мышечными заболеваниями и у пациентов, зависимых от ИВЛ [7, 8].

В ретроспективном исследовании анализировали медицинские документы пациентов, находившихся в реанимации вследствие ТСМ шейного отдела в 2007–2016 гг. [7]. Из 13 пациентов с трахеостомой 4 пациента получали 7-недельный курс ЧЭДС (30 Гц, 60 мА, длительность импульса 1 мс), 6 пациентов прошли по стандартному протоколу ИВЛ, остальные пациенты были исключены из анализа из-за неполноты данных или смерти. Электроды для ЧЭДС располагали билатерально по средней подмышечной линии между 6–7-ми и 7–8-ми ребрами и над мечевидным отростком. Курс ЧЭДС приводил к увеличению силы инспираторных мышц, сокращению количества дней в реанимации, снижению потребности в ИВЛ. Отсутствие потребности в ИВЛ было ключевым показателем, при котором завершался курс ЧЭДС; средняя продолжительность курса составила 47 сессий. Все 4 пациента были сняты с ИВЛ. Последнее наиболее актуально в ходе дыхательной реанимации.

ЧЭДС применяли также и у пациентов с COVID-19, находящихся в реанимации на ИВЛ (биполярные волны с частотой стимуляции 30 Гц, длительностью импульса 400 мкс и временем нарастания 0.7 с). Интенсивность ЧЭДС постепенно увеличивали до тех пор, пока не наблюдалось видимое сокращение мышц. Время и частота применения ЧЭДС – 30 мин в день, 5 дней в неделю. Во время каждого сеанса прямоугольные электроды помещались в парастермальную область рядом с мечевидным отростком в области 6-го и 7-го межреберий на одной линии со средней подмышечной линией. У лиц, находившихся на ИВЛ и получавших сеансы ЧЭДС, в конце исследования наблюдалось увеличение минутного объема на 0.64 (0.67–2.3) л, тогда как в группе пациентов только с ИВЛ минутный объем снизился на 1.2 (2.5–0.78) л. Различия были статистически значимыми ($p = 0.01$) [8].

По мнению Postma и соавт. протоколы ЧЭДС не стандартизированы, не разработаны рекомендации для лечения пациентов в критическом состоянии. Также выборки пациентов в исследованиях влияния ЧЭДС достаточно малы ($n = 4–12$) и не доказана сохранность воздействия в ретроспективных исследованиях [9].

ЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ СТИМУЛЯЦИЯ ДИАФРАГМАЛЬНОГО НЕРВА

Электростимуляция дыхания у пациентов с травмами и другими повреждениями шейного отдела спинного мозга, зависимых от ИВЛ, имеет долгую историю, насчитывающую более 2 столетий. ИВЛ сопровождается нефизиологическим повышением транспульмонального давления и нефизиологическим изменением плеврального давления во время вентиляции, поэтому при длительной ИВЛ вентиляционная способность легких снижается, в связи с чем применяются различные способы стимуляции нервов и мышц, участвующих в акте дыхания [10].

Инвазивная стимуляция диафрагмального нерва в области шеи и грудной клетки приводит к активации сокращений диафрагмы. Известно, что прямая электрическая стимуляция диафрагмального нерва вызывает синхронную активацию аксонов в электрическом поле, при которой генерируется ритмичный паттерн дыхания [11]. Этот метод считается безопасным и практичным способом обеспечения респираторной поддержки у зависимых от ИВЛ пациентов с травмой шейного отдела спинного мозга [12, 13]. С помощью эндоскопии имплантируемые электроды вводят на уровне 2-, 3- или 4-го межреберья (рис. 2), крепят к диафрагмальным нервам в направлении верхнего средостения и подключают к внешнему стимуля-

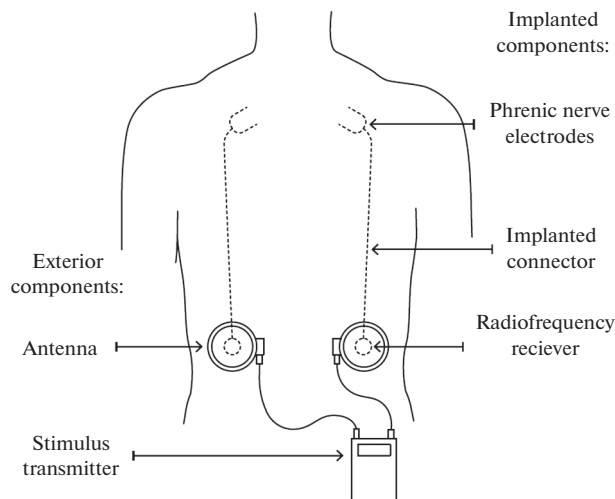


Рис. 2. Стимуляция диафрагмального нерва (по [15]).

тору [14]. Этот метод может быть использован на раннем этапе лечения для снижения необходимости использования ИВЛ в отделениях интенсивной терапии.

В ретроспективном исследовании, проведенном в 2011 г., показано, что после того, как 37 пациентам с повреждением спинного мозга на шейном уровне были имплантированы стимуляторы диафрагмального нерва, у 98% пациентов при стимуляции дыхательный объем стал на 15% больше дыхательного объема до стимуляции [16].

Недавно были проанализированы многочисленные доклинические и клинические исследования, направленные на восстановление произвольного дыхания у пациентов с ТСМ выше диафрагмальных ядер, и сделан вывод о возможности полного восстановления дыхания с использованием стимуляции диафрагмального нерва [17].

В исследовании 2018 г. показано, что у 5 из 92 пациентов с ТСМ, получавших электростимуляцию диафрагмального нерва, полностью восстановилась функция дыхания, причем двум из них смогли удалить стимуляторы [18]. В подгруппе лиц, которым проводили стимуляцию диафрагмального нерва в первый год после ТСМ, 73% пациентов успешно отключались от аппарата ИВЛ на 24 ч в сутки, а в подгруппе пациентов, которых стимулировали через 2 года после травмы, такой результат был достигнут в 51% случаев. Авторы пришли к выводу, что раннее использование диафрагмального стимулятора приводит к благоприятным исходам и улучшает качество жизни людей с дыхательной дисфункцией после ТСМ.

К ограничениям метода следует отнести следующие особенности. Стимуляция диафрагмального нерва подходит пациентам с ТСМ выше С4, поскольку в таком случае на уровне С3–С5 сохраняется целостность диафрагмального нерва [19]. У пациентов с тетраплегией, развившейся вследствие ТСМ, имплантация диафрагмального стимулятора для восстановления дыхательной функции невозможна из-за недостаточной функциональной активности диафрагмальных нервов [20]. Важно также учитывать тот факт, что при стимуляции диафрагмальных нервов инициируется вдох, но не инициируется выдох.

ЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ СТИМУЛЯЦИЯ СПИННОГО МОЗГА

Большой интерес вызывают результаты исследований влияния электрической стимуляции спинного мозга (ССМ) на физиологические функции (кардиореспираторная, двигательная, выделительная) и возможность активно менять эти результаты, меняя место и параметры стимуляции. На данный момент накоплен большой опыт применения ССМ при лечении хронической неизлечимой боли разной этиологии [21, 22]. На тысячах пациентов по всему миру показано, что для лечения болевого синдрома шеи и верхних конечностей эффективен метод высокочастотной стимуляции (от 10 кГц) [23, 24], а низкочастотная ССМ (до 100 Гц) применяется при болях в нижних конечностях [25].

В последние 15 лет показано, что сочетание как инвазивной, так и неинвазивной электростимуляции спинного мозга с двигательными воздействиями эффективно для восстановления произвольных движений и самостоятельной ходьбы у пациентов, парализованных вследствие ТСМ [26–29]. Использование ССМ для двигательной реабилитации основано на доказанном эффекте активации спинальной локомоторной нейросети и пулов мотонейронов при стимуляции поясничного утолщения спинного мозга [30–32]. Неинвазивный метод ЧССМ в последние годы все чаще применяют для управления локомоцией [33].

Одним из преимуществ чрескожной стимуляции относительно эпидуральной ССМ является возможность оказания мультисегментарного воздействия на спинной мозг [34]. Недавно был разработан неинвазивный спинальный нейропротез, использующий это преимущество, активирующий сгибатели и разгибатели ног в зависимости от фаз шага, предназначенный для облегчения ходьбы при гемипарезе вследствие инсульта [35]. В нейропротезе проводится непрерывная ЧССМ центрального генератора шага на уровне позвонков Т11–Т12, чтобы облегчить локомоцию, дополнительно осуществляют непрерывную стимуляцию шейного генератора на уровне позвонков С5–С6 для активации движений рук, сопровождающих ходьбу, и увеличения возбудимости нисходящих путей. На фоне непрерывной активации центральных генераторов происходит фазозависимая стимуляция корешков спинного мозга на стороне пареза, на уровне позвонков Т11 для активации паретичных мышц-сгибателей во время фазы переноса и L1 для активации паретичных мышц-разгибателей в фазе опоры.

В спинном мозге локализована сеть дыхательных интернейронов, которая обеспечивает формирование дыхательного паттерна в эфферентный моторный выход, координирует активность дыхательных мышц, координирует дыхательные, локомоторные и постуральные движения [36] (рис. 3).

Дыхательный ритм, генерируемый в стволе головного мозга, передается на спинномозговые нейроны через бульбоспинальные премоторные нейроны. Верхние шейные интернейроны находятся в пределах сегментов С1–С2 и могут генерировать ритм дыхания. Шейные и поясничные центральные генераторы локомоторных паттернов могут воспроизводить ритмические паттерны, регистрируемые на дыхательных нервах. Дыхательные интернейроны модулируют бульбоспинальный ритм и координируют активность между моторными пулами. Интернейроны могут переключаться между задачами и, вполне вероятно, что классификация интернейронов не статична. Респираторные афференты и афференты мышц конечностей проецируются на спинномозговые мотонейроны и могут модифицировать генерацию дыхательных паттернов.

ЭПИДУРАЛЬНАЯ СТИМУЛЯЦИЯ СПИННОГО МОЗГА

Локализация электродов и частота ССМ являются критическими детерминантами результата эпидуральной ССМ. Метод эпидуральной стимуляции в исследова-

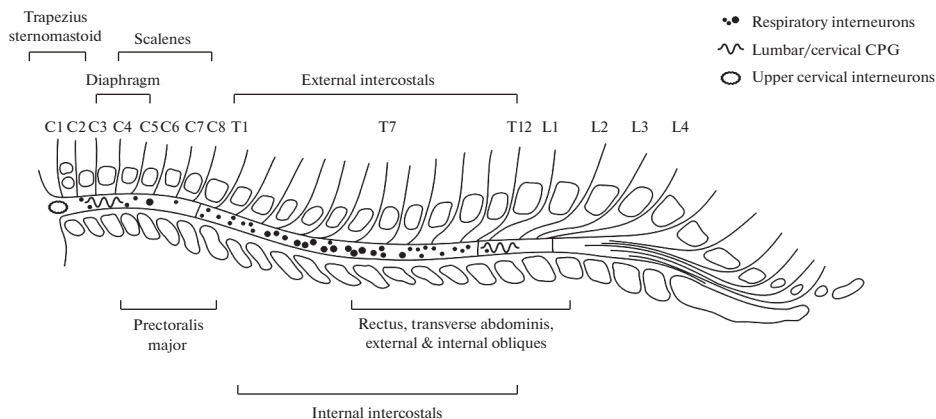


Рис. 3. Схема расположения дыхательных и двигательных центров и нервов в спинном мозге, по [36].

ниях дыхательной системы, в первую очередь, использовался как единственный электрофизиологических метод детекции респираторных интернейронов (по потенциалу действия).

Эпидуральная стимуляция в моделях на животных

Большая часть работ, направленных на топическую диагностику респираторных эффектов эпидуральной стимуляции, проведена на животных моделях. Так, на крысах было показано, что активация шейных и грудных интернейронов связана с дыханием [37]. Было продемонстрировано, что у кошки проприоспинальные нейроны C1–C3 получают фазное возбуждение во время вдоха и торможение во время выдоха [38]. Нейроны из этой области проецируются в пределах моторного пула диафрагмы [39]. Интернейроны на уровне C3–C6 у децеребрированных кошек также активируются в зависимости от дыхательного цикла [40, 41]. У 35 кроликов на уровне C3–C6 в вентральных рогах дорсально и дорсо-медиально от диафрагмального моторного пула были зарегистрированы 63 интернейрона, из которых 54% инспираторные и 46% экспираторные [42]. Эти электрофизиологические результаты легли в основу дальнейших исследований, позволивших управлять актом дыхания у спинализированных собак. Так, высокочастотная стимуляция вентральной поверхности T2 сегмента спинного мозга (300 Гц, 0–6 мА, 0.2 мс) у 11 собак активировала локальные пулы диафрагмальных мотонейронов через спинномозговые пути, расположенные в латеральных канатиках, тогда как верхние шейные интернейроны оставались незадействованными [43]. Современные исследования на собаках (2017–2019 гг.) показали, что при стимуляции вентральных сегментов на уровне грудного отдела достигается эффект активации инспираторных мышц [44, 45], тогда как при стимуляции нижнегрудных и поясничного отделов достигается эффект активации экспираторных мышц [46–48].

Известно, что из-за схожей организации корково-спинномозговых путей приматов и респираторных бульбоспинномозговых путей грызунов последние могут быть также пригодны для изучения функционального восстановления дыхательных мышц после воспроизведения эффекта ТСМ (частичной или полной гемисекции) [49]. С помощью интраспинальной микроstimуляции на уровне сегмента C3 (внутри диафрагмального моторного пула) как у интактных крыс, так и у крыс с ТСМ, можно напрямую успешно активировать мотонейроны диафрагмы [50]. Это

позволяет реанимировать поврежденную диафрагму и модулировать ее активность для увеличения объема вдоха. У крыс при неполной ТСМ высокочастотная эпидуральная стимуляция на уровне С4 и Т2 приводит к асинхронной активации дыхательных мотонейронов, что вызывает спонтанное дыхание [51].

Эпидуральная стимуляция в клинической практике

В исследованиях с участием пациентов с тетраплегией вследствие ТСМ было показано, что сочетанная стимуляция сегментов Т9, Т11 и L1 вызывает кашлевой акт за счет сокращения экспираторных мышц [52]. В ретроспективном исследовании продемонстрировано, что в течение 4,6 лет все пациенты продолжали регулярно использовать устройство эпидуральной стимуляции. В результате контрольные показатели качества жизни и респираторной функции оставались высокими: среднее значение максимального давления в дыхательных путях при дыхании, вызванном эпидуральной стимуляцией, удерживалось на уровне 108 ± 23 см H₂O. При этом потребность в профессиональной помощи лиц, осуществляющих уход, заметно снизилась, что позволило пяти пациентам из девяти передвигаться самостоятельно [53].

Описан клинический случай, в котором пациенту (9 лет) с полным анатомическим прерыванием спинного мозга на уровне С2 в ходе малоинвазивной операции ввели в эпидуральное пространство электрод на уровне С2–С4 позвонков. Пациент находился все время под аппаратом ИВЛ, длительность эпизодов самостоятельного дыхания не превышала 2 мин. Процесс увеличения возможностей самостоятельного дыхания пациента осуществлялся в четыре последовательных этапа. Первый – разработка и реализация режимов электростимуляции, соответствующих дыхательным паттернам с частотой следования 12, 15 и 20 циклов в мин (10 Гц, длительность импульсов 2500 мкс); в течение этого этапа длительность эпизодов самостоятельного дыхания увеличилась. В течение второго периода (5 дней) способность пациента к самостоятельному дыханию выросла с 9 до 16,5 мин. На третьем этапе (4 нед.) электростимуляцию проводили 4 раза в день по 15 мин при самостоятельном дыхании пациента одновременно с аудиовизуальной поддержкой. В начале четвертого этапа пациенту имплантировали устройство для хронической электростимуляции. Через 6 мес. после выписки из стационара пациент продолжил самостоятельно дышать при одновременной стимуляции 3 раза в день по 20 мин [54].

В табл. 1 обобщены эффекты эпидуральной ССМ, полученные на децеребрированных животных моделях и в клинических исследованиях на пациентах с ТСМ. Доказано, что стимуляция шейного отдела (верхнешейного, среднешейного) ведет к активации диафрагмального дыхания, при сочетанной стимуляции нескольких уровней достигается эффект спонтанного дыхания, а стимуляция тораколумбального отдела сопровождается активацией экспираторных мышц и инициирует кашлевой акт.

В небольшом количестве клинических исследований показано, что регулярная ССМ сопровождается улучшением дыхательной функции, нормализацией секреторной функции легких и повышением качества жизни пациентов. Однако накопленных данных недостаточно, чтобы однозначно соотнести место стимуляции, параметры стимуляции и эффекты, которые оказывает инвазивная электростимуляция спинного мозга на дыхание. Метод эпидуральной ССМ для регуляции дыхания не получил широкого применения в клинической практике, вероятно, в связи с рисками, связанными с хирургическим вмешательством, и недостаточностью данных об эффективности этого воздействия.

Таблица 1. Эффекты со стороны дыхательной системы при эпидуральной стимуляции спинного мозга

Сегмент спинного мозга	Параметры стимуляции	Выборка	Эффекты	№ в списке литературы
Децеребрированные животные модели				
S2–S3	Стимуляция премоторных аксонов одиночными импульсами, 1–91 мА, 0,2 мс	22 крысы от неонатального до ювенильного возраста	Передача возбуждения проходит через ипсилатеральные нисходящие аксоны медуллярных диафрагмальных премоторных нейронов в любом возрасте	[55]
S7	Стимуляция латеральных и вентральных канатиков одиночными импульсами, 5–50 мА, 0,2 мс	18 крыс	Показана связь бульбоспинальных инспираторных нейронов вентральной группы с диафрагмальными мотонейронами	[56]
S4/T2	Вентролатерально 300 Гц, 100–1000 мА, 60 с	8 крыс/7 крыс	Стимуляция потенцирует диафрагмальную активность с небольшим влиянием на частоту вдоха	[51]
T4	50–100 мА, 0,2 мс	6 кошек	Инспираторные верхнешейные нейроны посылают возбуждение по восходящим путям при вдохе и ингибируются при выдохе	[38]
S8, T6	Вентральная поверхность, 500 Гц, 1 мА	4 собаки	Самое высокое отрицательное давление в дыхательных путях составило 47 ± 2 см H ₂ O	[44]
T9, T11–12, L2	Дорзальная поверхность, 500 Гц, 1 мА, 0,2 мс	11 собак	Активация экспираторной мускулатуры (межреберные и наружные косые мышцы)	[48]
Клинические исследования у пациентов с травмой спинного мозга				
S2–S3	10 Гц, 2500 мкс	1 пациент, 9 лет	Самостоятельное спонтанное дыхание	[54]
T9, T11, L1	По срединной линии на дуральном мешке, 40 В, 53 Гц, 150–200 мс	10 пациентов	Кашлевой акт за счет сокращений экспираторной мускулатуры	[52, 53]

ЧРЕСКОЖНАЯ СТИМУЛЯЦИЯ СПИННОГО МОЗГА

В настоящее время исследования влияния ЧССМ на функцию внешнего дыхания проводятся, как правило, на здоровых добровольцах.

Миняевой с соавт. в исследовании с участием 10 здоровых добровольцев было показано, что динамические изменения параметров легочной вентиляции и газообмена при ЧССМ на уровне позвонков T11–T12, над сегментами спинного мозга, в которых локализован центральный шагательный генератор (рис. 3), связаны с вызываемыми стимуляцией шаговыми движениями [57].

В следующем исследовании с участием здоровых добровольцев получены данные о регуляции активности дыхательной мускулатуры с помощью ЧССМ (30 Гц, модулированные частотой 5 кГц). Испытуемые находились в положении полужа, ЧССМ производили на уровне T12–L1 позвонков. Интенсивность ЧССМ подбирали индивидуально, ориентируясь на интенсивность одиночных монополярных импульсов длительностью 1 мс и частотой 1 импульс в 2–3 с, вызывавшую двигательный ответ в мышцах нижних конечностей. Рабочий диапазон токов составил 30–90 мА. Неинвазивная стимуляция в состоянии покоя вызвала достоверное уменьшение глубины дыхания на 0.10 ± 0.03 л за счет синхронного уменьшения продолжительности и скорости как вдоха, так и выдоха [58].

В исследовании 2020 г. пациенту 39 лет с тетраплегией, развившейся вследствие травмы нырлящика на уровне C5, провели курс ЧССМ [59]. Перед курсом пациент сообщал о нарушении функции дыхания и снижении способности кашлять и отхаркивать мокроту, особенно в положении лежа. В течение двух недель высокочастотную стимуляцию (10 кГц) чередовали с низкочастотной (30 Гц), также чередовали локализацию электродов на уровне C3–C4, C5–C6 и T1–T2. В результате увеличился объем вдоха и выдоха и увеличилась громкость кашлевого акта с 80 дБ до 86 дБ.

Таким образом, показана принципиальная возможность использования метода ЧССМ для регуляции дыхания. Метод ЧССМ, не связанный с рисками хирургического вмешательства, является удобным инструментом для исследований роли центров спинного мозга в управлении внешним дыханием у человека. Актуальным остается вопрос, возможна ли регуляция активности моторных ядер дыхательных мышц и “дыхательного генератора”, локализованных в грудном и шейном отделах спинного мозга, с помощью ССМ [60].

Представляет интерес создание “дыхательного нейропротеза” по аналогии с неинвазивным спинальным нейропротезом, облегчающим ходьбу [35]. Используя метод ЧССМ, можно воздействовать на разные отделы спинного мозга и таким образом инициировать дыхание, усиливать активность диафрагмы, инспираторных и экспираторных мышц в соответствующие их активности фазы дыхательного цикла. Большинство сегментов спинного мозга иннервируют как инспираторные, так и экспираторные мышцы (рис. 3), однако можно надеяться, что, размещая электроды для ЧССМ в одном месте, можно получить разные эффекты на дыхание, используя разные параметры стимуляции. За многие годы использования ССМ для купирования боли показано, что основные параметры стимуляции (амплитуда, длительность импульса, частота) влияют на терапевтический эффект, так как от них зависит доставка электрического заряда в разные локусы спинного мозга [61–63].

Таким образом, сейчас ЧССМ является удобным инструментом для изучения функций спинного мозга в регуляции дыхания, в перспективе ЧССМ может стать доступным и эффективным методом восстановления дыхания у пациентов с парезом дыхательной мускулатуры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Среди всех методов электростимуляции, рассмотренных в обзоре, больше всего данных о стимуляции диафрагмального нерва, которую применяют в клинике для восстановления дыхания у пациентов с высокой тетраплегией, вызывающей паралич дыхания. Это метод с хорошо предсказуемым результатом, так как физиологический механизм эффекта известен. К тому же — это малоинвазивный метод. Одним из основных ограничений применения электростимуляции диафрагмального нерва является то, что он подходит только пациентам с ТСМ выше сегмента С4. Также серьезными недостатками этого метода является то, что он приводит к активации вдоха и не влияет на выдох, а также может вызывать утомление мышц, так как синхронно активирует все аксоны в электрическом поле. Электростимуляция дыхательных мышц применяется при нарушениях активности дыхательной системы разной этиологии, эти методы электростимуляции неинвазивны, однако они не стандартизированы, и поэтому их применяют редко. Очевидно, что изучение физиологии дыхательных мышц, связи активности диафрагмы, абдоминальных, межреберных дыхательных мышц с фазами дыхательного цикла являются перспективными направлениями исследований, так как эти знания позволят уточнить существующие клинические протоколы электростимуляции мышц для регуляции функцией внешнего дыхания.

ССМ имеет потенциальное преимущество перед стимуляцией мышц и диафрагмального нерва, основанное на том, что в спинном мозге находятся нейрональные структуры, контролирующие весь дыхательный цикл. Следовательно, стимулируя разные зоны спинного мозга, можно контролировать разные фазы дыхательного цикла и использовать этот метод при большом разнообразии причин, вызывающих нарушение дыхания. Исследования, проводимые на животных с использованием эпидуральной ССМ, демонстрируют это. В клинике эпидуральная ССМ применяется исключительно редко — опубликованы единичные клинические случаи с использованием этого метода. Очевидно, что серьезные риски осложнений, связанные с имплантацией системы для ССМ, тормозят применение эпидуральной стимуляции в клинике. Также очевидно, что современный уровень знаний о роли структур спинного мозга в регуляции дыхательного цикла еще недостаточен, чтобы пренебречь рисками ради предсказуемого результата, как это происходит в случае применения ССМ для купирования боли.

В последние несколько лет показана принципиальная возможность использования метода ЧССМ для регуляции дыхания. Этот неинвазивный метод имеет хорошие перспективы клинического использования для восстановления дыхательной функции у пациентов с нарушениями внешнего дыхания при разных патологиях, а также является удобным инструментом для исследований роли спинальных центров в управлении внешним дыханием у человека. Кроме того, технические особенности метода ЧССМ позволяют одновременно воздействовать на разные зоны спинного мозга. Таким образом, можно думать о дыхательном спинальном нейротезе, который будет управлять функцией внешнего дыхания, модулируя активность дыхательных центров, усиливая сокращение инспираторных и экспираторных мышц в соответствующие их активности фазы дыхательного цикла. Мы связываем большие надежды с использованием метода ЧССМ для получения новых знаний о механизмах регуляции функции внешнего дыхания у человека.

ОГРАНИЧЕНИЯ

В настоящем обзоре рассмотрено клиническое применение методов электростимуляции дыхания в контексте одной нозологии, травмы спинного мозга.

ВКЛАД АВТОРОВ

Н.Д.Ш. — разработка концепции обзора, сбор и анализ источников литературы, подготовка рукописи. М.В.К. — анализ литературных данных, участие в подготовке рукописи; Т.М.М. — дизайн статьи, анализ литературных данных, участие в утверждении окончательного варианта рукописи. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ИСМЖЕ (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена по государственному заданию по теме № 0113-2019-0006 (63.4.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны Ксении Белой за дизайн рисунков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Safonov VA, Tarasova NN* (2010) Electrical Stimulation of Breathing. *Human Physiol* 36: 483–494.
2. *Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gotzsche PC, Ioannidis JP, Clarke M, Devereaux PJ, Kleijnen J, Moher D* (2009) The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration *J Clin Epidemiol* 62(10): ppe1–e34.
<https://doi.org/10.1136/bmj.b2700>
3. *McCaughey EJ, Berry HR, McLean AN, Allan DB, Gollee H* (2015) Abdominal functional electrical stimulation to assist ventilator weaning in acute tetraplegia: A cohort study. *PLoS One* 10(6): e0128589.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128589>
4. *Lim J, Gorman RB, Saboisky JP, Gandevia SC, Butler JE* (2007) Optimal electrode placement for noninvasive electrical stimulation of human abdominal muscles. *J Appl Physiol* 102(4): 1612–1617.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00865.2006>
5. *Butler JE, Lim J, Gorman RB, Boswell-Ruys C, Saboisky JP, Lee BB, Gandevia SC* (2011) Posterolateral surface electrical stimulation of abdominal expiratory muscles to enhance cough in spinal cord injury. *Neurorehabil Neural Repair* 25 158–167.
<https://doi.org/10.1177/1545968310378509>
6. *McCaughey EJ, Butler JE, McBain RA, Boswell-Ruys CL, Hudson AL, Gandevia SC, Lee BB* (2019) Abdominal functional electrical stimulation to augment respiratory function in spinal cord injury. *Top Spinal Cord Inj Rehabil* 25(2): 105–111.
<https://doi.org/10.1310/sci2502-105>
7. *Duarte GL, Bethiol AL, Ratti LD, Franco G, Moreno R, Tonella RM, Falcão AL* (2021) Transcutaneous electrical diaphragmatic stimulation reduces the duration of invasive mechanical ventilation in patients with cervical spinal cord injury: retrospective case series. *Spinal Cord Series Cases* 7(1): 1–6.
<https://doi.org/10.1038/s41394-021-00396-4>
8. *Hsin YF, Chen SH, Yu TJ, Huang CC, Chen YH* (2022) Effects of transcutaneous electrical diaphragmatic stimulation on respiratory function in patients with prolonged mechanical ventilation. *Ann Thorac Med* 17(1): 14–20.
https://doi.org/10.4103/atm.atm_158_21
9. *Postma K, Haisma JA, Hopman MT, Bergen MP, Stam HJ, Bussmann JB* (2014) Resistive inspiratory muscle training in people with spinal cord injury during inpatient rehabilitation: a randomized controlled trial. *Phys Therapy* 94: 1709–1719.
<https://doi.org/10.2522/ptj.20140079>

10. *Gattinoni L, Marini JJ, Collino F, Maiolo G, Rapetti F, Tonetti T, Vasques F, Quintel M* (2017) The future of mechanical ventilation: lessons from the present and the past. *Crit Care* 21(1): 183. <https://doi.org/10.1186/s13054-017-1750-x>
11. *Levy M, Mizrahi J, Susak Z* (1990) Recruitment, force and fatigue characteristics of 768 quadriceps muscles of paraplegics isometrically activated by surface functional 769 electrical stimulation. *J Engin* 12: 150–156. [https://doi.org/10.1016/0141-5425\(90\)90136-B](https://doi.org/10.1016/0141-5425(90)90136-B)
12. *DiMarco AF* (2001) Neural prostheses in the respiratory system. *J Rehabil Res Develop* 38: 601–607.
13. *Glenn WW, Brouillette RT, Dentz B, Fodstad H, Hunt CE, Keens TG, Marsh HM, Pande S, Piepgras DG, Vanderlinden RG* (1988) Fundamental considerations in pacing of the diaphragm for chronic ventilatory insufficiency. A multi-center study. *Pacing Clin Electrophysiol* 11: 2121–2127. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8159.1988.tb06360.x>
14. *Onders RP, Elmo M, Khansarinia S, Bowman B, Yee J, Road J, Bass B, Dunkin B, Ingvarsson PE, Oddsdóttir M* (2009) Complete Worldwide Operative Experience in Laparoscopic Diaphragm Pacing: Results and Differences in Spinal Cord Injured Patients and Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients. *Surg Endoscopy* 23: 1433–1440. <https://doi.org/10.1007/s00464-008-0223-3>
15. *DiMarco AF* (2009) Phrenic nerve stimulation in patients with spinal cord injury. *Respirat Physiol Neurobiol* 169(2): 200–209. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2009.09.008>
16. *Romero-Ganuza FJ, Gambarrutia-Malfatti C, Diez de la Lastra-Buigues E, Marín-Ruiz MÁ, Merlo-González VE, Sánchez-Aranzueque Pantoja AM, García-Moreno FJ, Mazaira-Álvarez J* (2011) Diaphragmatic pacemaker as an alternative to mechanical ventilation in patients with cervical spinal injury. *Med Intensiva (Engl Edition)* 35: 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.medin.2010.10.003>
17. *Locke KC, Randelman ML, Hoh DJ, Zholudeva LV, Lane MA* (2022) Respiratory plasticity following spinal cord injury. *Neural Regen Res* 17: 2141–2148. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.335839>
18. *Onders RP, Elmo M, Kaplan C, Schilz R, Katirji B, Tinkoff G* (2018) Long-term experience with diaphragm pacing for traumatic spinal cord injury: early implantation should be considered. *Surgery* 164(4): 705–711. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2018.06.050>
19. *Son BC, Kim DR, Kim IS, Hong JT* (2013) Phrenic nerve stimulation for diaphragm pacing in a quadriplegic patient. *J Korean Neurosurg Soc* 54(4): 359–362. <https://doi.org/10.3340/jkns.2013.54.4.359>
20. *Vázquez RG, Sedes PR, Fariña MM, Marqués AM, Velasco MEF* (2013) Respiratory Management in the Patient with Spinal Cord Injury. *Biomed Res Int* 2013:168757. <https://doi.org/10.1155/2013/168757>
21. *Verrills P, Sinclair C, Barnard A* (2016) A review of spinal cord stimulation systems for chronic pain. *J Pain Res* 9: 481. <https://doi.org/10.2147/JPR.S108884>
22. *Pérez JT* (2021) Spinal cord stimulation: beyond pain management. *Neurología (Engl Edition)*. <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2019.05.007>
23. *Stauss T, El Majdoub F, Sayed D, Surges G, Rosenberg WS, Kapural L, Bundschu R, Lalkhen A, Patel N, Gliner B, Subbaroyan J* (2019) A multicenter real-world review of 10 kHz z SCS outcomes for treatment of chronic trunk and/or limb pain. *Ann Clin Translat Neurol* 6: 496–507. <https://doi.org/10.1002/acn3.720>
24. *Baranidharan G, Bretherton B, Montgomery C, Titterton J, Crowther T, Vannabouathong C, Inzana JA, Rotte A* (2021) Pain Relief and Safety Outcomes with Cervical 10 kHz Spinal Cord Stimulation: Systematic Literature Review and Meta-analysis. *Pain and Therapy* 10: 849–874. <https://doi.org/10.1007/s40122-021-00269-6>
25. *Kumar K, Taylor RS, Jacques L, Eldabe S, Meglio M, Molet J, Thomson S, O'Callaghan J, Eisenberg E, Milbouw G, Buchser E* (2007) Spinal cord stimulation versus conventional medical management for neuropathic pain: a multicentre randomised controlled trial in patients with failed back surgery syndrome. *Pain* 132: 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.07.028>
26. Medtronic Indications, Safety & Warnings for Spinal Cord Stimulation Medtronic (2018) Accessed April 4th, 2022.
27. *Angeli CA, Edgerton VR, Gerasimenko YP, Harkema SJ* (2014) Altering spinal cord excitability enables voluntary movements after chronic complete paralysis in humans. *Brain* 137:1394–1409. <https://doi.org/10.1093/brain/awu038>

28. *Harkema S, Gerasimenko Y, Hodes J, Burdick J, Angeli C, Chen Y, Ferreira C, Willhite A, Rejc E, Grossman RG, Edgerton VR* (2011) Effect of epidural stimulation of the lumbosacral spinal cord on voluntary movement, standing, and assisted stepping after motor complete paraplegia: a case study. *Lancet* 377: 1938–1947.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60547-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60547-3)
29. *Hachmann JT, Yousak A, Wallner JJ, Gad PN, Edgerton VR, Gorgey AS* (2021) Epidural spinal cord stimulation as an intervention for motor recovery after motor complete spinal cord injury. *J Neurophysiol* 126(6): 1843–1859.
<https://doi.org/10.1152/jn.00020.2021>
30. *Gerasimenko YP, Lu DC, Modaber M, Zdunowski S, Gad P, Sayenko DG, Morikawa E, Haakana P, Ferguson AR, Roy RR, Edgerton VR* (2015) Noninvasive reactivation of motor descending control after paralysis. *J Neurotrauma* 32: 1968–1980.
<https://doi.org/10.1089/neu.2015.4008>
31. *Gerasimenko Y, Gorodnichev R, Puhov A, Moshonkina T, Savochin A, Selionov V, Roy RR, Lu DC, Edgerton VR* (2015) Initiation and modulation of locomotor circuitry output with multisite transcutaneous electrical stimulation of the spinal cord in noninjured humans. *J Neurophysiol* 113: 834–842.
<https://doi.org/10.1152/jn.00609.2014>
32. *Gorodnichev RM, Pivovarova EA, Pukhov A, Moiseev SA, Savokhin AA, Moshonkina TR, Shcherbakova NA, Kilimnik VA, Selionov VA, Kozlovskaya IB, Edgerton VR, Gerasimenko YP* (2012) Transcutaneous electrical stimulation of the spinal cord: non-invasive tool for activation of locomotor circuitry in human. *Human Physiol* 38: 46–56.
33. *Megia Garcia A, Serrano-Muñoz D, Taylor J, Avendaño-Coy J, Gómez-Soriano J* (2020) Transcutaneous spinal cord stimulation and motor rehabilitation in spinal cord injury: a systematic review. *Neurorehabil Neural Repair* 34(1): 3–12.
<https://doi.org/10.1177/1545968319893298>
34. *Gerasimenko Y, Gorodnichev R, Puhov A, Moshonkina T, Savochin A, Selionov V, Roy RR, Lu DC, Edgerton VR* (2015) Initiation and modulation of locomotor circuitry output with multisite transcutaneous electrical stimulation of the spinal cord in noninjured humans. *J Neurophysiol* 113(3): 834–842.
<https://doi.org/10.1152/jn.00609.2014>
35. *Grishin AA, Bobrova EV, Reshetnikova VV, Moshonkina TR, Gerasimenko YP* (2021) A system for detecting stepping cycle phases and spinal cord stimulation as a tool for controlling human locomotion. *Biomed Engineer* 54(5): 312–316.
<https://doi.org/10.1007/s10527-021-10029-7>
36. *Sunshine MD, Sutor TW, Fox EJ, Fuller DD* (2020) Targeted activation of spinal respiratory neural circuits. *Exp Neurol* 328: 113256.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113256>
37. *Lane MA, White TE, Coutts MA, Jones AL, Sandhu MS, Bloom DC, Bolser DC, Yates BJ, Fuller DD, Reier PJ* (2008) Cervical prephrenic interneurons in the normal and lesioned spinal cord of the adult rat. *J Compar Neurol* 511(5): 692–709.
<https://doi.org/10.1002/cne.21864>
38. *Duffin J, Hoskin RW* (1987) Intracellular recordings from upper cervical inspiratory neurons in the cat. *Brain Res* 435: 351–354.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)91623-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)91623-4)
39. *Lipski J, Duffin J* (1986) An electrophysiological investigation of propriospinal inspiratory neurons in the upper cervical cord of the cat. *Exp Brain Res* 61: 625–637.
<https://doi.org/10.1007/BF00237589>
40. *Bellingham MC, Lipski J* (1990) Respiratory interneurons in the C5 segment of the spinal cord of the cat. *Brain Res* 533(1): 141–146.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91807-S](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91807-S)
41. *Duffin J, Iscoe S* (1996) The possible role of C5 segment inspiratory interneurons investigated by cross-correlation with phrenic motoneurons in decerebrate cats. *Exp Brain Res* 112(1): 35–40.
<https://doi.org/10.1007/BF00227175>
42. *Palisses R, Persegol L, Viala D* (1989) Evidence for respiratory interneurons in the C3–C5 cervical spinal cord in the decorticate rabbit. *Exp Brain Res* 78(3): 624–632.
<https://doi.org/10.1007/BF00230250>
43. *DiMarco AF, Kowalski KE* (2013) Spinal pathways mediating phrenic activation during high frequency spinal cord stimulation. *Resp Physiol Neurobiol* 186: 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.resp.2012.12.003>
44. *Kowalski KE, Romaniuk JR, Kirkwood PA, DiMarco AF* (2019) Inspiratory muscle activation via ventral lower thoracic high-frequency spinal cord stimulation. *J Appl Physiol* (1985) 126: 977–983.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01054.2018>

45. DiMarco AF, Kowalski KE (2013) Activation of inspiratory muscles via spinal cord stimulation. *Respir Physiol Neurobiol* 189: 438–449. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2013.06.001>
46. DiMarco AF, Romaniuk JR, Kowalski KE, Supinski G (1999) Pattern of expiratory muscle activation during lower thoracic spinal cord stimulation. *J Appl Physiol* 86: 1881–1889. <https://doi.org/10.1152/jappl.1999.86.6.1881>
47. DiMarco AF, Kowalski KE (2008) Effects of chronic electrical stimulation on paralyzed expiratory muscles. *J Appl Physiol* 104(6): 1634–1640. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01321.2007>
48. Kowalski KE, Romaniuk JR, Kowalski T, DiMarco AF (2017) Effects of expiratory muscle activation via high-frequency spinal cord stimulation. *J Appl Physiol* 123(6): 1525–1531. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00402.2017>
49. Kastner A, Gauthier P (2008) Are rodents an appropriate pre-clinical model for treating spinal cord injury? Examples from the respiratory system. *Exp Neurol* 213(2): 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.07.008>
50. Mercier LM, Gonzalez-Rothi EJ, Streeter KA, Posgai SS, Poirier AS, Fuller DD, Reier PJ, Baekey DM (2017) Intraspinal microstimulation and diaphragm activation after cervical spinal cord injury. *J Neurophysiol* 117: 767. <https://doi.org/10.1152/jn.00721.2016>
51. Gonzalez-Rothi EJ, Streeter KA, Hanna MH, Stamas AC, Reier PJ, Baekey DM, Fuller DD (2017) High-frequency epidural stimulation across the respiratory cycle evokes phrenic short-term potentiation after incomplete cervical spinal cord injury. *J Neurophysiol* 118(4): 2344–2357. <https://doi.org/10.1152/jn.00913.2016>
52. DiMarco AF, Kowalski KE, Geertman RT, Hromyak DR (2006) Spinal cord stimulation: a new method to produce an effective cough in patients with spinal cord injury. *Am J Respir Crit Care Med* 173: 1386–1389. <https://doi.org/10.1164/rccm.200601-097CR>
53. DiMarco AF, Kowalski KE, Hromyak DR, Geertman RT (2014) Long-term follow-up of spinal cord stimulation to restore cough in subjects with spinal cord injury. *J Spinal Cord Med* 37: 380–388. <https://doi.org/10.1179/2045772313Y.0000000152>
54. Ерохин АН, Кобызев АЕ, Сергеев ОМ, Туровинина ЕФ (2020) Стимуляция диафрагмального нерва посредством модифицированного имплантируемого устройства в комплексе реабилитационных мероприятий после повреждения шейного отдела спинного мозга (случай из практики). *Гений ортопедии* 26: 89–94. [Erokhin AN, Kobizev AE, Sergeenko OM, Turovinina EF (2020) Phrenic nerve stimulation in complex rehabilitation for cervical spinal cord injury using modified implantable device (case report). *Geniy Ortopedii* 26(1): 89–94. (In Russ)]. <https://doi.org/1018019/1028-4427-2020-26-1-89-94>
55. Duffin J, Li YM (2006) Transmission of respiratory rhythm: midline-crossing connections at the level of the phrenic motor nucleus? *Respir Physiol Neurobiol* 153(2): 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2005.09.011>
56. Tian GF, Duffin J (1996) Spinal connections of ventral-group bulbospinal inspiratory neurons studied with cross-correlation in the decerebrate rat. *Exp Brain Res* 111(2): 178–186. <https://doi.org/10.1007/BF00227296>
57. Minyaeva AV, Moiseev SA, Pukhov AM, Savokhin AA, Gerasimenko YP, Moshonkina TR (2017) Response of external inspiration to the movements induced by transcutaneous spinal cord stimulation. *Human Physiol* 43(5): 524–531. <https://doi.org/10.1134/S0362119717050115>
58. Moshonkina TR, Scherbakova NA, Moiseev SA, Minyaeva AV, Gerasimenko YP (2020) Regulation of respiration during electrical stimulation of the lumbar spinal cord in humans. *Integrat Physiol* 1: 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2017.04.011>
59. Gad P, Kreydin E, Zhong H, Edgerton VR (2020) Spinal Networks and Spinal Cord Injury: A Tribute to Reggie Edgerton: Enabling respiratory control after severe chronic tetraplegia: an exploratory case study. *J Neurophysiol* 124(3): 774. <https://doi.org/10.1152/jn.00320.2020>
60. Del Negro CA, Funk GD, Feldman JL (2018) Breathing matters. *Nat Rev Neurosci* 19(6): 351–367. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0003-6>
61. Miller J, Eldabe S, Buchser E, Johaneck LM, Guan Y, Linderoth B (2016) Parameters of spinal cord stimulation and their role in electrical charge delivery: a review. *Neuromodulation: Technology at the Neural Interface* 19(4): 373–384. <https://doi.org/10.1111/ner.12438>
62. Joosten EA, Franken G (2020) Spinal cord stimulation in chronic neuropathic pain: mechanisms of action, new locations, new paradigms. *Pain* 161(1): S104. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001854>

63. Shandybina ND, Kuropatenko MV, Moshonkina TR (2022) Relevance of the transcutaneous spinal cord stimulation for regulation of the external respiration. *Motor Control* 122.

Regulation of Human Respiration by Electrical Stimulation

N. D. Shandybina^{a, b, *}, M. V. Kuropatenko^b, and T. R. Moshonkina^a

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

^b*Institute of the Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia*

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

The review considers modern methods of electrical stimulation used to regulate the function of external respiration in humans. Methods include abdominal functional stimulation of the respiratory muscles, stimulation of the diaphragm, stimulation of the phrenic nerve, epidural and transcutaneous stimulation of the spinal cord. Physiological basis of their application is described along with the examples of their use in the clinic. Stimulation parameters and electrode localization are listed for each of the methods. We analysed the effectiveness of using each of the methods of electrical stimulation in patients with paresis of the respiratory muscles and the features of their use depending on the level of spinal cord injury. Special attention is paid to the method of epidural stimulation of the spinal cord since this method is used in electrophysiological studies on animal models and provides knowledge about the spinal levels of functional regulation of external respiration. The review substantiates the great potential of using the method of transcutaneous electrical spinal cord stimulation both in fundamental research on the function of external respiration and in clinical practice.

Keywords: breathing, spinal cord stimulation, electrical diaphragm stimulation, transcutaneous stimulation, mechanical ventilation, spinal cord injury

УРОВНИ ИНСУЛИНА И ЛЕПТИНА В КРОВИ И СТРУКТУРАХ МОЗГА КРЫС С ДИЕТА-ИНДУЦИРОВАННЫМ ОЖИРЕНИЕМ И ВЛИЯНИЕ НА НИХ РАЗЛИЧНЫХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

© 2022 г. К. В. Деркач^{1, *}, В. Н. Сорокоумов², А. А. Бахтюков¹,
В. М. Бондарева¹, А. О. Шпаков^{1, 3}

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

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

³*Медицинский факультет, Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия*

*E-mail: derkach_k@list.ru

Поступила в редакцию 10.08.2022 г.

После доработки 01.09.2022 г.

Принята к публикации 27.09.2022 г.

При ожирении инсулиновые и лептиновые пути в мозге и периферических тканях ослабевают. В мозге одной из причин этого является нарушение транспорта инсулина и лептина через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), показателем чего является изменение соотношения их концентраций в кровотоке и в структурах мозга. Однако такие изменения при ожирении и влияние на них фармакологических препаратов практически не изучены. Цель работы состояла в оценке уровней инсулина и лептина в структурах мозга (гипоталамусе, мозжечке) и их соотношений с таковыми в крови у самцов крыс с ожирением, вызванным длительной комбинированной высококалорийной диетой, а также в изучении влияния на эти показатели 4-недельного лечения крыс с ожирением с помощью метформина (200 мг/кг/сутки), бромокриптина (0.6 мг/крысу/сутки) и интраназально вводимым инсулином (ИВИ) (0.5 МЕ/крысу/сутки) и их двухнедельной обработки Р14, ингибитором фосфатазы 1В (РТР1В) (10 мг/кг/сутки). Показано, что при ожирении на фоне гиперинсулинемии и гиперлептинемии ослабляется транспорт инсулина и лептина через ГЭБ в гипоталамус и мозжечок, что приводит к значительному возрастанию соотношений концентрации этих гормонов в крови и структурах мозга. Лечение метформином не только нормализовало метаболические показатели и чувствительность к инсулину и лептину, но и в полной мере восстанавливало уровни инсулина и лептина в мозге. Лечение ИВИ и бромокриптином было менее эффективным. Обработка Р14 вызывала значительное снижение массы тела и жировой ткани у крыс с ожирением, уменьшала потребление ими пищи, улучшала метаболические показатели и повышала чувствительность к инсулину и лептину. Ингибитор РТР1В также восстанавливал соотношение концентраций инсулина и лептина в крови и структурах мозга, но не вследствие повышения их уровня в мозге, как в случае метформина, а в результате значительного снижения концентраций гормонов в крови. Полученные данные указывают на то, что лечение различными по химической природе и механизмам действия препаратами, улучшающими метаболические и гормональные показатели при ожирении, приводит к нормализации соотношения инсулина и лептина на периферии и в ЦНС, восстанавливая, тем самым, инсулиновый и лептиновый сигналинг в гипоталамусе и других отделах мозга и центральную инсулиновую и лептиновую регуляцию метаболических процессов на периферии.

Ключевые слова: ожирение, гипоталамус, мозжечок, инсулин, лептин, метформин, интраназально вводимый инсулин, бромокриптин, протеинфосфотирозинфосфатаза 1В

DOI: 10.31857/S0869813922110024

Характерными особенностями ожирения, а также ассоциированных с ним метаболического синдрома и сахарного диабета 2-го типа являются развитие резистентности тканей-мишеней к инсулину (ИР) и лептину (ЛР) и, как следствие, обусловленное этим нарушение регуляции множества физиологических и биохимических процессов [1, 2]. В условиях снижения чувствительности тканей к инсулину и лептину компенсаторно повышается продукция инсулина β -клетками поджелудочной железы и лептина адипоцитами жировой ткани, что приводит к гиперинсулинемии и гиперлептинемии. Мишенями инсулина и лептина у человека и животных являются не только периферические ткани, но и мозг, в первую очередь гипоталамические структуры, через которые эти гормоны осуществляют центральную регуляцию метаболизма, контролируют функции нервной, эндокринной и других систем организма [3–5]. В гипоталамических нейронах имеются все основные компоненты инсулиновой и лептиновой систем, включая инсулиновые рецепторы (преимущественно нейрональная форма) и полноразмерные лептиновые рецепторы ObRb [3]. При этом лептин в ЦНС не синтезируется и поступает к структурам мозга только из кровотока, посредством рецептор-опосредуемого эндоцитоза, в то время как инсулин в мозге может синтезироваться только на ранних стадиях развития, а во взрослом состоянии поступает в основном или исключительно с периферии, путем трансцитоза с участием инсулиновых рецепторов [6–8]. Вследствие этого активность регулируемых инсулином и лептином сигнальных систем в гипоталамусе и других отделах мозга в значительной степени определяется эффективностью их транспорта через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) из кровотока.

Нами ранее было продемонстрировано снижение содержания лептина в гипоталамусе у крыс с диета-индуцированным ожирением и у агути-мышей с генетически-обусловленным ожирением, несмотря на значительное повышение его концентрации в крови [9, 10]. Нарушение транспорта лептина в мозг было показано и другими авторами на моделях ожирения у мышей [11–13]. На фоне выраженной гиперинсулинемии у агути-мышей нами было обнаружено снижение в гипоталамусе содержания инсулина [10]. Помимо нашего исследования имеется лишь одна работа, авторы которой продемонстрировали снижение уровня инсулина в цереброспинальной жидкости крыс с диабетом 2-го типа [14]. Уровень инсулина в гипоталамусе и других структурах мозга при диета-индуцированном ожирении до настоящего времени не изучался. Улучшение транспорта инсулина и лептина через ГЭБ может рассматриваться как один из перспективных путей для нормализации инсулинового и лептинового сигналинга в гипоталамусе при метаболических расстройствах. Однако исследования влияния различных фармакологических препаратов, используемых для улучшения чувствительности тканей к инсулину и лептину, на их транспорт через ГЭБ и на соотношение концентраций инсулина и лептина на периферии и в мозге отсутствуют.

Основываясь на вышесказанном, целью работы было изучить соотношение уровней инсулина и лептина в крови, гипоталамусе и мозжечке самцов крыс с ожирением, вызванным длительной высококалорийной диетой, и оценить влияние на него лечения животных метформином, интраназально вводимым инсулином (ИВИ), бромокриптином и этил 3-(гидроксиметил)-4-оксо-1,4-дигидроциннолин-6-карбоксилатом (PI4), ингибитором протеинфосфотирозинфосфатазы 1В (PTP1B). Выбор препаратов был обусловлен следующими фактами (рис. 1). Метформин, который применяется для лечения сахарного диабета 2-го типа, ожирения и метабо-

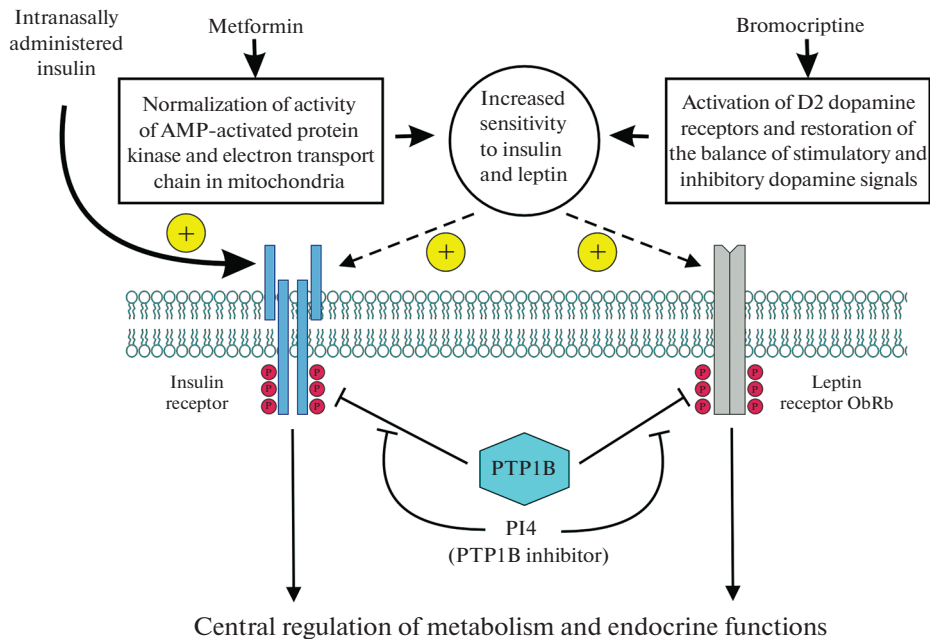


Рис. 1. Мишени действия метформина, интраназально вводимого инсулина, бромокриптина и PI4, ингибитора PTP1B, и их возможное влияние на инсулиновый и лептиновый сигналинг в гипоталамусе при ожирении.

лического синдрома, в значительной степени повышает чувствительность тканей к инсулину и лептину, нормализуя, тем самым, углеводный и липидный обмен [15, 16]. Синтезированное и изученное нами ранее соединение PI4 посредством ингибирования активности фосфатазы PTP1B, негативного регулятора инсулинового и лептинового сигналинга, ослабляет ИР и ЛР, подавляет потребление пищи и снижает массу тела, что указывает на его перспективность для коррекции ожирения и других метаболических расстройств [17]. С этой целью в настоящее время разрабатываются и другие классы ингибиторов PTP1B [18–20]. ИВИ, минуя ГЭБ, восполняет дефицит инсулина в мозге и, тем самым, активирует инсулиновые сигнальные пути и опосредованно влияет на лептиновую сигнализацию, которая в гипоталамусе положительно ассоциирована с инсулиновыми сигнальными путями [3, 21, 22]. При ожирении D2-дофаминовая сигнализация в ЦНС, в том числе в гипоталамусе, ослабляется, вследствие чего для ее компенсации может быть использована терапия D2-агонистом бромокриптином [3, 23]. Лечение пациентов с диабетом 2-го типа с помощью бромокриптина нормализует массу тела и улучшает глюкозный гомеостаз, что связывают с улучшением чувствительности к инсулину и лептину [24, 25], причем такое лечение наиболее эффективно при наличии у пациентов ожирения и сердечно-сосудистых дисфункций [26]. Наряду с уровнями инсулина и лептина в крови и структурах мозга мы оценивали влияние избранных для изучения препаратов на массу тела и жировой ткани, пищевое поведение, глюкозный гомеостаз, уровни липидов, стимулированные глюкозой уровни инсулина и лептина, а также на генную экспрессию рецепторов инсулина и лептина и фермента PTP1B в гипоталамусе. Выбор мозжечка был обусловлен необходимостью оценить изменение транспорта инсулина и лептина через ГЭБ не только в гипоталамусе, но и в других

отделах мозга, чтобы исключить трактовку выявленных изменений как специфич-ных только для гипоталамуса.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все эксперименты, включающие уход за животными, их использование для изучения метаболических и гормональных показателей, а также лечение с помощью фармакологических препаратов осуществляли в строгом соответствии с требованиями Этического комитета ИЭФБ РАН (протокол № 05-04/2021 от 27.04.2021 г.), European Communities Council Directive 1986 (86/609/ЕЕС) и “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”.

В экспериментах использовали самцов крыс Вистар, которых содержали в стандартных условиях вивария. Ожирение вызывали переводом животных на 26-й день после рождения (P26) на комбинированную высококалорийную диету. Она включала потребление насыщенных жиров в виде маргарина (5–7 г маргарина/крысу/сутки, в зависимости от возраста) как дополнение к стандартному сухому корму и потребление 30%-ного раствора сахарозы вместо питьевой воды. Контрольные крысы потребляли стандартный сухой корм и обычную воду. Крысы экспериментальных групп находились на диете в течение трех с половиной месяцев, после чего их тестируют, отбирая животных с повышенной массой тела (на 10% выше среднего значения в контрольной группе), повышенным уровнем постпрандиальной глюкозы (на 25% выше среднего значения в контрольной группе), а также с нарушенной толерантностью к глюкозе, которую оценивали с помощью интраперитонеального глюкозотолерантного теста (ИГТТ). При проведении ИГТТ крысам в/б вводили раствор глюкозы из расчета 2 г/кг и измеряли уровень глюкозы в крови до и через 15, 30, 60 и 120 мин после нагрузки. По результатам ИГТТ рассчитывали интегрированную площадь под глюкозной концентрационной кривой (AUC_{0-120}), которая у крыс, отобранных для дальнейших исследований, была не менее чем на 10% выше средних значений в контрольной группе.

Отобранных животных с ожирением случайным образом делили на 5 групп (в каждой по 6 животных): крысы с ожирением без лечения (ОЖ), крысы с ожирением, леченные в течение 4 нед. метформин (200 мг/кг/сутки, перорально) (ОЖ + МФ), инсулином (0.5 МЕ/крысу, интраназально) (ОЖ + ИВИ) и бромкриптином (0.6 мг/кг/сутки, перорально) (ОЖ + БК), а также крысы с ожирением, обрабатываемые в течение двух недель этил 3-(гидроксиэтил)-4-оксо-1,4-дигидроциннолин-6-карбоксилатом (P14, 10 мг/кг/сутки, в/б) (ОЖ + P14). Выбор используемых доз препаратов был основан на результатах предварительных экспериментов и наших предыдущих исследований [17, 23, 27–29]. Соединение P14 было синтезировано с помощью реакции Соногаширы, катализируемой ациклическими диаминокарбеновыми комплексами палладия (II), и реакции Рихтера, используемой для формирования циннолинового ядра, как описано ранее [17]. Структура соединения P14 была доказана с помощью ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения: 1) ^1H -ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆), δ : 13.56 (s, 1H), 8.61 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 8.22 (dd, J = 8.9, 1.9 Hz, 1H), 7.66 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 5.00 (s, 1H), 4.54 (s, 2H), 4.36 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 1.36 (t, J = 7.1 Hz, 3H); 2) ^{13}C -ЯМР (101 МГц, DMSO), δ : 170.08, 165.28, 150.90, 143.77, 133.38, 126.92, 125.61, 121.45, 117.56, 61.55, 58.99, 14.63; 3) масс-спектрометрия ($\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$) $[M + H]^+ = 249.0883$.

Лечение препаратами начинали через две недели после тестирования и распределения крыс на группы, в случае P14 – через 4 нед., при этом до и во время лечения продолжая содержать крыс на высококалорийной диете. В день, когда животных декапитировали, лечение препаратами не проводили. Контрольным крысам в/б вводили физиологический раствор. В процессе лечения оценивали массу тела

животных и потребление корма (в килокалориях). За 3 дня до окончания эксперимента проводили ИГТТ, оценивая чувствительность к глюкозе, базовые и стимулированные глюкозой уровни инсулина и лептина, а также уровень гликированного гемоглобина. Образцы крови для определения уровней липидов и свободных жирных кислот забирали непосредственно перед декапитацией. Забор крови из хвостовой вены осуществляли в условиях местной анестезии, для которой использовали раствор лидокаина (из расчета 2–4 мг/кг).

В конце эксперимента крыс наркотизировали хлоральгидратом (400 мг/кг, в/б), декапитировали, забирали образцы тканей гипоталамуса и мозжечка, которые тщательно отмывали от крови и тканевой жидкости, после чего их использовали для определения гормонов и, в случае гипоталамуса, для оценки экспрессии целевых генов. Уровни глюкозы в крови, в том числе при проведении ИГТТ, оценивали с помощью тест-полосок “One Touch Select” (США) и глюкометра (“Life Scan Johnson & Johnson”, Дания). Уровни инсулина и лептина в крови и образцах тканей гипоталамуса и мозжечка измеряли с помощью ИФА-наборов “Rat Insulin ELISA” (“Merckodia”, Швеция) и “ELISA for Leptin, Rat” (“Cloud-Clone Corp.”, США), как описано ранее [10]. Уровень свободных жирных кислот (СЖК) измеряли с помощью набора “NEFA FS kit” (“DiaSys”, Германия), содержание гликированного гемоглобина – с помощью набора “Multi Test HbA1c System kit” (“Polymer Technology Systems”, США), концентрацию триглицеридов и общего холестерина – с помощью тест-полосок “Triglycerides multiCare-in” и “Cholesterol multiCare-in” (“Biochemical Systems Int.”, Италия).

Для определения содержания лептина и инсулина в гипоталамусе и мозжечке образцы тканей гомогенизировали в соотношении 1 : 10 в лизирующем буфере, содержащем 20 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 150 мМ хлорида натрия, 2 мМ ЭДТА, 2 мМ ЭГТА, 0.25 М сахарозы, 0.5% Triton X-100, 0.5% дезоксихолата натрия, 15 мМ фторида натрия, 10 мМ глицерофосфата натрия, 10 мМ пирогосфата натрия, 1 мМ ортованадата натрия, 1 мМ фенилметилсульфонилфторида, 0.02% азида натрия и коктейль ингибиторов протеаз (“Sigma-Aldrich”, США). Полученные гомогенаты центрифугировали (10000 g, 5 мин) и измеряли концентрацию лептина и инсулина в надосадочной жидкости согласно инструкции производителя, как описано нами ранее [10].

Экспрессию мРНК для генов, кодирующих рецептор инсулина (*InsR*) и полно-размерную форму рецептора лептина (*ObRb*), а также фермент фосфатазу РТР1В (*Ptp1b*) осуществляли с помощью ПЦР в реальном времени. Для этого из ткани гипоталамуса выделяли тотальную РНК с помощью реагента Extract RNA (“Evrogen”, Россия). Обратную транскрипцию проводили с использованием набора “MMLV RT Kit” (“Evrogen”, Россия), экспрессию оценивали с помощью амплификатора 7500 Real-Time PCR System (“Thermo Fisher Scientific Inc.”, США). Для оценки экспрессии генов в гипоталамусе крыс использовали следующие праймеры: для гена *InsR* – CTGGAGAAGTCTCGGTCATT (For) и GGCCATAGACACGGAAAAGAAG (Rev), для гена *ObRb* – GCATGCAGTAATCAGTGATATTTGG (For) и CAAGCTGTATCGCACT-GATTTCTTC (Rev), для гена *Ptp1b* – CAACCGAGGAGGAACAAAAGG (For) и CAGTCTGTCTAGTGAAAACATACCCG (Rev). В качестве референсных использовали ген *18S RNA* и ген, кодирующий β-актин (*Actb*). Результаты анализировали методом $\Delta\Delta C_t$ и с использованием программного обеспечения 7500 Software v2.0.6 и Expression Suite Software v1.0.3. Значения RQ рассчитывали по отношению к контрольной группе животных, как описано ранее [27].

Статистический анализ полученных данных осуществляли с помощью программы “Microsoft Office Excel 2007”. Результаты представляли как среднее \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения двух выборок с нормальным распределением использовали *t*-критерий Стьюдента, для сравнения трех и более групп –

Таблица 1. Масса тела и жировой ткани, потребление корма, уровни постпрандиальной глюкозы, гликированного гемоглобина и липидов у крыс с ожирением, а также влияние на эти показатели обработки метформином, интраназальным инсулином, бромокриптином и РТР1В-ингибитором Р14

Параметр	К	ОЖ	ОЖ + МФ	ОЖ + ИВИ	ОЖ + БК	ОЖ + Р14
Масса, г	373.2 ± 10.4	427.0 ± 9.3*	381.8 ± 9.5#	405.2 ± 11.2	403.8 ± 9.6	367.3 ± 12.9#
Масса АЖ, г	5.5 ± 0.2	11.8 ± 1.0*	7.2 ± 0.6#	9.9 ± 0.6*	9.3 ± 0.5*	6.1 ± 0.4#
Масса ЭЖ, г	3.6 ± 0.2	6.1 ± 0.6*	3.9 ± 0.2#	5.3 ± 0.3*	5.3 ± 0.6*	3.2 ± 0.2#
Доля жира, %	2.4 ± 0.1	4.2 ± 0.3*	2.9 ± 0.2#	3.7 ± 0.1*	3.6 ± 0.2*	2.5 ± 0.1#
Корм, ккал/крысу/ день	78.3 ± 4.7	110.3 ± 4.4*	87.0 ± 3.2#	102.3 ± 3.6*	102.8 ± 2.8*	54.8 ± 2.6*#
Глюкоза, мМ	3.92 ± 0.06	5.07 ± 0.28*	4.43 ± 0.36	4.43 ± 0.48	4.90 ± 0.32	4.62 ± 0.31
HbA1c, %	4.05 ± 0.15	4.75 ± 0.32	4.23 ± 0.17	4.37 ± 0.22	4.35 ± 0.29	3.75 ± 0.22
ТГ, мМ	2.02 ± 0.08	3.13 ± 0.27*	2.25 ± 0.11#	2.40 ± 0.21	2.82 ± 0.12*	1.93 ± 0.16#
ОХ, мМ	4.08 ± 0.17	5.15 ± 0.26*	4.45 ± 0.27	4.88 ± 0.28	5.32 ± 0.27*	4.85 ± 0.16*
СЖК, мМ	3.58 ± 0.14	4.63 ± 0.35	3.45 ± 0.16#	3.83 ± 0.19	4.27 ± 0.22	3.25 ± 0.16#

АЖ – абдоминальный жир, ЭЖ – эпидидимальный жир, HbA1c – гликированный гемоглобин, ТГ – триглицериды, ОХ – общий холестерин, СЖК – свободные жирные кислоты. Различия с контролем (*) и группой “ОЖ” (#) статистически значимы при $p < 0.05$. Данные представлены как $M \pm SEM$, $n = 6$ в каждой группе.

дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони. Достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У крыс группы “ОЖ”, наряду со значительным повышением массы тела и жировой ткани, отмечали повышение уровней триглицеридов и общего холестерина (табл. 1). Уровень гликированного гемоглобина в группе “ОЖ” имел тенденцию к повышению, но значимо от контроля не отличался ($p = 0.056$). У крыс с ожирением была нарушена толерантность к глюкозе, о чем свидетельствует более высокое расположение концентрационной кривой для глюкозы в ИГТТ в сравнении с контрольными крысами, а также повышенные значения уровня глюкозы через 120 мин после глюкозной нагрузки и показателя AUC_{0-120} для глюкозных кривых в ИГТТ (рис. 2). В группе “ОЖ” были повышены в сравнении с контролем уровни инсулина и лептина, как базовые, так и стимулированные глюкозой, а также рассчитанные индексы ИР как до, так и через 120 мин после глюкозной нагрузки (рис. 3). Одной из причин метаболических и гормональных расстройств является повышенное потребление крысами группы “ОЖ” высококалорийной пищи (табл. 1).

Лечение метформином в значительной степени нормализовало эти показатели, значимо снижая в сравнении с группой “ОЖ” массу тела и жировой ткани, долю жировой ткани, потребление корма, уровни триглицеридов, СЖК, инсулина и лептина, индекс ИР, а также улучшая чувствительность к глюкозе, о чем свидетельствует снижение уровня глюкозы через 120 мин после глюкозной нагрузки и значения AUC_{0-120} для глюкозных кривых до их уровня в контроле (табл. 1, рис. 2, 3). Лечение ИВИ и бромокриптином было менее эффективным, сравнительно слабо влияя на массу тела и жира и пищевое поведение, показатели липидного обмена и глюкозный гомеостаз (табл. 1, рис. 2, 3). В то же время ИВИ существенно ослаблял гиперинсулинемию и повышал чувствительность периферических тканей к инсулину, что иллюстрируется снижением в группе “ОЖ + ИВИ” в сравнении с груп-

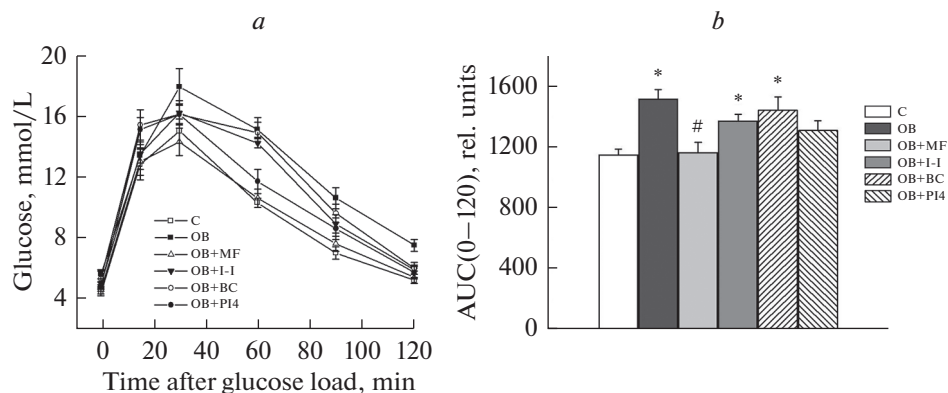


Рис. 2. Глюкозные концентрационные кривые в ИГТТ (а) и значения AUC_{0-120} для этих кривых (б) у крыс с ожирением и влияние на них обработки животных метформином, ИВИ, бромокриптином и РТР1В-ингибитором P14. Обозначения групп: С – “К”, ОВ – “ОЖ”, ОВ + MF – “ОЖ + МФ”, ОВ + I-I – “ОЖ + ИВИ”, ОВ + ВС – “ОЖ + БК”, ОВ + P14 – “ОЖ + P14”. Для AUC_{0-120} различия с контролем (*) и группой “ОЖ” (#) статистически значимы при $p < 0.05$. Данные представлены как $M \pm SEM$, $n = 6$ в каждой группе.

пой “ОЖ” индекса ИР, как базового, так и через 120 мин после глюкозной нагрузки (рис. 3). Лечение бромокриптином значимо снижало глюкоза-стимулированный уровень лептина (рис. 3).

В группе “ОЖ + БК” также отмечали тенденцию к снижению в сравнении с группой “ОЖ” базового уровня лептина ($p = 0.055$), а также уровня инсулина ($p = 0.069$) и индекса ИР ($p = 0.051$) через 120 мин после нагрузки глюкозой (рис. 3). Двухнедельная обработка животных с помощью P14, ингибитора РТР1В, вызывала резкое снижение потребления пищи (ниже такового в контроле), что приводило к значимому снижению массы тела, абдоминального и эпидидимального жира, адипозности, уровней триглицеридов и СЖК, уровней глюкозы, инсулина и лептина через 120 мин после глюкозной нагрузки, а также базового уровня лептина (табл. 1, рис. 3). Отмечали улучшение чувствительности к инсулину, о чем свидетельствует снижение значений индекса ИР, а также частичное восстановление толерантности к глюкозе, поскольку значение AUC_{0-120} для глюкозных кривых в группе “ОЖ + P14” значимо не отличалось от такового в контроле (рис. 2, 3).

Сравнительное изучение содержания инсулина и лептина в крови и структурах мозга показало, что, несмотря на сильно выраженную системную гиперинсулинемию и гиперлептинемию, уровни инсулина и лептина в гипоталамусе и взятом для сравнения мозжечке не отличались от таковых в контроле, а в случае лептина в гипоталамусе даже достоверно снижались в сравнении с группой “К”, что указывает на ослабление транспорта этих гормонов через ГЭБ в условиях инсулиновой и лептиновой резистентности (табл. 2).

Рассчитанное соотношение концентраций инсулина и лептина в крови и структурах мозга при ожирении было значимо выше, чем в контроле. Так, соотношение концентраций инсулина и лептина в крови и гипоталамусе в группе “ОЖ” было соответственно в 3.1 и 6.4 раза выше, чем в группе “К”. Лечение метформином нормализовало уровни инсулина и лептина как в крови, так и в структурах мозга, вследствие чего соотношение концентраций инсулина и лептина в крови и гипоталамусе или мозжечке было сходным с таковым для контрольных животных и зна-

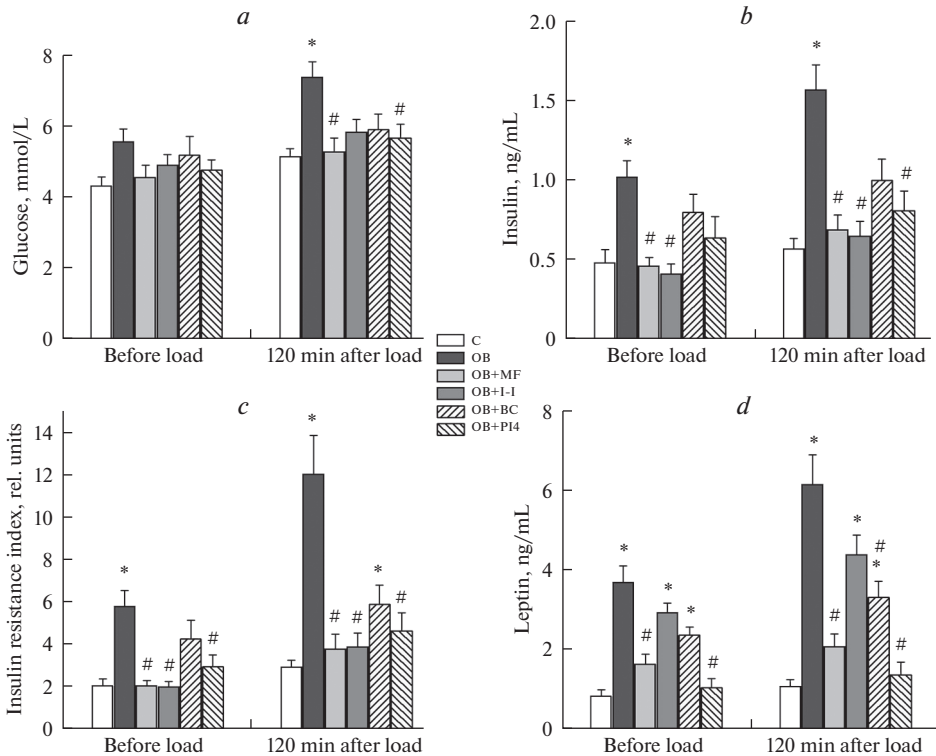


Рис. 3. Уровни глюкозы, инсулина и лептина в крови до и через 120 мин после глюкозной нагрузки в ИГТТ, а также рассчитанные индексы ИР у крыс с ожирением и влияние на эти показатели обработки метформином, ИВИ, бромкриптином и РТР1В-ингибитором P14.

(a) – глюкоза, (b) – инсулин, (c) – индекс ИР, (d) – лептин. Обозначения групп: С – “К”, ОВ – “ОЖ”, ОВ + MF – “ОЖ + МФ”, ОВ + I-I – “ОЖ + ИВИ”, ОВ + BC – “ОЖ + БК”, ОВ + P14 – “ОЖ + P14”.

Значения индекса ИР рассчитаны, как произведение концентраций глюкозы и инсулина в крови перед нагрузкой глюкозой (ИР-0) или через 120 мин после нее (ИР-120). Различия с контролем (*) и группой “ОЖ” (#) статистически значимы при $p < 0.05$. Данные представлены как $M \pm SEM$, $n = 6$ в каждой группе.

чимо снижалось в сравнении с группой “ОЖ” (табл. 2). ИВИ был в этом отношении менее эффективен, и соотношение инсулина в крови и мозжечке и лептина в крови и обеих структурах мозга оставалось значимо выше, чем в контроле (табл. 2). Лечение бромкриптином в большей степени влияло на уровни лептина, так что соотношение концентраций этого адипокина в крови и гипоталамусе было значимо ниже, чем в группе “ОЖ”, а для соотношения уровней лептина в крови и мозжечке отмечалась тенденция к снижению этого показателя ($p = 0.057$). Однако в обоих случаях сохранялись значимые различия от контрольной группы (табл. 2). Ингибитор РТР1В восстанавливал соотношение концентраций инсулина и лептина в крови и структурах мозга, но не вследствие их нормализации в ЦНС, а в результате значительного снижения концентрации этих гормонов в крови (табл. 2). Так, например, уровни лептина в группе “ОЖ + P14” в мозге были сходными с таковыми в группе “ОЖ”, в то время как соотношение концентраций лептина в крови и гипоталамусе или мозжечке были снижены соответственно в 3.3 и 4.2 раза.

Оценка экспрессии генов, кодирующих инсулиновый (*InsR*) и лептиновый рецепторы (*ObRb*) в гипоталамусе крыс с ожирением, показала тенденцию к ее воз-

Таблица 2. Содержание инсулина и лептина в крови, гипоталамусе и мозжечке крыс с ожирением и влияние на них обработки метформином, ИВИ, бромокриптином и РТР1В-ингибитором Р14

Параметр	К	ОЖ	ОЖ + МФ	ОЖ + ИВИ	ОЖ + БК	ОЖ + Р14
Инсулин, нг/мл (кровь)	0.58 ± 0.08	1.18 ± 0.15*	0.62 ± 0.11#	0.51 ± 0.07#	0.88 ± 0.13	0.59 ± 0.11#
Инсулин, нг/г (гипот.)	1.30 ± 0.17	0.88 ± 0.07	1.15 ± 0.12	0.76 ± 0.10	1.03 ± 0.08	1.01 ± 0.06
Инсулин, нг/г (мозж.)	1.03 ± 0.13	0.61 ± 0.04	1.07 ± 0.13#	0.63 ± 0.05	0.82 ± 0.07	0.92 ± 0.11
Инсулин, кровь/гипот.	0.44 ± 0.02	1.37 ± 0.19*	0.52 ± 0.06#	0.70 ± 0.09#	0.93 ± 0.21	0.56 ± 0.08#
Инсулин, кровь/мозж.	0.55 ± 0.02	1.90 ± 0.16*	0.56 ± 0.06#	0.81 ± 0.08*#	1.13 ± 0.23	0.65 ± 0.09#
Лептин, нг/мл (кровь)	0.85 ± 0.14	3.45 ± 0.38*	1.64 ± 0.29#	2.38 ± 0.28*	2.12 ± 0.23*	0.94 ± 0.19#
Лептин, нг/г (гип.)	5.16 ± 0.48	3.38 ± 0.21*	4.21 ± 0.29	3.70 ± 0.31	4.15 ± 0.43	3.10 ± 0.41*
Лептин, нг/г (мозж.)	2.07 ± 0.15	1.57 ± 0.16	2.31 ± 0.22#	1.84 ± 0.19	2.17 ± 0.15#	1.67 ± 0.19
Лептин, кровь/гипот.	0.16 ± 0.02	1.03 ± 0.12*	0.39 ± 0.08#	0.67 ± 0.12*	0.55 ± 0.10*#	0.31 ± 0.05#
Лептин, кровь/мозж.	0.40 ± 0.05	2.37 ± 0.44*	0.73 ± 0.16#	1.37 ± 0.25*	1.00 ± 0.14*	0.56 ± 0.09#

Различия с контролем (*) и группой “ОЖ” (#) статистически значимы при $p < 0.05$. Данные представлены как $M \pm SEM$, $n = 6$ в каждой группе.

растанию в группе “ОЖ”, но различия с контролем не были значимыми. В случае экспрессии гена РТР1В (*Ptp1b*) различия между группами “К” и “ОЖ” отсутствовали (рис. 4). При лечении ИВИ и Р14 отмечали значимое снижение экспрессии гена *InsR* по сравнению с группой “ОЖ”, в то время как при лечении метформином и Р14 — значимое снижение экспрессии гена *ObRb*. В группе “ОЖ + ИВИ” экспрессия гена *InsR* оказалась ниже ее уровня в контроле (рис. 4). Экспрессия гена *Ptp1b* существенно не менялась в группе “ОЖ” и в группах с обработкой метформином, ИВИ и бромокриптином, но в два раза повышалась в группе с лечением Р14 (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Длительная, в течение 4.5 мес. высококалорийная диета приводила к развитию у крыс ожирения и отчетливо выраженных признаков метаболического синдрома — дислипидемии, постпрандиальной гипергликемии, нарушенной толерантности к глюкозе, гиперинсулинемии и гиперлептинемии. Это хорошо согласуется с нашими ранними результатами и данными других авторов об индукции ожирения и широкого спектра метаболических и гормональных расстройств при потреблении корма, обогащенного легкими углеводами и насыщенными жирами [9, 30, 31].

При ожирении, метаболическом синдроме и сахарном диабете 2-го типа функциональная активность инсулиновых и лептиновых сигнальных путей в мозге существенно снижена, что и является одним из молекулярных механизмов развития широкого спектра функциональных нарушений в ЦНС и на периферии, и, по мнению значительного числа исследователей, обусловлено развитием центральной инсулиновой и лептиновой резистентности [32–35]. При этом одной из первопричин развития ИР и ЛР в мозге и на периферии, как правило, является длительное и значительное повышение уровней инсулина и лептина [2]. Однако проведенная

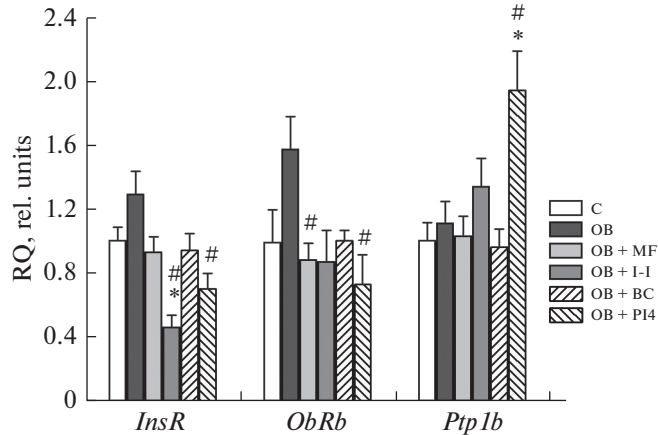


Рис. 4. Экспрессия генов рецептора инсулина (*InsR*), полноразмерного рецептора лептина (*ObRb*) и фосфатазы РТР1В (*Ptp1b*) в гипоталамусе крыс с ожирением и влияние на нее обработки животных метформином, ИВИ, бромкриптином и РТР1В-ингибитором Р14. Обозначения групп: С – “К”, ОВ – “ОЖ”, ОВ + МФ – “ОЖ + МФ”, ОВ + I-I – “ОЖ + ИВИ”, ОВ + ВС – “ОЖ + БК”, ОВ + Р14 – “ОЖ + Р14”. Различия с контролем (*) и группой “ОЖ” (#) статистически значимы при $p < 0.05$. Данные представлены как $M \pm SEM$, $n = 6$ в каждой группе.

нами оценка уровня инсулина и лептина в гипоталамусе и взятом для сравнения мозжечке у крыс с ожирением показала, что уровень этих гормонов, в отличие от такового в крови, не превышает таковой в контроле и даже имеет тенденцию к снижению. Это влечет за собой многократное повышение соотношений между концентрациями инсулина и лептина в крови и исследованных структурах мозга в группе крыс с ожирением. Ранее нами и другими авторами при изучении грызунов с другими формами ожирения было показано, что, несмотря на сильно выраженную гиперинсулинемию и гиперлептинемию уровень инсулина и лептина в структурах мозга у них также не превышает этот показатель у здоровых животных и в небольшой степени снижен, в случае лептина значимо [9–13]. Этот парадокс обусловлен нарушением рецептор-опосредуемого транспорта инсулина и лептина через ГЭБ в условиях периферической ИР и ЛР. Тем самым одной из возможных причин ослабления инсулиновой и лептиновой сигнализации может быть снижение уровня гормонов в ЦНС, а не только и не столько развитие центральной резистентности к ним, являющееся результатом липотоксичности, гипергликемии и нейродегенеративных изменений в мозге. Важно отметить, что, как показано нами, экспрессия генов рецепторов инсулина и лептина в гипоталамусе крыс с ожирением имеет тенденцию к повышению, что может обеспечивать повышение эффективности связывания этих гормонов.

Метформинотерапия в течение 4 нед. в полной мере восстанавливала массу тела, чувствительность к глюкозе и инсулину, оцениваемые в ИГГТ, нормализовала показатели липидного обмена и уровни инсулина и лептина в крови животных. Высокая эффективность метформинотерапии при ожирении, вызванном как диетой, так и генетическими факторами, продемонстрирована как при работе с экспериментальными животными, так и в условиях клиники [10, 15, 16]. Этот эффект метформина во многом обусловлен его способностью восстанавливать метаболизм, нарушенный при ожирении, поскольку основной его мишенью является фермент АМФ-активируемая протеинкиназа, энергетический сенсор клеток, ак-

тивность которого в периферических тканях при ожирении снижается [36, 37]. Метформин не только восстанавливает липидный и углеводный обмен на периферии, но и нормализует передачу нейромедиаторных и гормональных сигналов в ЦНС, в первую очередь в гипоталамусе [38]. Одной из причин этого может быть нормализация рецептор-опосредуемого транспорта инсулина и лептина через ГЭБ как результат вызываемого метформином повышения чувствительности к ним клеток, осуществляющих такой транспорт. Нами показано, что у леченных метформином животных соотношение уровней инсулина и лептина в крови и структурах мозга (гипоталамусе, мозжечке) восстанавливалось до их уровня в контроле, а в гипоталамусе нормализовалась экспрессия генов рецепторов этих гормонов, причем, в случае гена *ObRb* различия с группой “ОЖ” были значимыми. Тем самым, терапевтический эффект метформина на пищевое поведение и периферический метаболизм может быть во многом обусловлено нормализацией транспорта инсулина и лептина через ГЭБ и восстановлением гипоталамических механизмов действия этих гормонов. Следует отметить, что до нас исследований влияния метформиновой терапии на соотношение инсулина и лептина в крови и мозге не проводилось.

Метаболические и гормональные эффекты ИВИ и бромокриптина при ожирении различного генеза с отчетливо выраженными метаболическими и гормональными нарушениями остаются малоизученными, а данные о влиянии этих препаратов на уровни инсулина и лептина в ЦНС отсутствуют. Ранее нами и другими авторами показано, что при метаболическом синдроме и диабете 2-го типа ИВИ восстанавливает когнитивные функции, препятствуя процессам нейродегенерации, нормализует пищевое поведение и периферический метаболизм, улучшая глюкозный гомеостаз [3, 22, 39, 40]. В настоящем исследовании нами было обнаружено существенное снижение ИР при лечении крыс с ожирением с помощью ИВИ, хотя в целом его восстанавливающие эффекты были выражены намного слабее в сравнении с метформином. Положительное влияние ИВИ на инсулиновую чувствительность и метаболические процессы на периферии, как мы полагаем, обусловлено компенсаторным повышением уровня инсулина в гипоталамусе и других отделах мозга крыс с ожирением и, как следствие, активацией инсулиновых и тесно взаимодействующих с ними лептиновых путей. Значительное, на протяжении 4 нед. повышение уровня инсулина в ЦНС вследствие его интраназального введения привело не только к снижению концентрации инсулина в крови как результат центрального эффекта инсулина, но и вызвало значительное снижение экспрессии инсулиновых рецепторов в гипоталамусе, что можно рассматривать как компенсаторную реакцию на их гиперактивацию с помощью ИВИ. Показательно, что в отношении экспрессии лептиновых рецепторов в гипоталамусе такого эффекта выявлено не было.

Лечение бромокриптином, агонистом D2-дофаминовых рецепторов, так же, как и лечение ИВИ, по эффективности уступало лечению метформином, но при этом оказывало существенное влияние на уровни лептина в крови и структурах мозга крыс с ожирением. Лечение бромокриптином не только снижало уровни лептина в крови, ослабляя периферическую ЛР, но и повышало содержание лептина в структурах мозга, что приводило к значимому снижению соотношения концентраций лептина в крови и гипоталамусе. До наших исследований сведения о влиянии бромокриптина на проницаемость ГЭБ для лептина отсутствовали. При этом было обнаружено стимулирующее влияние бромокриптина на перенос лептина с грудным молоком от матери к плоду через мембрану клеток молочной железы, хотя механизмы этого процесса и роль в нем бромокриптина остаются невыясненными [41, 42]. Нами ранее был продемонстрирован ряд положительных эффектов бромокриптиновой терапии на метаболические и гормональные показатели при диабете

2-го типа с ожирением [3, 23]. Имеются многочисленные свидетельства успешного применения препаратов бромкриптина в клинике для лечения гиперфагии, ожирения и других метаболических расстройств [24–26, 43]. Наши данные позволяют предположить, что в основе этого лежит индуцированное бромкриптином восстановление лептиновой и тесно ассоциированной с ней инсулиновой систем в гипоталамусе и, возможно, в других отделах мозга.

Фосфатаза РТР1В является важнейшим негативным регулятором инсулинового и лептинового сигналинга, дефосфорилируя активные формы инсулинового и лептинового рецептора, а также сопряженных с ними белков-субстратов инсулинового рецептора. Повышение экспрессии и активности РТР1В рассматривают как один из ключевых факторов развития ИР и ЛР, в том числе в ЦНС [44]. При ожирении активность РТР1В в гипоталамусе повышается, и это приводит к нарушению анорексигенных путей, реализуемых через лептиновые рецепторы [44]. В настоящее время предпринимаются попытки разработать селективные ингибиторы РТР1В, которые будут способны нормализовать пищевое поведение и предотвращать развитие метаболических нарушений [45]. Нами ранее было синтезировано и изучено соединение Р14, ингибитор РТР1В на основе оксо-1,4-дигидроциннолина, которое проявляло отчетливо выраженный анорексигенный эффект и стимулировало лептиновый сигналинг в гипоталамических нейронах [17]. Его введение крысам с ожирением в течение двух недель приводило к значительному снижению массы тела и жировой ткани, как следствие двукратного в сравнении с группой “ОЖ” сокращения потребления пищи. В гипоталамусе существенно повышалась экспрессия гена *Ptp1b*, которая слабо менялась в других изученных группах, включая группу с ожирением, что является ответом на длительное ингибирование фосфатазы с помощью Р14. Индуцированное Р14 системное повышение чувствительности к инсулину и лептину приводило к снижению уровня этих гормонов в крови, но при этом не влияло на их содержание в структурах мозга, что могло быть следствием снижения концентрации инсулина и лептина в кровотоке. Соотношение гормонов в крови и структурах мозга не отличалось от контрольных значений и было сходным с таковым в группе “ОЖ-МФ”, и это может указывать на приближение эффективности транспорта инсулина и лептина через ГЭБ к таковому у здоровых животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами впервые показано, что при ожирении, вызванном комбинированной высококалорийной диетой, на фоне системной гиперинсулинемии и гиперлептинемии, ассоциированных с ИР и ЛР, отмечается ослабление поступления инсулина и лептина через ГЭБ в гипоталамус и мозжечок. Следствием этого является значительное возрастание соотношения концентраций этих гормонов в крови и в структурах мозга. Четырехнедельное лечение крыс с ожирением с помощью метформина не только нормализовало метаболические показатели, но и в полной мере восстанавливало уровни инсулина и лептина в гипоталамусе и взятом для сравнения мозжечке. Четырехнедельное лечение ИВИ и бромкриптином было в этом отношении менее эффективным. Двухнедельная обработка крыс с ожирением ингибитором РТР1В вызывала значительное снижение у них массы тела и жировой ткани, уменьшала потребление пищи, улучшала метаболические показатели и чувствительность к инсулину и лептину. У животных под влиянием ингибитора РТР1В восстанавливалось соотношение концентраций инсулина и лептина в крови и в структурах мозга, но не вследствие повышения их уровня в мозге, а в результате значительного снижения их концентрации в крови. Полученные данные указывают на то, что лечение различными по химической природе и механизмам действия

препаратами, улучшающими метаболические и гормональные показатели при ожирении, приводит к нормализации соотношения инсулина и лептина на периферии и в ЦНС, восстанавливая, тем самым, инсулиновый и лептиновый сигналинг в гипоталамусе и других отделах мозга. Одной из возможных причин этого может являться восстановление нарушенного в условиях инсулиновой и лептиновой резистентности транспорта инсулина и лептина через ГЭБ. Это может вносить существенный вклад в терапевтические эффекты метформина, ИВИ, бромкриптина и ингибиторов фосфатазы РТР1В при лечении метаболических расстройств и должно стать предметом дальнейшего изучения.

ВКЛАД АВТОРОВ

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

БЛАГОДАРНОСТИ

Определение концентрации гормонов иммуноферментным методом было выполнено с использованием оборудования ЦКП ИЭФБ РАН.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Средства государственного бюджета Минобрнауки России по государственному заданию № 075-0152-22-00 (ИЭФБ РАН).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Könner AC, Brüning JC* (2012) Selective insulin and leptin resistance in metabolic disorders. *Cell Metab* 16: 144–152.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.07.004>
2. *Erichsen JM, Fadel JR, Reagan LP* (2022) Peripheral versus central insulin and leptin resistance: Role in metabolic disorders, cognition, and neuropsychiatric diseases. *Neuropharmacology* 203: 108877.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108877>
3. *Shpakov AO, Derkach KV, Berstein LM* (2015) Brain signaling systems in the Type 2 diabetes and metabolic syndrome: promising target to treat and prevent these diseases. *Future Sci OA* 1: FSO25.
<https://doi.org/10.4155/fso.15.23>
4. *Boucsein A, Kamstra K, Tups A* (2021) Central signalling cross-talk between insulin and leptin in glucose and energy homeostasis. *J Neuroendocrinol* 33: e12944.
<https://doi.org/10.1111/jne.12944>
5. *Rawlinson S, Andrews ZB* (2021) Hypothalamic insulin signalling as a nexus regulating mood and metabolism. *J Neuroendocrinol* 33: e12939.
<https://doi.org/10.1111/jne.12939>
6. *Kastin AJ, Pan W* (2016) Involvement of the Blood-Brain Barrier in Metabolic Regulation. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 15: 1118–1128.
<https://doi.org/10.2174/1871527315666160920124928>
7. *Banks WA* (2020) The Blood-Brain Barrier Interface in Diabetes Mellitus: Dysfunctions, Mechanisms and Approaches to Treatment. *Curr Pharm Des* 26: 1438–1447.
<https://doi.org/10.2174/1381612826666200325110014>
8. *Zhang W, Liu QY, Haqqani AS, Leclerc S, Liu Z, Fauteux F, Baumann E, Delaney CE, Ly D, Star AT, Brunette E, Sodja C, Hewitt M, Sandhu JK, Stanimirovic DB* (2020) Differential expression of receptors mediating receptor-mediated transcytosis (RMT) in brain microvessels, brain parenchyma and peripheral tissues of the mouse and the human. *Fluids Barriers CNS* 17: 47.
<https://doi.org/10.1186/s12987-020-00209-0>

9. Romanova IV, Derkach KV, Mikhrina AL, Sukhov IB, Mikhailova EV, Shpakov AO (2018) The Leptin, Dopamine and Serotonin Receptors in Hypothalamic POMC-Neurons of Normal and Obese Rodents. *Neurochem Res* 43: 821–837.
<https://doi.org/10.1007/s11064-018-2485-z>
10. Derkach K, Zakharova I, Zorina I, Bakhtyukov A, Romanova I, Bayunova L, Shpakov A (2019) The evidence of metabolic-improving effect of metformin in Ay/a mice with genetically-induced melanocortin obesity and the contribution of hypothalamic mechanisms to this effect. *PLoS One* 14: e0213779.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213779>
11. El-Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, Bjørbaek C, Flier JS (2000) Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J Clin Invest* 105: 1827–1832.
<https://doi.org/10.1172/JCI9842>
12. Banks WA, Farrell CL (2003) Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity is acquired and reversible. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: E10–E15.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00468.2002>
13. Pan W, Hsuehou H, He Y, Sakharkar A, Cain C, Yu C, Kastin AJ (2008) Astrocyte leptin receptor (ObR) and leptin transport in adult-onset obese mice. *Endocrinology* 149: 2798–2806.
<https://doi.org/10.1210/en.2007-1673>
14. Hu SH, Jiang T, Yang SS, Yang Y (2013) Pioglitazone ameliorates intracerebral insulin resistance and tau-protein hyperphosphorylation in rats with type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 121: 220–224.
<https://doi.org/10.1055/s-0032-1333277>
15. Grammatiki M, Sagar R, Aijan RA (2021) Metformin: Is it Still the First Line in Type 2 Diabetes Management Algorithm? *Curr Pharm Des* 27: 1061–1067.
<https://doi.org/10.2174/1381612826666201222154616>
16. Kononova YA, Likhonosov NP, Babenko AY (2022) Metformin: Expanding the Scope of Application-Starting Earlier than Yesterday, Canceling Later. *Int J Mol Sci* 23: 2363.
<https://doi.org/10.3390/ijms23042363>
17. Zakharova IO, Sorokoumov VN, Bayunova LV, Derkach KV, Shpakov AO (2018) 4-Oxo-1,4-dihydrocinnoline derivative with phosphatase 1B inhibitor activity enhances leptin signal transduction in hypothalamic neurons. *J Evol Biochem Physiol* 54: 273–280.
18. Bakke J, Haj FG (2015) Protein-tyrosine phosphatase 1B substrates and metabolic regulation. *Semin Cell Dev Biol* 37: 58–65.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.09.020>
19. Nandi S, Saxena M (2020) Potential Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatase (PTP1B) Enzyme: Promising Target for Type-II Diabetes Mellitus. *Curr Top Med Chem* 20: 2692–2707.
<https://doi.org/10.2174/1568026620999200904121432>
20. Singh S, Singh Grewal A, Grover R, Sharma N, Chopra B, Kumar Dhingra A, Arora S, Redhu S, Lather V (2022) Recent updates on development of protein-tyrosine phosphatase 1B inhibitors for treatment of diabetes, obesity and related disorders. *Bioorg Chem* 121: 105626.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.105626>
21. Ott V, Benedict C, Schultes B, Born J, Hallschmid M (2011) Intranasal administration of insulin to the brain impacts cognitive function and peripheral metabolism. *Diabetes Obes Metab* 14: 214–221.
<https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2011.01490.x>
22. Hallschmid M (2021) Intranasal insulin. *J Neuroendocrinol* 33: e12934.
<https://doi.org/10.1111/jne.12934>
23. Derkach KV, Ivantsov AO, Sukhov IB, Shpakov AO (2017) Restoration of hypothalamic signaling systems as a cause of improved metabolic parameters in rats with neonatal diabetes model during treatment with bromocriptine mesylate. *Cell Tissue Biol* 11: 234–241.
<https://doi.org/10.1134/S1990519X17030038>
24. Grunberger G (2013) Novel therapies for the management of type 2 diabetes mellitus: part 1. pramlintide and bromocriptine-QR. *J Diabetes* 5: 110–117.
<https://doi.org/10.1111/1753-0407.12034>
25. Weiland CM, Hilaire ML (2013) Bromocriptine mesylate (Cycloset) for type 2 diabetes mellitus. *Am Fam Physician* 87: 718–720.
26. Siamashvili M, Davis S (2021) Late phase completed clinical trials investigating bromocriptine mesylate quick release as treatment of type 2 diabetes mellitus. *Expert Opin Pharmacother* 22: 241–247.
<https://doi.org/10.1080/14656566.2020.1825683>
27. Bakhtyukov AA, Derkach KV, Sorokoumov VN, Stepanchikina AM, Romanova IV, Morina IY, Zakharova IO, Bayunova LV, Shpakov AO (2021) The Effects of Separate and Combined Treatment of Male Rats with Type 2 Diabetes with Metformin and Orthosteric and Allosteric Agonists of Luteinizing Hormone Receptor on Steroidogenesis and Spermatogenesis. *Int J Mol Sci* 23: 198.
<https://doi.org/10.3390/ijms23010198>

28. *Derkach KV, Bogush IV, Berstein LM, Shpakov AO* (2015) The influence of intranasal insulin on hypothalamic-pituitary-thyroid axis in normal and diabetic rats. *Horm Metab Res* 47: 916–924. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1547236>
29. *Derkach KV, Sukhov IB, Bondareva VM, Shpakov AO* (2018) Effect of metformin on metabolic parameters and hypothalamic signaling systems in rats with obesity induced by a high-carbohydrate and high-fat diet. *Adv Gerontol* 8: 228–234. <https://doi.org/10.1134/S2079057018030037>
30. *Kalivarathan J, Chandrasekaran SP, Kalaivanan K, Ramachandran V, Carani Venkatraman A* (2017) Apigenin attenuates hippocampal oxidative events, inflammation and pathological alterations in rats fed high fat, fructose diet. *Biomed Pharmacother* 89: 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.162>
31. *Li TT, Huang ZR, Jia RB, Lv XC, Zhao C, Liu B* (2021) Spirulina platensis polysaccharides attenuate lipid and carbohydrate metabolism disorder in high-sucrose and high-fat diet-fed rats in association with intestinal microbiota. *Food Res Int* 147: 110530. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110530>
32. *Genchi VA, D’Oria R, Palma G, Caccioppoli C, Cignarelli A, Natalicchio A, Laviola L, Giorgino F, Perrini S* (2021) Impaired Leptin Signalling in Obesity: Is Leptin a New Thermolipokine? *Int J Mol Sci* 22: 6445. <https://doi.org/10.3390/ijms22126445>
33. *Galizzi G, Di Carlo M* (2022) Insulin and Its Key Role for Mitochondrial Function/Dysfunction and Quality Control: A Shared Link between Dysmetabolism and Neurodegeneration. *Biology (Basel)* 11: 943. <https://doi.org/10.3390/biology11060943>
34. *Ortiz GG, Huerta M, González-Usigli HA, Torres-Sánchez ED, Delgado-Lara DL, Pacheco-Moisés FP, Mireles-Ramírez MA, Torres-Mendoza BM, Moreno-Cih RI, Velázquez-Brizuela IE* (2022) Cognitive disorder and dementia in type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes* 13: 319–337. <https://doi.org/10.4239/wjd.v13.i4.319>
35. *Rhea EM, Banks WA, Raber J* (2022) Insulin Resistance in Peripheral Tissues and the Brain: A Tale of Two Sites. *Biomedicines* 10: 1582. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071582>
36. *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>
37. *Szymczak-Pajor I, Wenclewska S, Śliwińska A* (2022) Metabolic Action of Metformin. *Pharmaceuticals (Basel)* 15: 810. <https://doi.org/10.3390/ph15070810>
38. *López M* (2018) Hypothalamic AMPK and energy balance. *Eur J Clin Invest* 48: e12996. <https://doi.org/10.1111/eci.12996>
39. *Dodd GT, Tiganis T* (2017) Insulin action in the brain: Roles in energy and glucose homeostasis. *J Neuroendocrinol* 29: . <https://doi.org/10.1111/jne.12513>
40. *Scherer T, Sakamoto K, Buettner C* (2021) Brain insulin signalling in metabolic homeostasis and disease. *Nat Rev Endocrinol* 17: 468–483. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00498-x>
41. *Younes-Rapoço V, Moura EG, Manhães AC, Peixoto-Silva N, de Oliveira E, Lisboa PC* (2015) Early weaning by maternal prolactin inhibition leads to higher neuropeptide Y and astrogliosis in the hypothalamus of the adult rat offspring. *Br J Nutr* 113: 536–545. <https://doi.org/10.1017/S0007114514003882>
42. *Carvalho JC, Lisboa PC, de Oliveira E, Peixoto-Silva N, Nobre JL, Fraga MC, Manhães AC, Moura EG* (2016) Effects of postnatal bromocriptine injection on thyroid function and prolactinemia of rats at adulthood. *Neuropeptides* 59: 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2016.05.003>
43. *Raskin P, Cincotta AH* (2016) Bromocriptine-QR therapy for the management of type 2 diabetes mellitus: developmental basis and therapeutic profile summary. *Expert Rev Endocrinol Metab* 11: 113–148. <https://doi.org/10.1586/17446651.2016.1131119>
44. *Dodd GT, Xirouchaki CE, Eramo M, Mitchell CA, Andrews ZB, Henry BA, Cowley MA, Tiganis T* (2019) Intranasal Targeting of Hypothalamic PTP1B and TCPTP Reinstates Leptin and Insulin Sensitivity and Promotes Weight Loss in Obesity. *Cell Rep* 28: 2905–2922.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.019>
45. *Prabhakar PK, Sivakumar PM* (2019) Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors: A Novel Therapeutic Strategy for the Management of type 2 Diabetes Mellitus. *Curr Pharm Des* 25: 2526–2539. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190716102901>

The Levels of Insulin and Leptin in the Blood and Brain Structures of Rats with Diet-Induced Obesity and the Effect of Various Drugs on Them**K. V. Derkach^{a, *}, V. N. Sorokoumov^b, A. A. Bakhtyukov^a,
V. M. Bondareva^a, and A. O. Shpakov^{a, c}**^a*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*^b*Institute of Chemistry, Saint-Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*^c*Faculty of Medicine, Saint-Petersburg State University, St. Petersburg, Russia**e-mail: derkach_k@list.ru

In obesity, the insulin and leptin pathways in the brain and peripheral tissues are weakened. In the brain, one of the reasons for this is the impaired transport of insulin and leptin through the blood-brain barrier (BBB), an indicator of which is a change in their ratio of their concentrations in the bloodstream and in the brain structures. However, such changes in obesity and the effect of pharmacological drugs on them are almost not studied. The aim of the work was to assess the levels of insulin and leptin in the brain structures (hypothalamus, cerebellum) and their relationship with those in the blood of male rats with obesity caused by a long-term combined high-calorie diet, as well as to study the effect on these parameters of a four-week treatment of rats with obese with metformin (200 mg/kg/day), bromocriptine (0.6 mg/rat/day) and intranasally administered insulin (I-I) (0.5 IU/rat/day) and their two-week treatment with PI4, a phosphatase 1B inhibitor (PTP1B) (10 mg/kg/day). It has been shown that in obesity under conditions of hyperinsulinemia and hyperleptinemia, the delivery of insulin and leptin through the BBB to the hypothalamus and cerebellum is weakened, which leads to a significant increase in the ratios of the concentrations of these hormones in the blood and brain structures. Metformin treatment not only normalized metabolic parameters and sensitivity to insulin and leptin, but also fully restored the levels of insulin and leptin in the brain. Treatment with I-I and bromocriptine was less effective. PI4 treatment caused a significant decrease in the body weight and adipose tissue in obese rats, reduced their food intake, improved the metabolic parameters and increased the sensitivity to insulin and leptin. The PTP1B inhibitor also restored the ratio of insulin and leptin concentrations in the blood and brain structures, but not due to an increase in their level in the brain, as in the case of metformin, but as a result of a significant decrease in the concentrations of hormones in the blood. The data obtained indicate that treatment with drugs of various chemical nature and mechanisms of action that improve metabolic and hormonal parameters in obesity leads to normalization of the ratio of insulin and leptin at the periphery and in the CNS, restoring thus, the insulin and leptin signaling in the hypothalamus and other brain regions and central insulin and leptin regulation of metabolic processes at the periphery.

Keywords: obesity, hypothalamus, cerebellum, insulin, leptin, metformin, intranasally administered insulin, bromocriptine, protein phosphotyrosine phosphatase 1B

ВЛИЯНИЕ СЛОЖНОСТИ ЗАДАЧИ НА ВЕЛИЧИНУ СИНХРОНИЗАЦИИ ЭЭГ АКТИВНОСТИ БЕТА-ДИАПАЗОНА В СЕНСОМОТОРНОЙ КОРЕ

© 2022 г. М. В. Пронина¹, *, В. А. Пономарев¹, Ю. Д. Кропотов¹

¹Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: pronina@ihb.spb.ru

Поступила в редакцию 23.08.2022 г.

После доработки 19.09.2022 г.

Принята к публикации 20.09.2022 г.

В работе исследовали влияние сложности второстепенной задачи на связанные с событиями перестройки ЭЭГ в сенсомоторной области коры при выполнении основной задачи в условиях многозадачности. 32-канальную ЭЭГ регистрировали у 24 здоровых испытуемых во время выполнения четырех тестов, сочетающих Go/NoGo и N-back задачи и различающихся по сложности. В отличие от работ, использующих классическую N-back парадигму, в которых нагрузка на рабочую память создавалась за счет необходимости удержания в памяти информации непосредственно о стимуле, для настоящего исследования мы разработали вариант N-back задачи, которая требует запоминания совершенного действия. Было показано, что повышение сложности N-back задачи приводило к уменьшению величины синхронизации бета-диапазона ЭЭГ, наблюдаемой после совершения движения в Go условии Go/NoGo теста над левой сенсомоторной областью коры (максимум в отведении С3). Можно предполагать, что увеличение нагрузки на рабочую память, независимо от типа удерживаемой в памяти информации, приводит к ослаблению процессов контроля движений, необходимых для выполнения основной задачи. Полученные результаты говорят в пользу предположения о том, что состояние многозадачности требует распределения ресурсов внимания и за счет этого ухудшает качество выполнения каждой из задач.

Ключевые слова: вызванная десинхронизация/синхронизация, многозадачность, Go/NoGo тест, N-back задача, реакция бета-ритма после возбуждения (rebound effect)

DOI: 10.31857/S0869813922110103

В современном мире состояние многозадачности становится все более распространенным и привычным. Однако одновременное выполнение нескольких задач сопряжено с риском того, что на качество выполнения приоритетной задачи могут повлиять второстепенные [1]. Ряд исследований указывает на то, что одновременное выполнение нескольких задач приводит к ухудшению когнитивных и моторных функций, таких как обработка сенсорных стимулов [2], запоминание информации [3], выполнение двигательных заданий [1], вождение автомобиля [1], поддержание баланса при ходьбе [4] и даже изменению походки [5].

Частным вариантом второстепенной задачи является необходимость удержания и/или обновления информации в рабочей памяти. Большинство литературных данных указывает на то, что увеличение нагрузки на рабочую память приводит к ухудшению выполнения приоритетной задачи [6–8]. Предполагается, что нагрузка

на рабочую память снижает концентрацию внимания на основной задаче, так как ресурсы когнитивного контроля истощаются и внимание может “перетекать” на отвлекающие стимулы [6]. Согласно этой гипотезе, ухудшение выполнения основной задачи происходит только при наличии отвлекающего стимула, который похож на целевой [8]. В пользу этой гипотезы говорят результаты работы [9], в которой практически никакого влияния нагрузки на рабочую память на выполнение основной задачи выявлено не было.

Одним из наиболее часто используемых заданий для создания нагрузки на рабочую память является N-back задача [10]. В ее классическом варианте от испытуемого требуется сравнить текущий стимул с тем, которые предъявлялся в последовательности N шагов назад. В качестве стимулов могут использоваться буквы, цифры, символы и т.д., и с увеличением числа N растет нагрузка на рабочую память.

Результаты электрофизиологических исследований показывают, что увеличение нагрузки на рабочую память в N-back задаче влияет на мощность активности бета-диапазона ЭЭГ (13–30 Гц) [10], в частности снижает величину синхронизации бета-диапазона ЭЭГ, наблюдаемую после совершения произвольных и связанных с предъявлением стимула двигательных реакций над сенсомоторной областью контрлатерального полушария (реакция бета-ритма после возбуждения или rebound effect) [11, 12].

Однако в работах, использующих классическую парадигму N-back задачи, нагрузка на рабочую память создавалась за счет необходимости удержания в памяти информации непосредственно о стимуле, между тем значительный интерес представляет исследование влияния на величину бета-ритма после возбуждения других типов запоминаемой информации. Поэтому для настоящего исследования мы разработали вариант N-back задачи, которая требует запоминания совершенного действия. В качестве основной задачи мы использовали зрительный тест Go/NoGo парадигмы с предупреждающим стимулом. Этот тип теста требует как можно быстрее реагировать (например, нажатием на кнопку) на определенные стимулы и воздерживаться от нажатия на другие, тем самым задействуя процессы подготовки, совершения и торможения действия. Варианты Go/NoGo теста с предупреждающим стимулом включают дополнительный стимул, который с определенной долей вероятности указывает на то, что следующий стимул будет целевым, требуя вовлечения рабочей памяти.

Результаты предыдущих исследований указывают на то, что в случае, когда предупреждающий и целевой стимул физически идентичны, в височной коре происходит формирование модели ожидаемого стимула [13], основанной на запоминании физических характеристик стимула, если же стимулы различаются, формирование такого образа невозможно, и в рабочей памяти удерживаются другие характеристики целевого стимула, например, семантическая категория.

Так как в процессе выполнения теста испытуемому необходимо совершать движение после предъявления целевого стимула, в данных вызванной синхронизации/десинхронизации в Go условии над левой центральной корой можно наблюдать реакцию бета-ритма после возбуждения [14].

В данной работе мы исследовали влияние сложности N-back задачи на величину реакции бета-ритма после возбуждения при выполнении зрительного Go/NoGo теста. На основании литературных данных, полученных с использованием классического варианта N-back задачи, было предположено, что повышение сложности N-back задачи, требующей запоминания совершенного действия, будет снижать величину реакции бета-ритма после возбуждения в сенсомоторной коре, контрлатеральной по отношению к руке, которой совершается нажатие в Go условии Go/NoGo теста. Кроме того, чтобы проверить, как необходимость удержания в памяти информации о совершенном движении будет влиять на реакцию бета-ритма

после возбуждения в условиях, требующих запоминания физических характеристик целевого стимула или его семантической категории, мы использовали два варианта Go/NoGo теста с целевыми парами, состоящими из идентичных или различных изображений.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Испытуемые

В исследовании принимали участие 24 испытуемых в возрасте от 19 до 33 лет (4 мужчины), средний возраст 23 ± 4 года, без серьезных травм головы в анамнезе, психических, неврологических, онкологических и нейродегенеративных заболеваний, алкогольной и наркотической зависимости, не принимающие психотропные препараты. Все процедуры, выполненные в исследовании, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие. Процедура исследования была одобрена комиссией по этике Института мозга человека РАН 20 сентября 2018 г.

Структура тестов

Каждый тест состоял из 400 проб, каждая проба содержала два стимула, стимулами являлись изображения животных и растений. Разные сочетания стимулов составляли 4 типа проб: “животное–животное”, “животное–растение”, “растение–растение” и “растение–животное”. При этом в пробах “животное–животное” и “растение–растение” первое и второе изображения были полностью идентичны. Пробы предъявлялись на экране 19-дюймового монитора в случайном порядке с вероятностью 25%. Длительность проб – 3000 мс, интервал от начала пробы до начала предъявления первого изображения (престимульный интервал) – 300 мс, длительность каждого стимула – 100 мс, длительность интервала между двумя стимулами в паре – 1000 мс. После каждой пары изображений через 1800 мс в середине экрана на 100 мс предъявлялось изображение креста (рис. 1). Интервал между предъявлением креста и следующей пары изображений – 1900 мс. Общая продолжительность каждого теста – 35 мин.

В каждом тесте испытуемые параллельно выполняли две задачи – Go/NoGo и N-back, которые, в свою очередь, имели по два варианта выполнения. Таким образом, всего использовалось 4 теста с разными сочетаниями заданий.

В тесте 1 (Ж–Ж, N–0) первым заданием было нажимать указательным пальцем правой руки на левую кнопку мыши как можно быстрее после предъявления пары картинок “животное–животное” (проба Go), не нажимая после других пар (Go/NoGo задача). Вторым заданием было нажимать после изображения креста указательным пальцем правой руки на левую кнопку мыши в случае, если текущей пробой была проба Go (N-back задача, сложность N–0), и нажимать на правую кнопку мыши средним пальцем в случае всех остальных проб. В тесте 2 (Ж–Ж, N–1) первое задание было аналогично тесту 1, вторым заданием было нажимать как можно быстрее после изображения креста на левую кнопку мыши, если проба, предшествующая последней, была пробой Go (N-back задача, сложность N–1), и нажимать на правую кнопку мыши в случае всех остальных типов проб. В тестах 3 (Ж–Р, N–0) и 4 (Ж–Р, N–1) первым заданием было нажимать как можно быстрее на левую кнопку мыши после пары картинок “животное–растение”, не нажимая после других пар. Второе задание было аналогично заданиям в тестах 1 и 2 соответственно.

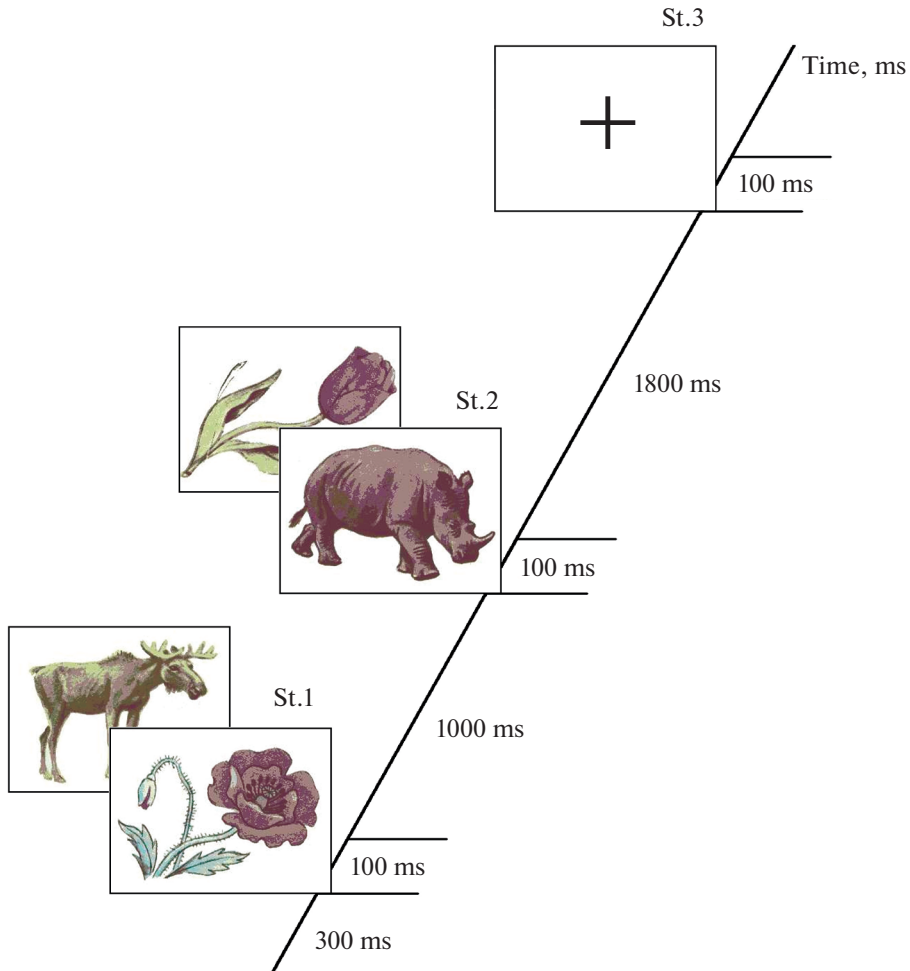


Рис. 1. Схема предъявления стимулов в тестах.

ЭЭГ данные регистрировались во время выполнения 4 тестов в течение двух сеансов, два теста за один сеанс. Варианты теста предъявлялись испытуемым попарно (1, 2 и 3, 4) в случайном порядке в соответствии с рандомизационными списками.

Регистрация ЭЭГ

Регистрация электроэнцефалограммы производилась с помощью 31-канального компьютерного электроэнцефалографа “Мицар-202” (CE 0537) производства ООО Мицар (<http://www.mitsar-eeg.ru/>) и электроэнцефалографической шапочки МКС (производства ООО “Медицинские Компьютерные Системы”, Москва, Зеленоград). ЭЭГ электроды располагались на поверхности головы в соответствии с системой 10–10 в отведениях Fp_1 ; Fp_z ; Fp_2 ; F_7 ; F_3 ; F_z ; F_4 ; F_8 ; FT_7 ; FC_3 ; FC_z ; FC_4 ; FT_8 ; T_3 ; C_3 ; C_z ; C_4 ; T_4 ; TP_7 ; CP_3 ; CP_z ; CP_4 ; TP_8 ; T_5 ; P_3 ; P_z ; P_4 ; T_6 ; O_1 ; O_z ; O_2 , референтные электроды – на мочках ушей, заземляющий – в лобной области. Место установки ушных электродов предварительно зачищали абразивной пастой “NuPrep”, электроды заполняли небольшим количеством геля “Унимакс”. Сопротивление электродов

тродов не превышало 5 кОм. Частота оцифровки ЭЭГ составляла 250 Гц. Параметры фильтров высокой и низкой частоты составляли соответственно 0.53 и 30 Гц, также использовался режекторный фильтр — 45–55 Гц. ЭЭГ регистрировалась в монтаже с объединенным ушным референтом.

Для контроля над правильностью выполнения тестов и измерения времени реакции регистрировался сигнал от левой и правой кнопки мыши.

Исследование проводилось в спокойной обстановке, при отсутствии отвлекающих стимулов. Во время исследования испытуемые сидели в удобном кресле на расстоянии примерно 1 м от монитора. Перед регистрацией каждого теста испытуемым подробно объяснялось задание, и проводилась серия тренировочных проб.

Обработка данных

Ошибочные пробы при выполнении Go/NoGo теста (пробы Go, в которых испытуемый не нажал на кнопку и пробы NoGo с ложными нажатиями) исключались из анализа. Их количество подсчитывалось и сравнивалось между разными тестами с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни и многофакторного дисперсионного анализа ANOVA в рамках программного пакета Statistica 10. Также было проведено сравнение количества ошибок, допущенных при нажатии на изображение креста.

Коррекция артефактов глазных движений производилась в WinEEG автоматически методом зануления независимых компонент, соответствующих этим движениям. Кроме того, в автоматическом режиме удалялись фрагменты ЭЭГ, содержавшие активность, превышающую 100 мкВ, а также фрагменты с амплитудой сигнала 50 мкВ и выше в диапазоне 0–1 Гц, и с амплитудой 35 мкВ и выше в диапазоне 20–35 Гц. Эти пороги были ранее подобраны эмпирически [14].

ЭЭГ преобразовывалась в плотность источников тока (Current Source Density — CSD) для лучшего выявления локальных эффектов динамики спектральной плотности ЭЭГ. Применение этого метода имеет ряд преимуществ, включающих более точное определение структуры, местоположения и ориентации внутричерепных источников сигнала, а также возможности обнаружения глубоко расположенных источников [15].

В реакциях ЭЭГ различают два вида активности: вызванную и индуцированную. Вызванная активность (или связанные с событиями потенциалы) представляет собой изменения электрического потенциала, привязанные по фазе к стимулу или ответной реакции. Наиболее часто в нейрофизиологических работах исследуют именно потенциалы, связанные с событиями. Индуцированная активность, или вызванная десинхронизация/синхронизация (event-related desynchronization/synchronization — ERD/ERS), напротив, не привязана по фазе к стимулу. Такие реакции ЭЭГ описываются в виде изменений спектральной плотности электрического потенциала и их исследование дает дополнительную информацию о работе систем мозга [16].

Чтобы уменьшить влияние вызванной активности на динамику спектральной плотности ЭЭГ, усредненные потенциалы, связанные с событиями, вычитались из каждой индивидуальной пробы. В предыдущей статье авторов было показано, что вычитание ПСС из эпох ЭЭГ частично подавляет увеличение спектральной плотности сигналов тета-диапазона, хотя и не гарантирует полного удаления вызванной активности [14].

Для расчета вызванной десинхронизации/синхронизации ЭЭГ к данным применялось вейвлет преобразование исходных сигналов ЭЭГ. Для этого вычислялась свертка исходного сигнала с вейвлетом Морле. Динамика спектральной плотности вычислялась для каждого испытуемого, каждого электрода, каждого теста и каждо-

го типа проб в отдельности. Вейвлет преобразование выполнялось для различных частот в диапазоне от 2 до 30 Гц с шагом 1 Гц. Спектральная плотность вычислялась и усреднялась по пробам одного типа. Наконец, ERD/ERS оценивалась как изменение спектральной мощности для каждой частоты отдельно в соответствие с формулой $ERD/ERS(f) = (P(f, t) - P_{BG}(f))/P_{BG}(f)$, где $P_{BG}(f)$ – средняя мощность в интервале длительностью 300 мс перед предъявлением первого стимула в пробах.

Статистический анализ величины ERD/ERS в разных тестовых заданиях проводился с помощью основанного на кластерах теста с перестановками [17], реализованного в WinEEG на основе инструментария FieldTrip MATLAB для анализа МЭГ/ЭЭГ (свободно доступного по адресу <http://fieldtrip.fcdonders.nl/>). Идея этого метода основана на том, что на первом этапе выполняется сравнение сигналов в двух условиях. При этом для каждого канала и каждого временного отсчета в отдельности вычисляются значения статистик, полученных с помощью непараметрических тестов (Вилкоксона или Манна–Уитни, в зависимости от вида сравнения). Далее различия со значениями p меньше критического ($p < 0.01$) группируются в кластеры на основании подобия во временной и частотной областях. Наконец, для каждого из выделенных кластеров вычисляются суммы величин указанных статистик. Для оценки статистической значимости выделенных кластеров используется метод Монте-Карло, при этом исходные данные случайным образом перемешиваются. Затем снова выполняется поиск кластеров уже для перемешанных данных. Перемешивание выполняется путем перестановок меток проб, число перемешиваний – 10000. Далее для каждого кластера, наблюдаемого в исходных данных, вычисляется вероятность выделения кластеров в перемешанных данных с большей или равной суммой статистик. И эта вероятность принимается в качестве статистической значимости кластера. В дальнейшем рассматриваются только кластеры со статистической значимостью $p < 0.05$. Такой метод имеет ряд преимуществ [17] по сравнению с традиционно используемыми подходами. Он исключает необходимость субъективного выделения интервалов времени, в которых наблюдаются различия сигналов, и позволяет решить проблему множественных сравнений. И, наконец, он выполняет статистические оценки, используя непараметрические критерии.

В данной работе основанный на кластерах анализ с перестановками использовался для сравнения величины связанных с событиями перестроек ЭЭГ над левой сенсомоторной областью коры в Go условии четырех тестов попарно таким образом, чтобы целевая пара в Go/NoGo задаче была одинаковой, а сложность N-back задачи различалась, то есть тест 1 (Ж–Ж, N–0) сравнивался с тестом 2 (Ж–Ж, N–1), а тест 3 (Ж–Р, N–0) с тестом 4 (Ж–Р, N–1). Аналогично сигналы сравнивались между тестами с одинаковой сложностью N-back задачи, но разными целевыми параметрами в Go/NoGo задаче (тесты 1 и 3 и тесты 2 и 4). Значения статистик получали с помощью критерия Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ поведенческих показателей

Средние значения количества ошибок, допущенных испытуемыми при выполнении Go/NoGo задачи в каждом из четырех типов теста (нажатие на левую кнопку мыши после пары изображений), времени реакции и ошибки времени реакции представлены в табл. 1.

Количество допущенных ошибок между тестами не различалось. Значимые различия были получены для времени реакции ($p < 0.05$) и стандартного отклонения времени реакции ($p < 0.01$) между тестом 1 (Ж–Ж, N–0) и тестом 3 (Ж–Р, N–0). Различий по количеству ошибок и времени реакции при нажатии на изображение креста между тестами обнаружено не было.

Таблица 1. Поведенческие показатели при выполнении Go/NoGo задачи в четырех тестах

Тест	Пропуски	Ложные нажатия	Время реакции (мс)	Ошибка времени реакции (мс)
Тест 1	4.39	0.78	393*	12.9*
Тест 2	4.58	0.79	416	14.5
Тест 3	2.60	1	481*	17.8*
Тест 4	3.57	1.13	459	17.6

Звездочками отмечены значимые различия показателей между тестами, * – различия между тестом 1 (Ж–Ж, N=0) и тестом 3 (Ж–Р, N=0).

Таблица 2. Параметры кластеров, выделенных при сравнении величины ERD/ERS над сенсомоторной корой (отведение C_3) в Go пробах между тестами

Сравнения тестов	Полярность	Латентность, мс	Частота, Гц	$p <$
1–2	+	1000–1380	16–29	0.01
3–4	+	960–1200	15–30	0.01

Дисперсионный анализ показал значимое влияние на поведенческие показатели фактора “Тип целевой пробы (Ж–Ж/Ж–Р)” ($p < 0.01$), значимого влияния фактора “Сложность N-back задачи” и взаимодействия факторов обнаружено не было.

Анализ вызванной десинхронизации/синхронизации

Основанный на кластерах тест с перестановками при сравнении тестов между собой выявил в каждом сравнении сходные кластеры, наблюдаемые для высокочастотной активности после второго стимула в пробах Go и локализованные в левой центральной области. Величина синхронизации активности бета-диапазона была наибольшей в отведении C_3 (параметры кластеров, выделенных в отведении C_3 , представлены в табл. 2). Кластеры с подобными параметрами также были выделены в близлежащих отведениях: при сравнении тестов 1 и 2 – в отведениях FCz ($p < 0.01$) и Cz ($p < 0.01$), при сравнении тестов 3 и 4 – в отведениях Cz ($p < 0.01$) и CPz ($p < 0.01$).

Величина вызванной синхронизации в бета-диапазоне в интервале примерно 980–1480 мс в пробе Go уменьшалась ($p < 0.01$) в тестах с более сложной второй задачей (тесты 2 и 4) по сравнению с тестами с более простой второй задачей (тесты 1 и 3). Статистически значимых различий по величине бета-синхронизации в левой центральной области между вариантами тестов с разными целевыми парами в Go/NoGo задаче, но одинаковой сложностью N-back задачи (тесты 1 и 3, и тесты 2 и 4), обнаружено не было.

Частотно-временное распределение и топография максимальной величины изменения спектральной плотности ЭЭГ при выполнении тестов представлены на рис. 2.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Поведенческие показатели

В результате проведенного исследования были выявлены значимые различия по времени реакции на Go стимулы и его стандартном отклонении в разных тестах. В предыдущих исследованиях было показано, что в варианте Go/NoGo теста с целевой парой, состоящей из одинаковых картинок (пара “животное–животное”, среднее время реакции примерно на 100 мс меньше, чем в варианте теста с целевой парой из разных картинок (пара “животное–растение”) [13]. Результаты сравнения времени реакции в четырех вариантах теста показывают аналогичные различия между тестами 1 (Ж–Ж, N=0) и 3 (Ж–Р, N=0). Предполагается, что различия в

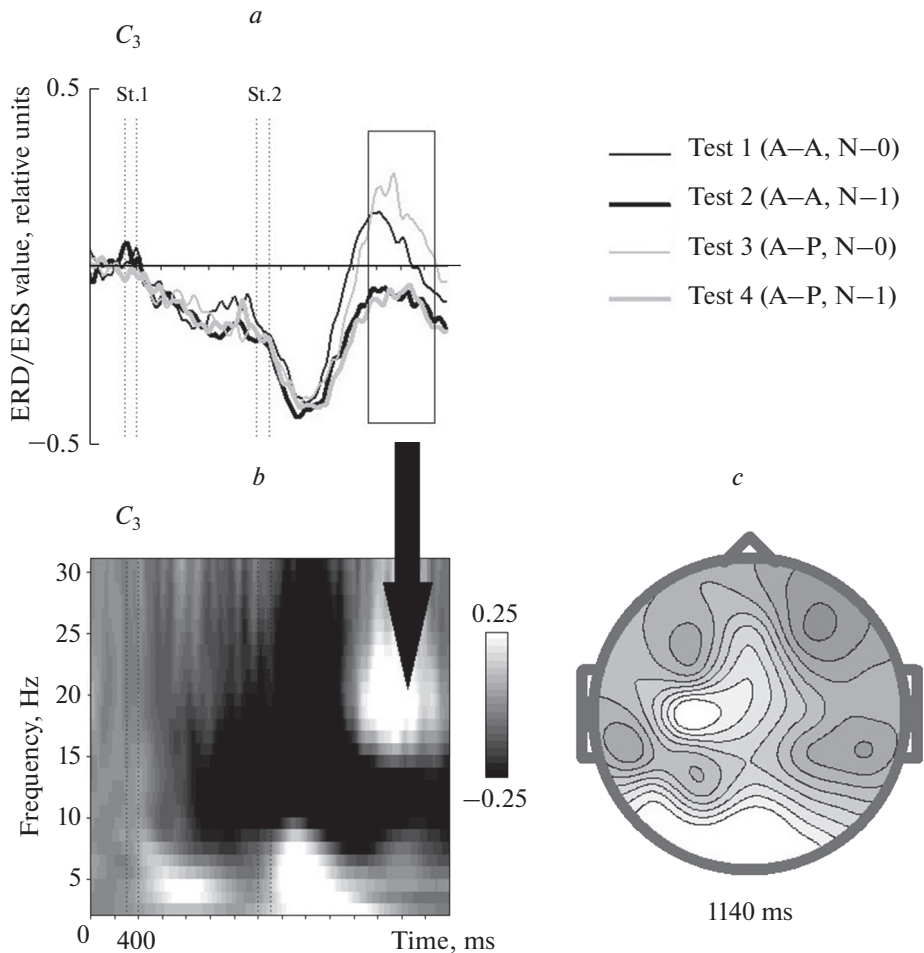


Рис. 2. Реакция синхронизации бета-ритма после возбуждения над левой моторной корой в Go пробах. (a) – общие средние значения изменений спектральной плотности ЭЭГ для средней частоты вейвлета 20 Гц при выполнении четырех тестов. Ось X – время в мс, ось Y – величина изменения спектральной плотности относительно среднего значения в интервале перед первым стимулом (в относительных единицах). Вертикальные пунктирные линии показывают начало и окончание предъявления стимулов (St.1 и St.2). Тонкая черная линия – тест 1, толстая черная линия – тест 2, тонкая серая линия – тест 3, толстая серая линия – тест 4. Черным прямоугольником отмечен временной интервал, определенный статистическим анализом как кластер. (b) – частотно-временное представление связанного с событиями изменения спектральной плотности ЭЭГ в тесте 3. Ось X – время в мс, ось Y – частота в Гц, оттенки серого показывают величину ERD/ERS. (c) – топография распределения максимума среднего значения вызванной синхронизации на поверхности головы в тесте 3 для средней частоты вейвлета 20 Гц.

значении среднего времени реакции в разных целевых парах связаны с возможностью формирования модели ожидаемого стимула в височной коре в случае, когда предупреждающий стимул идентичен целевому [13]. Если же предупреждающий и целевой стимул различаются (как в паре картинок “животное–растение”) формирование такого образа невозможно, что увеличивает время, необходимое для распознавания изображения как целевого стимула.

Результаты сравнения стандартного отклонения времени реакции в разных тестах также указывают на то, что этот показатель зависит от типа целевой пары, но не от сложности второй задачи.

Мы ожидали, что увеличение нагрузки на рабочую память в тестах 2 и 4 приведет к увеличению времени реакции относительно аналогичных тестов 1 и 3, но статистически достоверной разницы выявить не удалось, возможно, из-за сравнительно небольшой выборки испытуемых или из-за того, что условие N-1 в Go/NoGo тесте не обеспечивало достаточно сильной нагрузки.

Реакция бета-ритма после возбуждения

Результаты электрофизиологических исследований показывают, что увеличение нагрузки на рабочую память в N-back задаче влияет на мощность активности бета-диапазона ЭЭГ [10], в частности на синхронизацию активности бета-диапазона в левом центральном отведении после совершения движения, которая соответствует реакции бета-ритма после возбуждения, описанной ранее [11]. Поскольку это повышение наблюдается сразу после прекращения движения, предполагается, что оно отражает состояние активного торможения моторных областей и/или обратную связь о результате действия, приходящую в сенсомоторную кору [18, 19]. Литературные данные показывают, что величина и длительность синхронизации бета-активности после совершения движения меняются в зависимости от условий выполняемой задачи, таких как скорость торможения движения [20], осуществляется воображаемое движение или реальное [21], совершается движение одним пальцем или всей рукой [11].

В данном исследовании повышение сложности второй задачи приводило к снижению реакции бета-ритма, наблюдаемой после совершения нажатия на кнопку в процессе выполнения Go/NoGo теста, так же, как и в предыдущих работах с использованием классической N-back задачи [12], и независимо от того, физические характеристики изображения или его семантическую категорию нужно было удерживать в памяти. Можно предполагать, что увеличение нагрузки на рабочую память, независимо от типа удерживаемой в памяти информации, приводит к ухудшению процесса торможения моторной системы после совершения движения [18, 19].

Ряд работ предлагает еще одну точку зрения, заключающуюся в том, что реакция бета-активности после возбуждения связана с оценкой результата действия, а именно с пересмотром существующего моторного плана на основе обновления оценки неопределенности текущей модели после анализа поступающей сенсорной информации [22–24]. В рамках этой интерпретации можно предполагать, что необходимость выполнять дополнительное сложное задание приводит к ухудшению процесса построения модели действия при выполнении основной задачи и, как следствие, негибкости моторной программы.

Полученные в работе электрофизиологические результаты согласуются с данными, представленными в работе 2004 г. [6], и говорят в пользу предположения о том, что выполнение нескольких задач одновременно требует распределения ресурсов внимания, и за счет этого может ухудшать качество выполнения каждой из них. Также можно предположить, что на выполнение более сложной задачи (в данном случае N-back задача) направляется больше ресурсов и качество выполнения более простой задачи (в данном случае Go/NoGo) снижается в большей степени.

Однако сравнение поведенческих показателей не выявило статистически достоверного влияния сложности дополнительной задачи на количество ошибок и скорость реакции при выполнении основной, несмотря на различия средних значений. Возможно, из-за высокой межиндивидуальной вариабельности данных необходимо увеличить количество испытуемых и/или увеличить сложность дополнительной задачи.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнялась в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, тема № FMMW-2022-0002.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы, планирование эксперимента, разработка тестового задания (М.В.П., В.А.П., Ю.Д.К.), сбор данных (М.В.П.), обработка данных (М.В.П., В.А.П.), написание и редактирование манускрипта (М.В.П., В.А.П., Ю.Д.К.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Коллектив авторов выражает благодарность старшему научному сотруднику Института мозга человека РАН, доктору биологических наук Кирееву Максиму Владимировичу за участие в разработке тестового задания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Scherbaum S, Gottschalk C, Dshemuchadse M, Fischer R* (2015) Action dynamics in multitasking: the impact of additional task factors on the execution of the prioritized motor movement. *Front Psychol* 6: 934. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2015.00934>
2. *Romeo Z, Bonato M, Zorzi M, Spironelli C* (2019) Electrophysiological correlates of spatial processing during multitasking. *Neuropsychologia* 133: 107152. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2019.107152>
3. *Madore KP, Khazenzon AM, Backes CW, Jiang J, Uncapher MR, Norcia AM, Wagner AD* (2020) Memory failure predicted by attention lapsing and media multitasking. *Nature* 587(7832): 87–91. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2870-z>
4. *Hennah C, Ellis G, Dumas M* (2021) Dual task walking in healthy aging: Effects of narrow and wide walking paths. *PLoS One* 16(12): e0261647. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261647>
5. *Pizzamiglio S, Naem U, Abdalla H, Turner DL* (2017) Neural Correlates of Single- and Dual-Task Walking in the Real World. *Front Hum Neurosci* 11: 460. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2017.00460>
6. *Lavie N, Hirst A, de Fockert JW, Viding E* (2004) Load theory of selective attention and cognitive control. *J Exp Psychol Gen* 133: 339–354. <https://doi.org/10.1037/0096-3445.133.3.339>
7. *Capizzi M, Correa A, Sanabria D* (2013) Temporal orienting of attention is interfered by concurrent working memory updating. *Neuropsychologia* 51(2): 326–339. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2012.10.005>
8. *Bayramova R, Toffalini E, Bonato M, Grassi M* (2021) Auditory selective attention under working memory load. *Psychol Res* 85(7): 2667–2681. <https://doi.org/10.1007/s00426-020-01437-7>
9. *Zanto TP, Liu H, Pan P, Gazzaley A* (2020) Temporal attention is not affected by working memory load. *Cortex* 130: 351–361. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2020.06.008>
10. *Scharinger C, Soutschek A, Schubert T, Gerjets P* (2017) Comparison of the Working Memory Load in N-Back and Working Memory Span Tasks by Means of EEG Frequency Band Power and P300 Amplitude. *Front Human Neurosci* 11: 6. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2017.00006>
11. *Pfurtscheller G, Lopes da Silva FH* (1999) Event-related EEG/MEG synchronization and desynchronization: basic principles. *Clin Neurophysiol* 110: 1842–1857. [https://doi.org/10.1016/s1388-2457\(99\)00141-8](https://doi.org/10.1016/s1388-2457(99)00141-8)
12. *Pesonen M, Hämäläinen H, Krause CM* (2007) Brain oscillatory 4–30 Hz responses during a visual n-back memory task with varying memory load. *Brain Res* 1138: 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.12.076>
13. *Kropotov JD, Ponomarev VA, Pronina MV, Jäncke L* (2017) Functional indexes of reactive cognitive control: ERPs in cued go/no-go tasks. *Psychophysiology* 54(12): 1899–1915. <https://doi.org/10.1111/psyp.12960>

14. Ponomarev VA, Pronina MV, Kropotov YD (2017) Dynamics of the EEG spectral density in the θ , α , and β bands in the visual Go/NoGo task. *Hum Physiol* 43: 366–376.
<https://doi.org/10.1134/S0362119717040132>
15. Kayser J, Tenke CE (2015) On the benefits of using surface Laplacian (Current Source Density) methodology in electrophysiology. *Int J Psychophysiol* 97(3): 171–173.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2015.06.001>
16. Başar E, Düzgün A (2016) How is the brain working?: research on brain oscillations and connectivities in a new “take-off” state. *Int J Psychophysiol* 103: 3–11.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2015.02.007>
17. Maris E, Oostenveld R (2007) Nonparametric statistical testing of EEG- and MEG-data. *J Neurosci Methods* 164(1): 177–190.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.03.024>
18. Wessel JR, Aron AR (2017) On the globality of motor suppression: unexpected events and their influence on behavior and cognition. *Neuron* 93(2): 259–280.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.013>
19. Barone J, Rossiter HE (2021) Understanding the Role of Sensorimotor Beta Oscillations. *Front Systems Neurosci* 15: 655886.
<https://doi.org/10.3389/fnsys.2021.655886>
20. Heinrichs-Graham E, Kurz MJ, Gehringer JE, Wilson TW (2017) The functional role of post-movement beta oscillations in motor termination. *Brain Struct Funct* 222(7): 3075–3086.
<https://doi.org/10.1007/s00429-017-1387-1>
21. Solis-Escalante T, Müller-Putz GR, Pfurtscheller G, Neuper C (2012) Cue-induced beta rebound during withholding of overt and covert foot movement. *Clin Neurophysiol* 123(6): 1182–1190.
<https://doi.org/10.1016/j.clinph.2012.01.013>
22. Cao L, Hu Y-M (2016) Beta Rebound in Visuomotor Adaptation: Still the Status Quo? *J Neurosci* 36(24): 6365–6367.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1007-16.2016>
23. Tan H, Wade C, Brown P (2016) Post-Movement Beta Activity in Sensorimotor Cortex Indexes Confidence in the Estimations from Internal Models. *J Neurosci* 36(5): 1516–1528.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3204-15.2016>
24. Little S, Bonaiuto J, Barnes G, Bestmann S (2019) Human motor cortical beta bursts relate to movement planning and response errors. *PLoS Biol* 17(10): e3000479.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000479>

Effect of Task Complexity on the Post-Movement Beta Synchronization in the Sensorimotor Cortex

M. V. Pronina^a*, V. A. Ponomarev^a, and Yu. D. Kropotov^a

^a*Bechtereva Institute of the Human Brain, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

**e-mail: pronina@ihb.spb.ru*

We studied the effect of the complexity of the secondary task on event-related EEG dynamics over the sensorimotor cortex in primary task under multitasking conditions. 32-channel EEG was recorded from 24 healthy subjects during the performance of four tests combining Go/NoGo and N-back paradigms and differing in complexity. In contrast to the previous studies using the classical paradigm of N-back tasks requiring memorization of information about the stimuli itself, for this study we developed a variant of the N-back task, which requires memorization of the completed action. It was shown that an increase in the complexity of the N-back task leads to a decrease in the magnitude of beta synchronization observed after a movement in the Go condition of the Go/NoGo task over the left sensorimotor cortex (electrode C3). It can be assumed that an increase in working memory load, regardless of the type of information held in memory, leads to a deterioration in the processes of movement control necessary to perform the primary task. The obtained results support the assumption that the multitasking condition requires the distribution of attention resources and, due to this, decreases the quality of each task performance.

Keywords: event-related desynchronization/synchronization, multitasking, Go/NoGo test, N-back test, post-movement beta synchronization (rebound effect)

ВЛИЯНИЕ ДОКСОРУБИЦИНА НА РЕАКТИВНОСТЬ БРЫЖЕЕЧНЫХ АРТЕРИЙ КРЫС ВИСТАР

© 2022 г. Г. Т. Иванова*

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

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

Поступила в редакцию 11.07.2022 г.

После доработки 11.09.2022 г.

Принята к публикации 27.09.2022 г.

Доксорубицин применяется в качестве противоопухолевого препарата, однако он оказывает негативное влияние на сердечно-сосудистую систему. Основное внимание уделяется кардиотоксическому эффекту, а механизмы его действия на сосуды изучены недостаточно. В исследовании оценивалось влияние доксорубицина на реактивность брыжеечных артерий крыс. Экспериментальной группе крыс Вистар вводили однократно внутривентриально доксорубицин (4 мг/кг), контрольным животным – физиологический раствор в равном объеме. Через 6 нед. исследовали реактивность брыжеечных артерий на ацетилхолин (АХ), нитропруссид и фенилэфрин. Для уточнения механизмов эндотелийзависимой вазодилатации использовали блокаторы: NO-синтазы – L-NAME, циклооксигеназы – индометацин, K^+ -каналов – тетраэтиламмоний. Для оценки реактивности артерий *in vivo* проводили микрофото- и видеорегистрацию диаметра брыжеечных артерий крыс (микроскоп Биомед МС-1Т-ZOOM и камера Basler BASLER acA4600-10uc), полученные данные обрабатывали в программе MultiMedia Catalog. Показано, что доксорубицин модифицировал реактивность брыжеечных артерий крыс: повышал констрикторные реакции фенилэфрина и угнетал эндотелийзависимую вазорелаксацию при действии АХ. При этом введение крысам доксорубицина приводило к снижению эффективности NO-зависимых механизмов регуляции тонуса сосудов (оцененных по разнице в амплитуде АХ-индуцированной вазодилатации до и после применения L-NAME), а также к уменьшению вызванной нитропруссидом релаксации артерий по сравнению с контрольными животными. Доксорубицин не оказывал влияния на эффективность опосредованных простагландинами и Ca^{2+} -активируемыми K^+ -каналами промежуточной и малой проводимости механизмов эндотелийзависимой вазодилатации.

Ключевые слова: доксорубицин, брыжеечная артерия, эндотелий, ацетилхолин-индуцированная дилатация, вазоконстрикция, фенилэфрин, нитропруссид

DOI: 10.31857/S0869813922110036

В настоящее время во всем мире наблюдается значительный рост онкологических заболеваний, которые занимают первое место среди причин смертности [1]. Применение препаратов антрациклинового ряда, в частности доксорубицина (DOX), оказывает выраженный противоопухолевый эффект, однако сопровождается значительным токсическим влиянием на различные органы и ткани, в частности на миокард и сосуды. Проблема определения механизмов токсического влияния противоопухолевых препаратов на сердце и сосуды, а также поиск путей предотвраще-

ния опасных патологических эффектов – одна из острых проблем современной медицины [2–4].

Основное внимание уделяется изучению токсического действия DOX на структуру и функцию миокарда, однако до настоящего времени механизмы этого влияния точно не определены [5–9]. Выраженная кардиотоксичность позволила считать введение DOX методом моделирования хронической сердечной недостаточности у экспериментальных животных [8, 10, 11]. Введение различных доз DOX сопровождается ухудшением насосной функции сердца, активизацией процессов ремоделирования миокарда, повреждением гладкомышечных клеток (ГМК) и эндотелия коронарных артерий [10, 12].

Химиотерапевтическое действие DOX связано с его способностью к интеркаляции с ДНК, приводящей к нарушению репарации, и ингибированию расщепляющей нити ДНК топомеразы II типа, в результате чего происходит апоптоз клеток опухоли [13, 14]. Однако подобное влияние DOX оказывает и на другие ткани организма, в частности на кардиомиоциты, что во многом обуславливает кардиотоксичность этого препарата. Кроме того, введение DOX приводит к образованию активных форм кислорода, индуцируя окислительный стресс, к которому особенно чувствительны клетки миокарда и эндотелий сосудов [15, 16], а также к нарушению функции митохондрий, вызывая снижение уровня АТФ [17].

Действие DOX на сосуды изучается, как правило, в экспериментах, проводимых *in vitro*, с использованием изолированных сосудистых фрагментов, которые либо инкубировались в растворе с данным препаратом [18–21], либо выделены от животных, которым его предварительно вводили [22]. Исследования влияния DOX на сосуды в условиях сохранения естественного кровотока и целостности сосудистой системы единичны. Разнообразие результатов о действии DOX на сосуды, представленных в литературе, является следствием различий в условиях эксперимента: использование крыс, мышей и других животных, различия в сроках наблюдения после введения DOX, многообразии протоколов введения, дозировок препарата, типа сосудов. В исследованиях в той или иной мере отмечается токсическое влияние DOX на функциональное состояние сосудов, сопровождающееся повреждением эндотелия, снижением эндотелийзависимой вазорелаксации, увеличением жесткости сосудистой стенки [4, 23]. Механизмы этих влияний остаются малоизученными. Обсуждается также непосредственное влияние DOX на гладкомышечные клетки сосудов [24].

Целью нашего исследования было оценить реактивность брыжеечных артерий, а также участие отдельных механизмов эндотелийзависимой вазодилатации у крыс, получивших однократное введение 4 мг/кг DOX, в условиях сохранения целостности сосудистой системы и естественного кровотока (*in vivo*).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на половозрелых самцах крыс стока Вистар (Центр коллективного пользования “Биоколлекция” Института физиологии им. И.П. Павлова РАН), исходной массой 280–320 г. Все манипуляции с животными проводились в соответствии с принципами Базельской декларации при одобрении этической комиссии Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Крысы были случайным образом распределены на 2 группы по 30 особей в каждой. Животные первой группы (DOX-группа) получали однократную инъекцию растворенного в физиологическом растворе DOX, внутривентриально, из расчета 4 мг/кг массы тела крысы. Крысам контрольной группы был однократно внутривентриально введен физиологический раствор в количестве, эквивалентном объему вводимого раствора DOX. Все животные получали стандартный пищевой рацион и имели доступ к пище и

воде *ad libitum*. Животные содержались в равных условиях, по 5 особей в клетке, при температуре в помещении 20–22°C и световом режиме 12 ч свет/12 ч темнота. Длительность наблюдения составила 6 нед. после инъекции.

Перед началом и окончанием эксперимента у бодрствующих крыс измеряли артериальное давление (АД) манжеточным методом на хвосте, используя электроманометр фирмы (ELEMA, Швеция). Среднее трех последовательных измерений считали величиной АД.

Через 6 нед. после введения DOX или физиологического раствора у крыс, наркотизированных тилетамин/золазепамом (10 мг/кг массы крысы, Zoletil 100, Vibrac, Франция), при необходимости дополнительно вводили дробно не более 50% от первоначально рассчитанной дозы тилетамин/золазепама, исследовали реактивность брыжеечных артерий *in vivo*. Эвтаназию животных осуществляли введением избыточной дозы наркоза до остановки дыхания.

Для оценки ацетилхолин-индуцированной релаксации сосудов у наркотизированной крысы через разрез стенки брюшной полости (длиной 1.5 см) выводили петлю тонкого кишечника, расправляли и помещали в специальный желоб, который фиксировали в термостабилируемой при температуре 37°C камере с протекающим физиологическим солевым раствором следующего состава (ммоль/л): NaCl – 120.4; KCl – 5.9; CaCl₂ – 2.5; MgCl₂ – 1.2; NaH₂PO₄ – 1.2; NaHCO₃ – 15.5; глюкоза – 11.5. Физиологический раствор сатурировали газовой смесью, состоящей из 95% O₂ и 5% CO₂. Перед тестированием сосуд стабилизировали в ванночке в течение 30 мин. Затем проводили исследования согласно выбранному протоколу. В работу брали сосуды диаметром 200–350 мкм, имеющие выраженный вазоконстрикторный эффект на фенилэфрин (ФЭ).

Для оценки эндотелийзависимой и эндотелийнезависимой вазодилатации использовали введение в раствор ацетилхолин хлорида (АХ, Sigma-Aldrich, США) 1×10^{-5} моль/л или нитропрусида натрия (ICN Biomedicals, США) 1×10^{-6} моль/л на фоне предварительного сокращения сосуда ФЭ (Sigma-Aldrich, США) 1×10^{-5} моль/л. Амплитуду дилатации выражали в процентах от амплитуды констрикции, вызванной ФЭ.

С целью оценки участия отдельных механизмов в сосудистых реакциях на АХ использовали соответствующие блокаторы: блокатор NO-синтазы L-NAME (*N*_ω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride, ICN Biomedicals) 1×10^{-4} моль/л; блокатор циклооксигеназы индометацин (Indomethacin, Sigma-Aldrich), 1×10^{-5} моль/л; неспецифический блокатор K⁺-каналов – тетраэтиламмоний (ТЭА), (Tetraethylammonium chloride, Sigma-Aldrich) 1×10^{-3} моль/л. Через 30 мин инкубации сосудов в растворе с блокатором вводили ФЭ с последующим добавлением АХ. Вклад различных механизмов в АХ-индуцированную вазорелаксацию рассчитывали как разницу в амплитуде дилатации сосуда при действии АХ до применения соответствующего ингибитора (блокатора) и после инкубации с ним. Маточные растворы АХ, нитропрусида натрия, L-NAME, ТЭА готовились на основе дистиллированной воды. Индометацин растворяли в диметилсульфоксиде (Вектон, Россия). Полученный раствор добавляли в физиологический раствор до достижения необходимой концентрации индометацина. Диметилсульфоксид, при разведении его физиологическим раствором в соотношении 1 : 1000, не вызывал значимых изменений реактивности брыжеечных артерий.

Для уточнения реактивности сосудов на АХ исследовали его зависимое от концентрации действие на предварительно сокращенные ФЭ брыжеечные артерии, для этого оценивали кумулятивный эффект постепенного повышения концентрации вводимого в ванночку АХ (1×10^{-10} – 1×10^{-5} моль/л) на амплитуду вазодилатации.

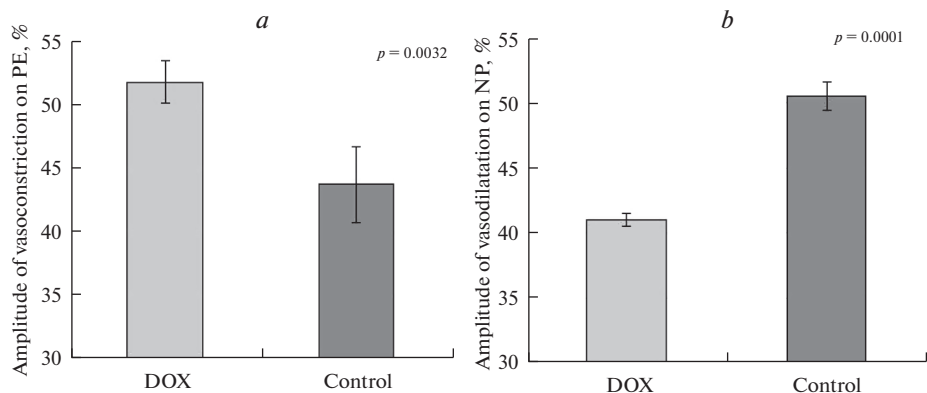


Рис. 1. Влияние доксорубина на реактивность брыжеечных артерий крыс. (а) – влияние фенилэфрина (PE, 1×10^{-5} моль/л) на диаметр брыжеечных артерий крыс. По оси ординат – амплитуда вазоконстрикции, выраженная в процентах от исходного диаметра сосуда. (б) – влияние нитропруссид натрия (NP, 1×10^{-6} моль/л) на диаметр предварительно сокращенных фенилэфрином брыжеечных артерий крыс. По оси ординат – амплитуда вазодилатации, выраженная в процентах от амплитуды вызванной фенилэфрином констрикции сосуда. Экспериментальные группы: DOX – крысы, получившие однократное введение 4 мг/кг доксорубина; Control – контрольная группа. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка. p – значимость различий между группами.

Для оценки реактивности артерий проводили фото- и видеорегистрацию диаметра брыжеечных артерий крыс *in vivo* с использованием микроскопа Биомед MC-1T-ZOOM (Россия) и камеры Basler BASLER acA4600-10uc (Германия), обработка результатов осуществлялась с помощью программы MultiMedia Catalog (MMC).

При статистической обработке результатов использовали программу Statistica v.12. Полученные данные представляли в виде среднего с его стандартной ошибкой. Для анализа полученных данных использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Однократное введение 4 мг/кг DOX через 6 нед. не приводило к изменению массы тела у крыс, в среднем она составляла 333 ± 18 г у DOX-группы и 330 ± 20 г у контрольной. DOX также не оказывал влияния на величину АД: 121 ± 7 мм рт. ст. – у DOX-группы и 123 ± 5 мм рт. ст. – у контрольной.

Анализ результатов измерения диаметра брыжеечных артерий *in vivo* при действии вазоактивных агентов показал, что однократное введение 4 мг/кг DOX через 6 нед. приводит к изменению реактивности сосудов. Так, у крыс DOX-группы было отмечено увеличение амплитуды вазоконстрикции на ФЭ в среднем на 18.5% ($p = 0.003$) по сравнению с контрольными крысами (рис. 1а). Кроме того, у крыс получавших DOX, наблюдалось снижение реактивности сосудов на экзогенный NO (рис. 1б): амплитуда дилатации предварительно сокращенных ФЭ сосудов крыс DOX-группы при добавлении в камеру нитропруссид натрия была в среднем на 18.8% меньше, чем у контрольных животных ($p = 0.0001$).

При исследовании эндотелийзависимой дилатации брыжеечных артерий крыс оценивали кумулятивный эффект введения в ванночку с физиологическим раствором АХ в ступенчато повышающейся концентрации от 1×10^{-10} до 1×10^{-5} моль/л.

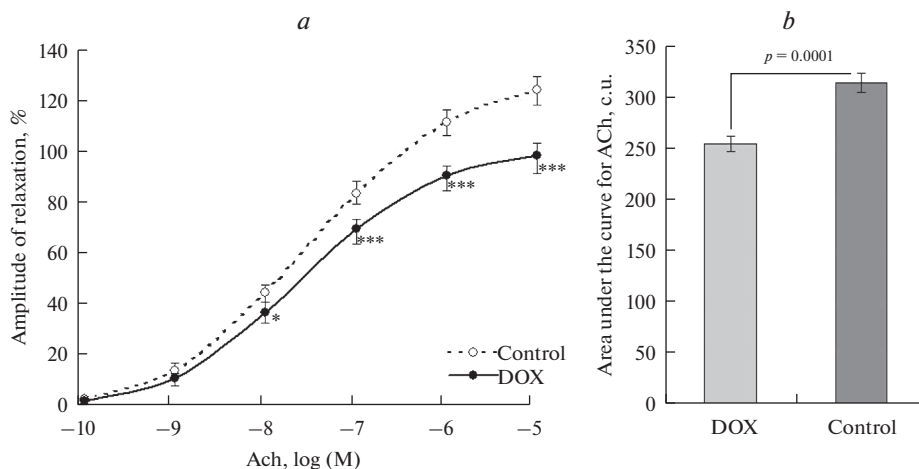


Рис. 2. Влияние доксорубина на ацетилхолин-индуцированную дилатацию брыжеечных артерий крыс. (a) – амплитуда дилатации предварительно сокращенных фенилэфрином артерий при действии ацетилхолина (ACh): по оси абсцисс – логарифм концентрации ацетилхолина, по оси ординат – амплитуда релаксации, выраженная в процентах от амплитуды вызванной фенилэфрином констрикции (1×10^{-5} моль/л). (b) – площадь под кривой амплитуды вазодилатации при различной концентрации ацетилхолина: по оси ординат – площадь под кривой амплитуды дилатации артерий при действии ацетилхолина, усл. ед. Экспериментальные группы: DOX – крысы, получившие однократное введение 4 мг/кг доксорубина; Control – контрольная группа. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка. * – различия между группами значимы при $p < 0.05$, *** – различия между группами значимы при $p < 0.001$.

Результаты показали, что у крыс DOX-группы, по сравнению с контрольной, наблюдается ослабление вазодилатации: амплитуда релаксации значимо уменьшалась уже при концентрации АХ 1×10^{-8} моль/л, а при повышении концентрации АХ различия между группами усиливались (рис. 2a). Кроме того, расчет площади под кривой амплитуды вазодилатации при различной концентрации АХ показал, что эффективность дилатации брыжеечных артерий крыс, получивших DOX, была ниже на 19.1% ($p = 0.0001$) по сравнению с контрольными животными (рис. 2b).

Для выяснения роли эндотелийзависимой вазодилатации оценивали изменение диаметра брыжеечных артерий при действии АХ в концентрации 1×10^{-5} моль/л. Амплитуда АХ-индуцированной релаксации артерий крыс, получивших DOX, была в среднем на 15.8% меньше, чем у контрольных животных, $p = 0.0011$ (рис. 3). Была проведена оценка реакции сосудов на АХ в условиях применения блокатора эндотелиальной NO-синтазы L-NAME. Следует отметить, что диаметр сосудов, измеренный до введения в омывающий раствор L-NAME, значимо не изменялся после инкубации с данным блокатором. Амплитуда дилатации при действии АХ на фоне применения L-NAME у крыс DOX-группы оказалась в среднем на 26.4% больше, чем у контрольных животных. Однако сравнение величины вызванной АХ релаксации в отсутствие блокаторов и при блокаде NO-синтазы показало, что у животных DOX-группы инкубация брыжеечных артерий с L-NAME приводила к снижению амплитуды дилатации на $45.5 \pm 4.3\%$ по сравнению с релаксацией без блокаторов, а у контрольных – на $66.8 \pm 5.7\%$, $p < 0.001$.

Для оценки роли простагландинов в вызванной АХ вазодилатации у крыс, получивших DOX, проводили предварительную инкубацию сосудов в физиологическом растворе, содержащем блокатор циклооксигеназы индометацин и блокатор

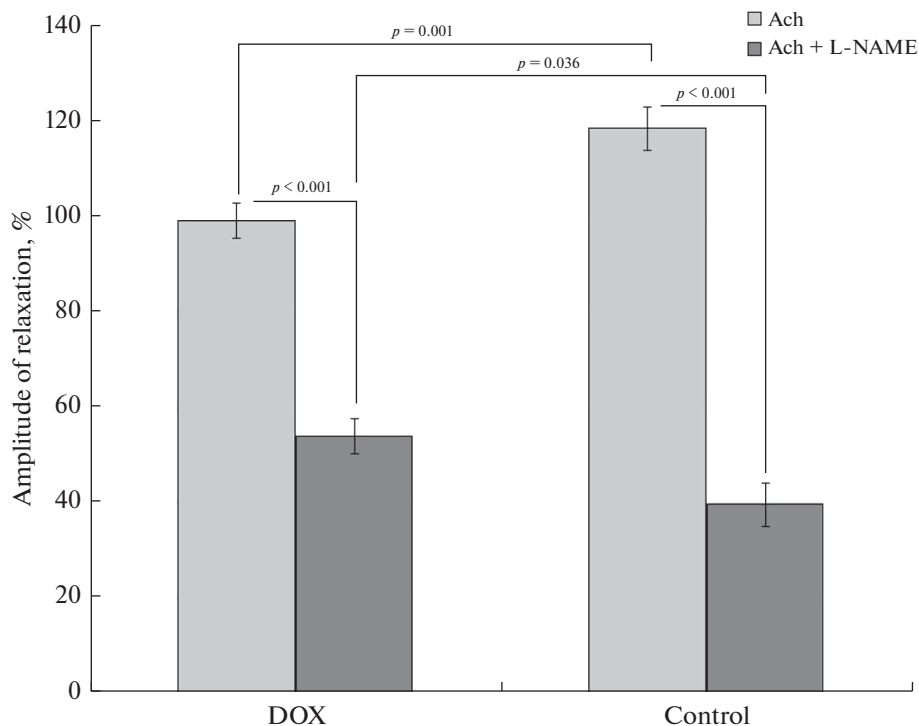


Рис. 3. Влияние доксорубина на ацетилхолин-индуцированную дилатацию предварительно сокращенных фенилэфрином брыжеечных артерий крыс при отсутствии блокаторов и при блокаде NO-синтазы инкубацией сосудов с L-NAME (1×10^{-4} моль/л). По оси ординат – амплитуда релаксации при действии ацетилхолина (ACh, 1×10^{-5} моль/л), выраженная в процентах от амплитуды вызванной фенилэфрином (1×10^{-6} моль/л) констрикции. Экспериментальные группы: DOX – крысы, получившие однократное введение 4 мг/кг доксорубина; Control – контрольная группа. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка. *p* – значимость различий.

NO-синтазы L-NAME. Исследования показали, что DOX не влиял на опосредованную циклооксигеназой АХ-индуцированную релаксацию артерий, так как инкубация с индометацином и L-NAME приводила к равному снижению вазодилатации у исследованных животных: уменьшение амплитуды составляло $12.8 \pm 1.8\%$ у контрольной и $11.9 \pm 1.7\%$ – у DOX-группы ($p > 0.05$) по сравнению с амплитудой релаксации в условиях блокады только NO-синтазы (рис. 4).

Для оценки роли K^+ -каналов в индуцированной АХ вазодилатации использовали неспецифический блокатор K^+ -каналов ТЭА при одновременном ингибировании синтеза NO и простаглицлина. Показано, что у животных, получавших DOX, амплитуда вызванной АХ релаксации после инкубации сосудов с комплексом трех блокаторов (ТЭА, L-NAME, индометацин) снижалась на $52.9 \pm 4.8\%$, тогда как у контрольных – только на $23.1 \pm 4.1\%$, $p < 0.001$ по сравнению с дилатацией в условиях блокады NO-синтазы и циклооксигеназы (рис. 4). Одновременное применение трех блокаторов не приводило к полному прекращению АХ-индуцированной дилатации сосудов, при этом амплитуда релаксации брыжеечных артерий у крыс DOX-группы и контрольной группы значимо не отличалась.

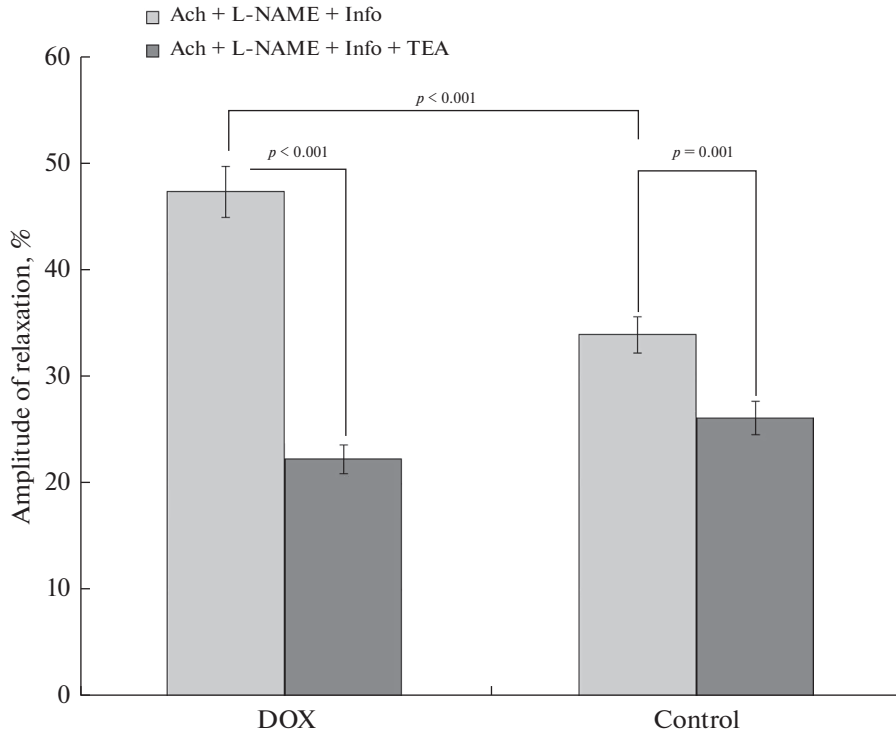


Рис. 4. Влияние доксорубицина на ацетилхолин-индуцированную дилатацию предварительно сокращенных фенилэфрином брыжеечных артерий крыс при блокаде циклооксигеназы инкубацией сосудов с индометацином (Indo), блокаде K^+ -каналов – инкубацией с тетраэтиламмонием (TEA), в комплексе с блокатором NO-синтазы L-NAME (1×10^{-4} моль/л). По оси ординат – амплитуда релаксации при действии ацетилхолина (ACh, 1×10^{-5} моль/л), выраженная в процентах от амплитуды вызванной фенилэфрином (1×10^{-6} моль/л) констрикции. Экспериментальные группы: DOX – крысы, получившие однократное введение 4 мг/кг доксорубицина; Control – контрольная группа. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка. p – значимость различий.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Клинические исследования показывают токсический эффект DOX на состояние сердечно-сосудистой системы у больных, получающих химиотерапию данным препаратом [25]. В экспериментальных исследованиях основное внимание уделялось кардиотоксическому действию DOX [5–9], а влияние DOX на состояние сосудов изучено недостаточно. В публикациях существует большой разброс результатов, являющихся следствием как разнообразия видов экспериментальных животных, так и различий в количестве введенного DOX, протоколе его введения и длительности сроков наблюдения, а также типа сосуда. Кроме того, основное количество работ проведено на изолированных сосудах, взятых от подвергнутых введению DOX животных, либо на изолированных сосудистых сегментах, которые инкубировали с DOX. Наше исследование имело цель изучить влияние DOX на реактивность сосудов в условиях *in vivo* при сохранении естественного кровотока через брыжеечные артерии. Для этого мы использовали видео- и фотофиксацию динамики диаметра брыжеечных артерий, снабжающих кровью тонкий кишечник.

В проведенном исследовании оценивались как эндотелийзависимые реакции сосудов, так и не опосредованные эндотелием. До настоящего времени неясным остается вопрос о влиянии DOX на реактивность ГМК, в частности о его влиянии на величину ФЭ-индуцированной вазоконстрикции. Имеются сообщения как о снижении вазоконстрикции на ФЭ у животных, получавших однократное введение DOX [22, 26], так и о увеличении [27], в частности сообщается об усилении констрикторной реакции на ФЭ при инкубации сосудистых колец с DOX [18].

Полученные нами результаты показали, что однократное введение 4 мг/кг DOX через 6 недель вызывало небольшое, но статистически значимое увеличение констрикторной реакции брыжеечных артерий на ФЭ. Такая повышенная реактивность может приводить к изменению баланса между вазоконстрикторными и вазодилатирующими влияниями и способствовать нарушению адекватных реакций сосудистого тонуса в ответ на различные воздействия, например, на физическую нагрузку. В отличие от исследований, проводимых на изолированных фрагментах сосудов, в которых не отмечалось повышения констрикторной реакции артерий на ФЭ у крыс, получавших DOX [22, 26], в нашем исследовании небольшое повышение реактивности на ФЭ у животных DOX-группы может быть следствием более физиологических условий эксперимента, когда сохранен естественный кровоток по исследуемому сосуду, что давало возможность участия всех вазоактивных агентов, циркулирующих в крови, в регуляции сосудистого тонуса. Стоит учитывать, что при исследовании на фрагментах сосудов *in vitro* меняется исходный тонус сосуда, сосудистое кольцо растягивается до стандартного напряжения, и его реактивность на вазоактивные агенты зависит в основном от физических характеристик вырезанного из артерии кольца (длина сегмента, толщина стенок, жесткость) и функционального состояния ГМК и эндотелия. В наших экспериментах введение ФЭ в камеру, где располагалась кишечная петля с исследуемым сосудом, производилось на фоне сохраненного исходного тонуса брыжеечных артерий, когда по всем сосудам продолжала циркулировать кровь, в которой изначально присутствовал определенный баланс различных вазоконстрикторных и вазодилатирующих факторов. Можно предположить, что усиление реактивности на ФЭ у животных DOX-группы, по сравнению с контрольной, опосредовано, в частности, различием исходного уровня NO в ГМК, которое в условиях *in vivo* может различаться между сосудами крыс разных групп. Это предположение подтверждается исследованиями, которые показали, что у крыс, получавших DOX, повышение реактивности сосудов на ФЭ коррелирует со снижением так называемого базального уровня NO (процентного увеличения вызванного ФЭ сокращения при добавлении блокатора NO-синтазы L-NAME) [28].

В наших экспериментах оценивалось влияние DOX на эндотелийзависимую реактивность артерий. Было показано, что введение DOX приводит к развитию эндотелиальной дисфункции, выраженной в снижении AX-индуцированной релаксации брыжеечных артерий DOX-крыс по сравнению с контрольной группой. Подавляющий эндотелийзависимую вазорелаксацию эффект DOX отмечался и в исследованиях [16, 23], проведенных на сосудах в условиях *in vitro*.

Для уточнения механизмов эндотелиальной дисфункции перед проведением пробы на AX мы использовали предварительную инкубацию сосудов с некоторыми блокаторами, в частности L-NAME, индометацином и ТЭА. Поскольку основные механизмы эндотелийзависимой дилатации связывают с синтезом NO, простаглицина и эндотелиальной гиперполяризацией [29, 30], в нашем исследовании мы оценивали влияние DOX на эти механизмы вызванной AX релаксации брыжеечных артерий.

Одним из основных путей эндотелийзависимой вазодилатации считают NO-зависимый механизм [31]. Его влияние определяется как количеством продуцируе-

мого эндотелием NO, так и чувствительностью ГМК к NO. Чтобы выявить причину снижения эндотелийзависимой релаксации брыжеечных артерий, нами была оценена реактивность сосудов на экзогенный источник NO – нитропруссид натрия. Проведенные исследования показали, что введение крысам DOX приводило к снижению амплитуды вазорелаксации на нитропруссид натрия. Подобный эффект отмечали и другие исследователи, например, после введения мышам однократно 4 мг/кг DOX [32]. Полученное нами у крыс DOX-группы уменьшение реактивности на нитропруссид натрия свидетельствует о снижении чувствительности ГМК к NO, что может приводить к угнетению эндотелийзависимой релаксации сосуда при действии различных вазоактивных агентов даже в случае достаточной продукции NO эндотелием.

С другой стороны, мы также оценили влияние DOX на эндотелийзависимую релаксацию сосудов, связанную с активностью NO-синтаз, продуцирующих NO. При использовании L-NAME, ингибирующего NO-синтазу, и, следовательно, преграждающего продукцию NO эндотелием, мы обнаружили значительное снижение величины АХ-индуцированного ответа брыжеечных артерий у животных обеих групп. Однако DOX вызывал повреждение NO-зависимого механизма дилатации брыжеечных артерий, которое отражалось в уменьшении разницы между амплитудой вызванной АХ релаксации до и после блокады NO-синтазы у крыс DOX-группы по сравнению с сосудами контрольных животных. Следует отметить, что вопрос о влиянии DOX на NO-зависимые механизмы вазодилатации неоднозначен. Так, на сосудах *in vitro* отмечено отсутствие эффекта DOX на опосредованный активностью эндотелиальной NO-синтазы механизм АХ-индуцируемой вазодилатации [19, 32]. Но при этом сообщается о способности DOX увеличивать транскрипцию эндотелиальной NO-синтазы, что было показано при инкубации с DOX изолированных эндотелиальных клеток аорты [33]. Кроме того, при моделировании доксорубициновой кардиотоксичности отмечается повышение уровня активности как нейрональной, так и индуцибельной NO-синтазы в миокарде [34], а введение DOX животным приводило к повышению уровня NO в миокарде, но не в крови [35]. Таким образом, существует потенциальная возможность DOX посредством различных связанных с NO механизмов модулировать реактивность сосудов. Результаты наших экспериментов на сосудах в условиях *in vivo* показали, что DOX нарушал NO-зависимые механизмы дилатации брыжеечных артерий, снижая участие данного механизма в АХ-индуцированной вазорелаксации. При этом развитие эндотелиальной дисфункции было опосредовано как снижением чувствительности сосуда к NO, так и нарушением продукции NO эндотелием.

Учитывая, что NO оказывает модулирующее влияние на продукцию эндотелием других вазодилататоров [36, 37], то оценку роли отличных от NO путей АХ-индуцированной дилатации артерий мы проводили на фоне ингибирования NO-синтазы.

Оценивая влияние DOX на связанные с простагландинами механизмы эндотелийзависимой вазодилатации, перед введением АХ проводили инкубацию сосудов в растворе с индометацином, селективным блокатором циклооксигеназы, в условиях ингибирования NO-синтазы. Циклооксигеназа ответственна за синтез простаглицлина и некоторых других простаноидов из арахидоновой кислоты [38], блокада циклооксигеназы введением в омывающий раствор индометацина приводит к прекращению продукции простаглицлинов. Показано, что основным простаглицлином, синтезируемым эндотелием, и участвующим в эндотелийзависимой вазодилатации, является простаглицлин [39]. Результаты наших экспериментов показали, что DOX не оказывал влияния на опосредованные простаглицлином пути АХ-индуцированной релаксации брыжеечных артерий, так как блокада циклооксигеназы в сосудах крыс обеих групп приводила к равному по величине снижению амплитуды дилатации по сравнению с амплитудой в условиях применения только L-NAME.

Таким образом, снижение реактивности брыжеечных артерий на АХ у животных, получавших DOX, в наших исследованиях не было связано с изменением простагландин-зависимых механизмов вазодилатации.

Кроме NO- и простагландин-зависимых путей, одним из важнейших механизмов вазодилатации является эндотелиальная гиперполяризация. Независимо от природы гиперполяризующего фактора, дилатация вследствие эндотелиальной гиперполяризации реализуется через активацию различных K^+ -каналов [40, 41], локализованных как в ГМК, так и в эндотелии [42]. Для оценки влияния DOX на опосредованную активностью Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов АХ-индуцированную дилатацию было проведено исследование реакции брыжеечных артерий на АХ после инкубации сосудов в физиологическом растворе, содержащем неспецифический блокатор K^+ -каналов ТЭА, который использовали в комплексе с L-NAME и индометацином для предупреждения влияния NO и простагландинов на эффективность других механизмов вазодилатации. Результаты показали, что после введения DOX роль блокируемых ТЭА K^+ -каналов в АХ-индуцированной релаксации усиливается, так как у крыс DOX-группы снижение амплитуды вазодилатации после применения комплекса трех блокаторов, включая ТЭА, по сравнению с реакцией сосуда в условиях ингибирования только NO- и простагландин-зависимого пути, было выражено значительно сильнее, чем в контрольной группе. Известно, что ТЭА является неспецифическим блокатором как Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов большой проводимости (BK_{Ca}), так и различных потенциал-зависимых K^+ -каналов (K_v) [43]. Считается, что роль BK_{Ca} в дилатации, опосредованной эндотелиальной гиперполяризацией, не столь значительна, как у Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов промежуточной (IK_{Ca}) и малой проводимости (SK_{Ca}) [44, 45]. Однако экспериментальные исследования с применением селективного блокатора BK_{Ca} и бериотоксина показали, что BK_{Ca} могут вовлекаться в опосредованную эндотелиальной гиперполяризацией дилатацию брыжеечных артерий, но степень их участия снижается по мере уменьшения размера сосуда [46]. При этом не было обнаружено различий в уровне экспрессии мРНК BK_{Ca} в тканях брыжеечных артерий 1-го и 4-го порядков ветвления, то есть существует потенциальная возможность экспрессии BK_{Ca} в брыжеечных сосудах разного диаметра. Наши исследования проводились преимущественно на сосудах 2-го порядка, поэтому можно предположить, что у крыс, получавших DOX, ослабление NO-зависимых механизмов АХ-индуцированной вазодилатации могло частично компенсироваться усилением активности BK_{Ca} . Условия проведения наших экспериментов не дают возможности судить о влиянии DOX на активность блокируемых ТЭА K_v , изоформы которых обнаружены в брыжеечных артериях крыс [47], при этом K_v могут модулировать величину вазодилатации [48, 49]. Считают, что при концентрации менее 10^{-3} ммоль/л ТЭА достаточно селективен для BK_{Ca} , [43] и используется для изучения участия BK_{Ca} в реактивности брыжеечных артерий [50, 51]. Несмотря на используемую в нашем исследовании концентрацию ТЭА (1×10^{-3} моль/л), нельзя отрицать вероятность одновременной блокады BK_{Ca} и некоторых K_v , поэтому мы не можем исключать возможность модулирующего влияния K_v на АХ-индуцированную дилатацию сосудов при снижении связанных с NO механизмов.

О влиянии DOX на опосредованную IK_{Ca} и SK_{Ca} вазодилатацию судили по величине АХ-индуцированной релаксации, развиваемой сосудами после применения комплекса трех блокаторов – L-NAME, индометацина и ТЭА. Результаты показали, что амплитуда релаксации сосудов после инкубации с комплексом блокаторов не отличалась у крыс разных групп. Это свидетельствует об отсутствии влияния

DOX на активность IK_{Ca} и SK_{Ca} в обусловленной эндотелиальной гиперполяризацией релаксации сосудов, исследованных *in vivo*. Следует отметить, что в литературе имеются сведения, полученные в экспериментах на изолированных сосудах, в которых показано уменьшение вазорелаксации, опосредованной эндотелиальной гиперполяризацией, при снижении экспрессии IK_{Ca} и SK_{Ca} у животных, получавших DOX [43]. Кроме того, показано, что DOX вызывает нарушение структуры эндотелия [43], что приводит не только к нарушению продукции эндотелием вазоактивных агентов, но и препятствует генерации и распространению эндотелиальной гиперполяризации. Отсутствие влияния DOX на опосредованную активностью IK_{Ca} и SK_{Ca} дилатацию в наших экспериментах можно объяснить существенно меньшим количеством введенного крысам DOX (4 мг/кг однократно), поскольку в работе Idris-Khodja и соавт. [43] крысам вводили DOX в значительно большем количестве (суммарно 15 мг/кг).

Таким образом, наши исследования показали, что DOX влияет на реактивность брыжеечных артерий крыс, вызывая развитие эндотелиальной дисфункции: DOX повышает констрикторные реакции на ФЭ и снижает эндотелийзависимую вазорелаксацию. При этом ослабление АХ-индуцированной дилатации у крыс, получавших DOX, опосредовано нарушением NO-зависимых механизмов. DOX не оказывал влияния на эффективность опосредованных простагландинами механизмов вызванной АХ вазодилатации, а также не изменял связанных с активностью IK_{Ca} и SK_{Ca} путей АХ-индуцированной дилатации. Предполагается, что снижение эффективности NO-зависимого пути регуляции сосудистого тонуса у крыс после введения DOX может, в некоторой степени, компенсироваться усилением роли VK_{Ca} в стимулированной АХ релаксации брыжеечных артерий.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор данной статьи сообщает об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы, планирование и проведение эксперимента, получение и обработка данных, написание и редактирование манускрипта (Г.Т.И.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bray F, Laversanne M, Weiderpass E, Soerjomataram I (2021) The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer* 127(16): 3029–3030. <https://doi.org/10.1002/cncr.33587>
2. Cardinale D, Colombo A, Bacchiani G, Tedeschi I, Meroni CA, Veglia F, Civelli M, Lamantia G, Colombo N, Curigliano G, Fiorentini C, Cipolla CM (2015) Early detection of anthracycline cardiotoxicity and improvement with heart failure therapy. *Circulation* 131(22): 1981–1988. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013777>
3. Octavia Y, Tocchetti C, Gabrielson K, Janssens S, Crijns H, Moens A (2012) Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol* 52: 1213–1225. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.03.006>
4. Luu AZ, Chowdhury B, Al-Omran M, Teoh H, Hess DA, Verma S (2018) Role of Endothelium in Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. *JACC Basic Transl Sci* 3(6): 861–870. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2018.06.005>

5. *Christidi E, Brunham LR* (2021) Regulated cell death pathways in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cell Death Dis* 12(4): 339.
<https://doi.org/10.1038/s41419-021-03614-x>
6. *Li D, Yang Y, Wang S, He X, Liu M, Bai B, Tian C, Sun R, Yu T, Chu X* (2021) Role of acetylation in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Redox Biol* 46: 102089.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102089>
7. *Sun X, Chen G, Xie Y, Jiang D, Han J, Chen F, Song Y* (2020) Qiliqiangxin improves cardiac function and attenuates cardiac remodelling in doxorubicin-induced heart failure rats. *Pharmaceutical Biol* 58(1): 417–426.
<https://doi.org/10.1080/13880209.2020.1761403>
8. *Tan C, Zeng J, Wu G, Zheng L, Huang M, Huang X* (2021) Xinsuitong Capsule extract attenuates doxorubicin-induced myocardial edema via regulation of cardiac aquaporins in the chronic heart failure rats. *Biomed Pharmacother* 144: 112261.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112261>
9. *Wu BB, Leung KT, Poon EN-Y* (2022) Mitochondrial-Targeted Therapy for Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Int J Mol Sci* 23(3): 1912.
<https://doi.org/10.3390/ijms23031912>
10. *Wen J, Zhang L, Liu H, Wang J, Li J, Yang Y, Wang Y, Cai H, Li R, Zhao Y* (2019) Salsolinol Attenuates Doxorubicin-Induced Chronic Heart Failure in Rats and Improves Mitochondrial Function in H9c2 Cardiomyocytes. *Front Pharmacol* 10: 1135.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01135>
11. *Huang C, Qiu S, Fan X, Jiao G, Zhou X, Sun M, Weng N, Gao S, Tao X, Zhang F, Chen W* (2021) Evaluation of the effect of Shengxian Decoction on doxorubicin-induced chronic heart failure model rats and a multicomponent comparative pharmacokinetic study after oral administration in normal and model rats. *Biomed Pharmacother* 144: 112354.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112354>
12. *Pajović V, Kováčsházi C, Kosić M, Vasić M, Đukić L, Brenner GB, Giricz Z, Bajić D, Ferdinandy P, Japundžić-Žigon N* (2021) Phenomapping for classification of doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 423: 115579.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2021.115579>
13. *Simůnek T, Stérba M, Popelová O, Adamcová M, Hrdina R, Gersl V* (2009) Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep* 61(1): 154–171.
[https://doi.org/10.1016/s1734-1140\(09\)70018-0](https://doi.org/10.1016/s1734-1140(09)70018-0)
14. *Takemura G, Fujiwara H* (2007) Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog Cardiovasc Dis* 49(5): 330–352.
<https://doi.org/10.1016/j.pcad.2006.10.002>
15. *Zhang Y-W, Shi J, Li Y-J, Wei L* (2009) Cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Archiv Immunol Therap Exp (Warsz)* 57(6): 435–445.
<https://doi.org/10.1007/s00005-009-0051-8>
16. *He H, Wang L, Qiao Y, Zhou Q, Li H, Chen S, Yin D, Huang Q, He M* (2020) Doxorubicin Induces Endotheliotoxicity and Mitochondrial Dysfunction via ROS/eNOS/NO Pathway. *Front Pharmacol* 10: 1531.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01531>
17. *Tokarska-Schlattner M, Zaugg M, Zuppinger C, Wallimann T, Schlattner U* (2006) New Insights into Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: The Critical Role of Cellular Energetics. *J Mol Cell Cardiol* 41: 389–405.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2006.06.009>
18. *Henidi HA, Al-Abbasi FA, El-Moselhy MA, El-Bassossy HM, Al-Abd AM* (2020) Despite Blocking Doxorubicin-Induced Vascular Damage, Quercetin Ameliorates Its Antibreast Cancer Activity. *Oxid Med Cell Longev* 2020: 8157640.
<https://doi.org/10.1155/2020/8157640>
19. *den Hartog GJ, Boots AW, Haenen GR, van der Vijgh WJ, Bast A* (2003) Lack of inhibition of endothelial nitric oxide synthase in the isolated rat aorta by doxorubicin. *Toxicol In Vitro* 17(2): 165–167.
[https://doi.org/10.1016/s0887-2333\(03\)00007-9](https://doi.org/10.1016/s0887-2333(03)00007-9)
20. *Murata T, Yamawaki H, Yoshimoto R, Hori M, Sato K, Ozaki H, Karaki H* (2001) Chronic effect of doxorubicin on vascular endothelium assessed by organ culture study. *Life Sci* 69(22): 2685–2695.
[https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(01\)01352-2](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(01)01352-2)
21. *Sonowal H, Pal P, Shukla K, Saxena A, Srivastava SK, Ramana KV* (2018) Aldose reductase inhibitor, fidarestat prevents doxorubicin-induced endothelial cell death and dysfunction. *Biochem Pharmacol* 150: 181–190.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.02.018>
22. *Bosman M, Krüger DN, Favere K, Wesley CD, Neutel CHG, Van Asbroeck B, Diebels OR, Faes B, Schenk TJ, Martinet W, De Meyer GRY, Van Craenenbroeck EM, Guns P-JDF* (2021) Doxorubi-

- cin Impairs Smooth Muscle Cell Contraction: Novel Insights in Vascular Toxicity. *Int J Mol Sci* 22(23): 12812.
<https://doi.org/10.3390/ijms222312812>
23. Clayton ZS, Brunt VE, Hutton DA, Van Dongen NS, D'Alessandro A, Reisz JA, Ziembra BP, Seals DR (2020) Doxorubicin-Induced Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction in Conduit Arteries Is Prevented by Mitochondrial-Specific Antioxidant Treatment. *JACC Cardio Oncol* 2(3): 475–488.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.06.010>
 24. Shen B, Ye CL, Ye KH, Zhuang L, Jiang JH (2009) Doxorubicin-induced vasomotion and $[Ca^{2+}]_i$ elevation in vascular smooth muscle cells from C57BL/6 mice. *Acta Pharmacol Sin* 30: 1488–1495.
<https://doi.org/10.1038/aps.2009.145>
 25. Tantawy M, Pamittan FG, Singh S, Gong Y (2021) Epigenetic Changes Associated With Anthracycline-Induced Cardiotoxicity. *Clin Translat Sci* 14(1): 36–46.
<https://doi.org/10.1111/cts.12857>
 26. Gibson NM, Greufe SE, Hydock DS, Hayward R (2013) Doxorubicin-induced vascular dysfunction and its attenuation by exercise preconditioning. *J Cardiovasc Pharmacol* 62(4): 355–360.
<https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e31829c9993>
 27. Bosman M, Favere K, Neutel CHG, Jacobs G, De Meyer GRY, Martinet W, Van Craenenbroeck EM, Guns PDF (2021) Doxorubicin induces arterial stiffness: A comprehensive *in vivo* and *ex vivo* evaluation of vascular toxicity in mice. *Toxicol Lett* 346: 23–33.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2021.04.015>
 28. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Feletou M, Tang EH (2017) Endothelial dysfunction and vascular disease – a 30th anniversary update. *Acta Physiol (Oxf)* 219(1): 22–96.
<https://doi.org/10.1111/apha.12646>
 29. Rubanyi GM (1991) Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *J Cell Biochem* 46(1): 27–36.
<https://doi.org/10.1002/jcb.240460106>
 30. Freed JK, Gutterman DD (2017) Communication Is Key: Mechanisms of Intercellular Signaling in Vasodilation. *J Cardiovasc Pharmacol* 69(5): 264–272.
<https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000463>
 31. Olukman M, Can C, Erol A, Oktem G, Oral O, Cinar MG (2009) Reversal of doxorubicin-induced vascular dysfunction by resveratrol in rat thoracic aorta: Is there a possible role of nitric oxide synthase inhibition? *Anadolu Kardiyol Derg* 9(4): 260–266.
 32. Idris-Khodja N, Di Marco P, Farhat M, Geny B, Schini-Kerth VB (2013) Grape-Derived Polyphenols Prevent Doxorubicin-Induced Blunted EDH-Mediated Relaxations in the Rat Mesenteric Artery: Role of ROS and Angiotensin II. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013: 516017.
<https://doi.org/10.1155/2013/516017>
 33. Kalivendi SV, Kotamraju S, Zhao H, Joseph J, Kalyanaraman B (2001) Doxorubicin-induced apoptosis is associated with increased transcription of endothelial nitric-oxide synthase. Effect of antiapoptotic antioxidants and calcium. *J Biol Chem* 276(50): 47266–47276.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M106829200>
 34. Deng S, Kruger A, Schmidt A, Metzger A, Yan T, Gödtel-Armbrust U, Hasenfuss G, Brunner F, Wojnowski L (2009) Differential roles of nitric oxide synthase isozymes in cardiotoxicity and mortality following chronic doxorubicin treatment in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 380(1): 25–34.
<https://doi.org/10.1007/s00210-009-0407-y>
 35. Sayed-Ahmed MM, Khattab MM, Gad MZ, Osman AM (2001) Increased plasma endothelin-1 and cardiac nitric oxide during doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Pharmacol Toxicol* 89(3): 140–144.
<https://doi.org/10.1034/j.1600-0773.2001.d01-148.x>
 36. Looft-Wilson RC, Ashley BS, Billig JE, Wolfert MR, Ambrecht LA, Bearden SE (2008) Chronic diet-induced hyperhomocysteinemia impairs eNOS regulation in mouse mesenteric arteries. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295(1): R59–R66.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00833.2007>
 37. Giles TD, Sander GE, Nossaman BD, Kadowitz PJ (2012) Impaired vasodilation in the pathogenesis of hypertension: focus on nitric oxide, endothelial-derived hyperpolarizing factors, and prostaglandins. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 14(4): 198–205.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-7176.2012.00606.x>
 38. Larsen BT, Gutterman DD, Hatoum OA (2006) Emerging role of epoxyeicosatrienoic acids in coronary vascular function. *Eur J Clin Invest* 36(5): 293–300.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2006.01634.x16634832>
 39. Parkington HC, Coleman HA, Tare M (2004) Prostacyclin and endothelium-dependent hyperpolarization. *Pharmacol Res* 49(6): 509–514.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2003.11.012>

40. Jin X, Satoh-Otonashi Y, Zamami Y, Takatori S, Hashikawa-Hobara N, Kitamura Y, Kawasaki H (2011) New molecular mechanisms for cardiovascular disease: contribution of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the regulation of vasoconstriction in peripheral resistance arteries. *J Pharmacol Sci* 116(4): 332–336.
<https://doi.org/10.1254/jphs.10r30fm>
41. Mandalà M, Gokina N, Barron C, Osol G (2012) Endothelial-derived hyperpolarization factor (EDHF) contributes to PLGF-induced dilation of mesenteric resistance arteries from pregnant rats. *J Vasc Res* 49: 43–49.
<https://doi.org/10.1159/000329821>
42. Busse R, Edwards G, Félétou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH (2002) EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci* 23(8): 374–380.
[https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(02\)02050-3](https://doi.org/10.1016/s0165-6147(02)02050-3)
43. Tykocki NR, Boerman EM, Jackson WF (2017) Smooth Muscle Ion Channels and Regulation of Vascular Tone in Resistance Arteries and Arterioles. *Compr Physiol* 16;7(2): 485–581.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c160011>
44. Grgic I, Kaistha BP, Hoyer J, Kohler R (2009) Endothelial Ca^{2+} -activated K^{+} channels in normal and impaired EDHF-dilator responses-relevance to cardiovascular pathologies and drug discovery. *Br J Pharmacol* 157: 509–526.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00132.x>
45. Crane GJ, Gallagher N, Dora KA, Garland CJ. (2003) Small- and intermediate-conductance calcium-activated K^{+} channels provide different facets of endothelium-dependent hyperpolarization in rat mesenteric artery. *J Physiol* 553(Pt1): 183–189.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.051896>
46. Hilgers RH, Todd J Jr, Webb RC (2006) Regional heterogeneity in acetylcholine-induced relaxation in rat vascular bed: role of calcium-activated K^{+} channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291(1): H216–H222.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.01383.2005>
47. Lu Y, Hanna ST, Tang G, Wang R (2002) Contributions of $Kv1.2$, $Kv1.5$ and $Kv2.1$ subunits to the native delayed rectifier K^{+} current in rat mesenteric artery smooth muscle cells. *Life Sci* 71: 1465–1473.
[https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(02\)01922-7](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(02)01922-7)
48. González C, Baez-Nieto D, Valencia I, Oyarzún I, Rojas P, Naranjo D, Latorre R (2012) K^{+} channels: function-structural overview. *Compr Physiol* 2(3): 2087–2149.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c110047>
49. Jackson WF (2018) K_V channels and the regulation of vascular smooth muscle tone. *Microcirculation* (1): 10.1111/micc.12421.
<https://doi.org/10.1111/micc.12421>
50. Lucchesi PA, Belmadani S, Matrougui K (2005) Hydrogen peroxide acts as both vasodilator and vasoconstrictor in the control of perfused mouse mesenteric resistance arteries. *J Hypertens* 23: 571–579.
<https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000160214.40855.79>
51. Jackson-Weaver O, Paredes DA, Gonzalez Bosc LV, Walker BR, Kanagy NL (2011) Intermittent hypoxia in rats increases myogenic tone through loss of hydrogen sulfide activation of large-conductance Ca^{2+} -activated potassium channels. *Circ Res* 108: 1439–1447.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.228999>

Effect of Doxorubicin on the Reactivity of the Mesenteric Arteries of Wistar Rats

G. T. Ivanova*

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

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

Doxorubicin is used as an anticancer agent, but it has a negative effect on the cardiovascular system. The main attention is paid to the cardiotoxic effect, and the mechanisms of its action on the vessels are not well understood. Our *in vivo* study evaluated the reactivity of rat mesenteric arteries to vasoactive agents, as well as the involvement of mechanisms of endothelium-dependent vasodilation in rats treated with a single dose of 4 mg/kg of doxorubicin. The experimental group of Wistar rats was injected once intraperitoneally with doxorubicin (4 mg/kg), the control animals received physiological saline in an equal volume. After 6 weeks, the reactivity of the mesenteric arteries to acetylcholine (ACh), sodium nitroprusside, and phenylephrine was examined. To clarify the mechanisms of endothelium-dependent vasodilation, blockers were used: NO-synthase –

L-NAME, Ca^{2+} -activated K^{+} -channels of high conductivity – tetraethylammonium. To assess the reactivity of arteries in vivo, microphotographic and video recording of the diameter of the mesenteric arteries of rats was performed (Biomed MC-1T-ZOOM microscope and Basler BASLER acA4600-10uc camera), the results were processed in the MultiMedia Catalog program. Doxorubicin modified the reactivity of the mesenteric arteries of rats: it increased the constrictor reactions of phenylephrine and inhibited endothelium-dependent vasorelaxation on ACh. At the same time, the administration of doxorubicin to rats led to a decrease in the efficiency of NO-dependent mechanisms of regulation of vascular tone (estimated by the difference in the amplitude of ACh-induced vasodilation before and after L-NAME application), as well as to a decrease in the relaxation of arteries to sodium nitroprusside, compared with control animals. Doxorubicin had no effect on the effectiveness of prostaglandin-mediated and Ca^{2+} -activated K^{+} -channels of intermediate and low conduction mechanisms of endothelium-dependent vasodilation.

Keywords: doxorubicin, mesenteric artery, endothelium, acetylcholine-induced dilation, vasoconstriction, phenylephrine, sodium nitroprusside, Wistar

ВКЛАД IK_{Ca} -КАНАЛОВ В ДИЛАТАЦИЮ ПИАЛЬНЫХ АРТЕРИЙ У МОЛОДЫХ КРЫС ПОСЛЕ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ

© 2022 г. В. Н. Шуваева¹, *, О. П. Горшкова¹

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

*E-mail: shuvaevavn@infran.ru

Поступила в редакцию 13.07.2022 г.

После доработки 23.09.2022 г.

Принята к публикации 27.09.2022 г.

Исследование взаимосвязи между первичным ишемическим поражением и последующими изменениями в церебральной сосудистой сети остается актуальным. Нарушение мозгового кровотока после ишемии/реперфузии (И/Р) может быть обусловлено эндотелиальной дисфункцией, которая характеризуется дисбалансом в высвобождении вазоактивных факторов, что приводит к изменению сосудистого тонуса. Изменение функциональной активности кальций-чувствительных калиевых каналов промежуточной проводимости (IK_{Ca}) может влиять на эндотелий сосудов, но данные о вазоактивной роли IK_{Ca} -каналов в сосудах головного мозга после И/Р немногочисленны. Целью данной работы являлось изучение вклада IK_{Ca} -каналов в регуляцию тонуса пиальных артерий после перенесенной ишемии/реперфузии у молодых крыс. Изучали изменение вклада IK_{Ca} -каналов в поддержание сосудистого тонуса и индуцированную ацетилхолином (АХ) дилатацию пиальных артерий крыс Вистар в возрасте 4 месяцев после однократной И/Р (пережатие обеих сонных артерий с одновременным снижением и строгим поддержанием среднего АД на уровне 45 ± 2 мм рт. ст. в течение 12 мин) в разные сроки постишемического периода. Исследование сосудов проводили на 2-, 7-, 14- и 21-е сутки после И/Р. Методом прижизненной микрофотосъемки оценивали реакции артерий у крыс, перенесших ишемию, и ложнооперированных крыс. Изменение вклада IK_{Ca} -каналов в поддержание тонуса пиальных артерий оценивали по изменению числа артерий, сузившихся в ответ на действие блокатора IK_{Ca} -каналов (клотримазол, 10^{-7} М, 5 мин). Изменение вклада IK_{Ca} -каналов в дилатацию сосудов оценивали, сравнивая число и степень АХ-индуцированной (ацетилхолин хлорид, 10^{-7} М, 8 мин) дилатации артерий до и на фоне блокады IK_{Ca} -каналов. Установлено, что однократная глобальная И/Р коры головного мозга ведет к изменению вклада IK_{Ca} -каналов в поддержание базального тонуса пиальных артерий крыс, сохраняющемуся в течение 21 сут после восстановления кровотока. Через 2 сут снижается вклад IK_{Ca} -каналов в тонус крупных пиальных артерий. А в последующий постишемический период наблюдается последовательное усиление вклада этих каналов в поддержание тонуса сосудов всех исследованных диаметров. Вклад IK_{Ca} -каналов в АХ-опосредованную дилатацию пиальных артерий у перенесших ишемию крыс в разные сроки постишемического периода также меняется и в большой степени зависит от диаметра артериальных сосудов. Через 2 сут после И/Р увеличивается вклад IK_{Ca} -каналов в дилатацию на АХ артерий среднего калибра. На 7-е сутки число IK_{Ca} -опосредованных дилатаций снижается, и эти изменения наблюдаются в группах средних и крупных артерий. В последующие 14 сут роль IK_{Ca} -каналов в АХ-индуцированной дилатации крупных пиальных артерий восстанавливается до уровня показателей у ложнооперированных крыс, а в группах мелких и средних артерий усиливается. Таким образом, разная активность IK_{Ca} -каналов в АХ-опосредованной вазоди-

латации продемонстрирована не только в артериях разного калибра, но и в разные сроки постишемического периода.

Ключевые слова: ишемия головного мозга, дилатация пиальных артерий, кальций чувствительные калиевые каналы промежуточной проводимости

DOI: 10.31857/S0869813922110127

Сосудистые заболевания головного мозга – актуальная медицинская и социальная проблема. Ишемия головного мозга становится все более распространенным заболеванием, которое поражает не только пожилых, но и более молодых людей. Данной проблеме уделяется много внимания, поскольку это заболевание является одной из причин, ведущих к инсульту, деменции и инвалидности [1]. Даже кратковременное прекращение кровоснабжения головного мозга вызывает тканевую гипоксию. Последующая реперфузия хотя и восстанавливает кровоток, но не всегда полностью, и часто приводит к дополнительным повреждениям ткани. Поэтому исследование взаимосвязи между первичным ишемическим поражением и последующими изменениями в церебральной сосудистой сети остается актуальным.

Церебральные коллатерали являются дублирующими сосудистыми путями, которые при блокировании магистральных сосудов могут частично поддерживать приток крови к подвергшейся ишемии ткани [2, 3]. В изменениях мозгового кровотока после ишемии/реперфузии (И/Р) большую роль играет эндотелиальная дисфункция мозговых сосудов, обусловленная нарушениями NO -опосредованных механизмов сосудистой регуляции [4–6]. Компенсаторным сосудорасширяющим механизмом в этом случае может являться эндотелиальная гиперполяризация (EDH) [4, 7, 8], механизм которой пока до конца не выяснен, а на роль продуцируемых эндотелием факторов EDH претендуют различные вещества. Считается, что значительный вклад в эндотелиальную гиперполяризацию вносят кальций-чувствительные калиевые каналы промежуточной проводимости (IK_{Ca}) [4, 7, 8]. Однако некоторые исследователи считают, что EDH может вызвать электрическая связь, возникающая между эндотелием и мышечной тканью через электрические щелевые каналы, без участия химических медиаторов [9]. Можно ли нарушение перфузии мозговой ткани в результате перенесенной И/Р объяснить изменением вклада IK_{Ca} -каналов в эндотелий-зависимую дилатацию сосудов головного мозга, предстоит выяснить. Авторы работы [4] полагают, что EDH и, следовательно, IK_{Ca} -каналы играют большую сосудорасширяющую роль в сосудах малого и большого калибра, однако необходимы дальнейшие исследования для изучения различий между реакциями мозговых сосудов различного диаметра.

Целью данной работы являлось изучение вклада IK_{Ca} -каналов в регуляцию тонуса пиальных артерий после перенесенной ишемии/реперфузии у молодых крыс. Задачей исследования было выяснить, как изменяется вклад IK_{Ca} -каналов в базальный тонус и в опосредованную ацетилхолином (АХ) дилатацию пиальных артерий разных калибров у крыс в возрасте 4 месяцев в разные сроки постишемического периода – на 2-, 7-, 14- и 21-е сутки после перенесенной животными ишемии коры головного мозга.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 4-месячных самцах крыс Вистар ($n = 44$) массой 250–350 г из ЦКП “Биоколлекция ИФ РАН”. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекоменда-

циям Комиссии по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН. 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).

Ишемию коры головного мозга воспроизводили путем окклюзии обеих сонных артерий, сопровождавшейся управляемой гипотензией – техники, известной в англоязычной литературе как “2-vessel occlusion + hypotension model”, в авторской модификации [10]. Наркотизированные хлоралгидратом (внутрибрюшинно, 43 мг/100 г массы тела) крысы подвергались 12-минутной окклюзии обеих сонных артерий с одновременным снижением и точным поддержанием артериального давления (АД) на уровне 45 ± 2 мм рт. ст. путем забора/реинфузии крови (1.2–1.7 мл/100 г массы тела) в гепаринизированный шприц. АД измеряли инвазивно через катетер в бедренной артерии, соединенный с датчиком DTXPlus™ (Argon Critical Care Systems, Сингапур), подключенным к микроконтроллеру (STMicroelectronics, США), выход которого был соединен с компьютером через порт USB. Визуализация значений АД осуществлялась с помощью оригинальной программы, разработанной в нашей лаборатории. Расчет среднего АД в реальном времени производился программой по классической формуле:

$$P_{\text{ср}} = P_{\text{д}} + 1/3(P_{\text{с}} - P_{\text{д}}),$$

где $P_{\text{ср}}$ – среднее артериальное давление (мм рт. ст.), $P_{\text{с}}$ – систолическое давление (мм рт. ст.), $P_{\text{д}}$ – диастолическое давление (мм рт. ст.).

По окончании периода ишемии производились полная реинфузия забранной крови и ушивание операционных ран. До выхода из наркоза крысы содержались на электрогрелках (S315, EcoSapiens, Россия) при температуре 38°C. Затем их возвращали в клетки обычного содержания.

Постишемические изменения исследовали в отдельных группах крыс: на 2-, 7-, 14- и 21-е сутки после ишемии. Контролем служили ложнооперированные животные (ЛО). Этим крыс подвергали аналогичному оперативному вмешательству, но без проведения ишемии. Исследования на ЛО крысах проводили в отдельных группах также на 2-, 7-, 14- и 21-е сутки после операции.

Для прижизненного исследования реакций пиальных артерий крыс наркотизировали хлоралгидратом (внутрибрюшинно, 43 мг/100 г массы тела). В теменной области черепа животного высверливали отверстие ($S \approx 1 \text{ см}^2$), твердую мозговую оболочку в пределах которого удаляли, тем самым открывая поле для дальнейшего исследования. Поверхность мозга непрерывно орошали раствором Кребса (в мМ: NaCl 120.4; KCl 5.9; NaHCO₃ 15.5; MgCl₂ 1.2; CaCl₂ 2.5; NaH₂PO₄ 1.2; глюкоза 11.5; pH 7.4), аэрированного карбогеном. Раствор для орошения, как и все другие применяемые растворы, в течение всего эксперимента содержали в медицинском водяном термостате (TW-2, SIA “ELMI”, Латвия) при температуре 37°C. На протяжении всего эксперимента контролировали среднее АД, показатели которого оставались примерно на одном уровне и составляли 127 ± 4 мм рт. ст. Температуру тела животного поддерживали на уровне 38°C. Визуализацию пиальных артерий проводили с помощью оригинальной установки, включающей в себя стереоскопический микроскоп MC-2ZOOM (“Микромед”, Россия), камеру-видеоокуляр для микроскопа Basler acA 4600-10uc (Германия) и персональный компьютер.

При проведении эксперимента крыс разделяли на 8 отдельных групп: крысы на 2-, 7- ($n = 5$ в каждой группе), 14- ($n = 6$) и 21-е ($n = 7$) сутки после перенесенной ишемии и ЛО крысы на 2-, 7-, 14- ($n = 5$ в каждой группе) и 21-е ($n = 6$) сутки после оперативного вмешательства. Исследовали реакции сосудов на орошение поверхности головного мозга раствором ацетилхолин хлорида (Acetylcholine chloride,

Sigma-Aldrich, 10^{-7} М, 5 мин) в отсутствие и на фоне блокады IK_{Ca} -каналов раствором клотримазола (Акрихин, Польша) в концентрации 10^{-5} М (предварительное орошение поверхности головного мозга в течение 5 мин с последующим добавлением АХ в раствор блокатора). Фоновую реакцию на воздействие АХ в каждой группе принимали за 100%. Проверка по критерию Краскела–Уоллеса показала отсутствие значимых различий между отдельными животными в фоновых реакциях на воздействие АХ внутри каждой из исследованных групп. Общая продолжительность эксперимента составляла 50–80 мин, после чего животных выводили из эксперимента передозировкой раствора хлоралгидрата (60 мг/100 г массы тела).

Диаметр сосудов измеряли на статических изображениях с помощью оригинальной компьютерной программы “Blood Vessel Media Analyzer” (© Denis Chouvaev, Швеция). В программе предусмотрен режим контраста и увеличения изображения, а также калибровки для пересчета всех координат в метрические единицы. С использованием программы измеряли ширину потока эритроцитов, соответствующую внутреннему диаметру сосуда. Об изменении вклада IK_{Ca} -каналов в тонус сосудов судили по изменению числа артерий, сузившихся в ответ на воздействие клотримазола, блокатора IK_{Ca} -каналов. Изменение вклада данных каналов в дилатацию артерий оценивали, сравнивая число дилатированных сосудов и степень их дилатации в ответ на воздействие АХ до и после применения блокатора.

У каждой крысы было измерено от 20 до 75 участков сосудов. В литературе имеются сведения о том, что вклад EDH в эндотелий-зависимые релаксации неоднороден и варьирует в зависимости от размера сосудов [11–13]. Поэтому для последующего анализа сосуды были разделены на группы в соответствии с их диаметрами: мелкие артерии (диаметром менее 20 мкм), средние артерии (от 20 до 40 мкм) и крупные артерии (более 40 мкм). Данные по отдельной группе сосудов усредняли для каждого животного и использовали для статистических сравнений.

Изменение количества расширившихся и сузившихся артерий на воздействие препарата выражали в процентах относительно общего числа исследованных артерий в группе. Степень дилатации ΔD %: рассчитывали по формуле:

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

где D_1 – диаметр сосуда до воздействия АХ, D_2 – после воздействия.

Изменения диаметра в покое не превышали $5.0 \pm 0.5\%$, поэтому при таких значениях считали, что реакция на воздействие отсутствует.

Статистический анализ данных проводили с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel 2019 и программы InStat 3.02 (“GraphPad Software Inc.”, США). Для проверки выборки на нормальность распределения использовали тест Колмогорова–Смирнова, уровень значимости составлял $p \geq 0.2$, это свидетельствует о том, что групповые выборки данных подчинялись закону нормального распределения. Затем оценивали значения до и после аппликации препаратов, используя парный критерий Стьюдента и двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) для факторов “контроль–препарат” и “подвергшиеся ишемии–ложнооперированные”. При распределении вариант в выборке отличным от нормального, при сравнении двух групп использовали U-критерий Манна–Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0.05$. Данные представлены в виде среднего арифметического значения и его ошибки ($M \pm SE$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На 2-е сутки постишемического периода у крыс наблюдалось угнетение АХ-индуцированной дилатации только крупных артерий, число дилатаций снизилось на 45% относительно показателей у ЛО крыс (ЛО: 56.8 ± 6.1 и И/Р: $31.2 \pm 1.5\%$, $p = 0.04$,

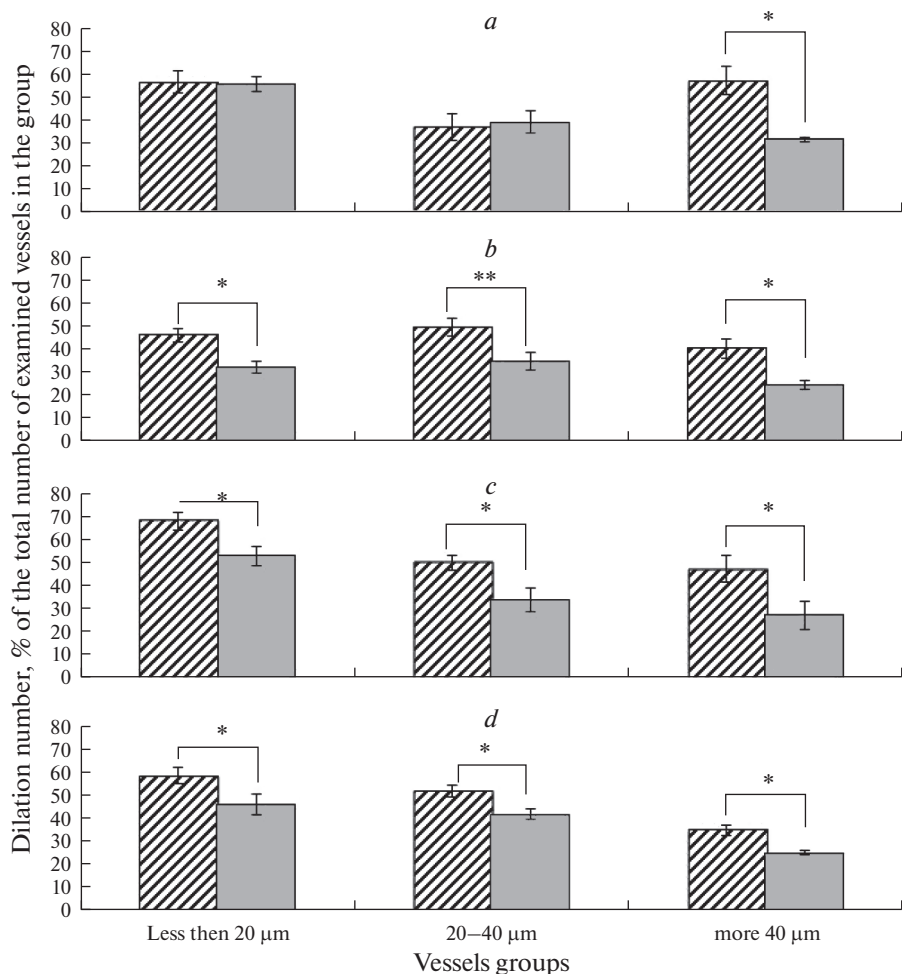


Рис. 1. Дилатация пиальных артерий на воздействие АХ. Косая штриховка – ЛО крысы; серая заливка – крысы после И/Р (*a* – 2 сут; *b* – 7 сут; *c* – 14 сут; *d* – 21 сут). Различия статистически значимы: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ (U-критерий Манна–Уитни).

U-критерий = 36) (рис. 1а). На 7-е сутки после И/Р у перенесших это воздействие крыс, по сравнению с ЛО, число АХ-индуцированных дилатаций снизилось на 40% в группе крупных артерий и на 30% в остальных группах исследованных артерий. Уменьшение числа АХ-индуцированных дилатаций у подвергнутых И/Р крыс, по сравнению с ЛО, наблюдалось также на 14-е (на 22, 32 и 42% у мелких, средних и крупных артерий соответственно) и 21-е сутки (на 21, 19 и 28% у мелких, средних и крупных артерий соответственно) постшемического периода во всех группах исследованных артерий (рис. 1b–d). Достоверных изменений амплитуды дилатаций артерий на АХ в течение исследованного постшемического периода (2–21-е сутки) не отмечено.

Апликация клотримазола у ЛО крыс на 2-е сутки после операции вызвала констрикцию 58–64% артерий во всех группах исследованных сосудов (рис. 2а).

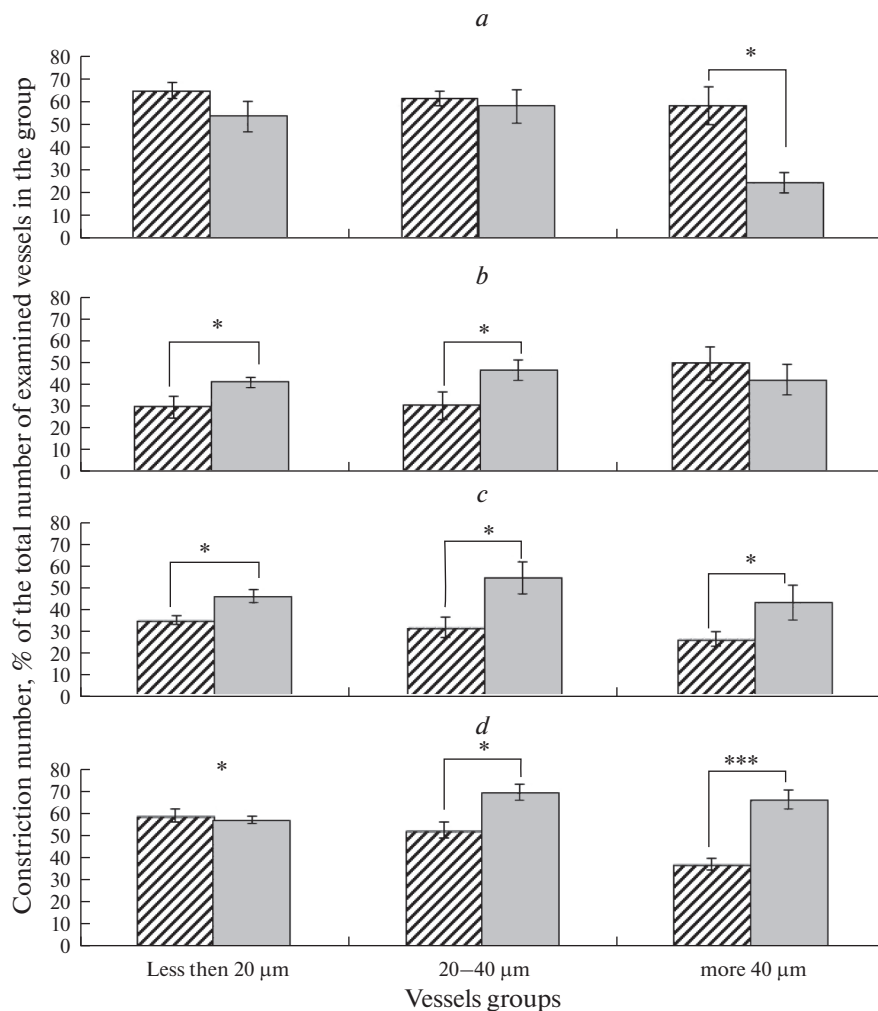


Рис. 2. Констрикция пиальных артерий различных диаметров на воздействие блокатора IK_{Ca} -каналов (клотримазола). Косая штриховка – ЛО крысы; серая заливка – крысы после И/Р (*a* – 2 сут; *b* – 7 сут, *c* – 14 сут; *d* – 21 сут). Различия статистически значимы: * – $p < 0.05$, *** – $p < 0.001$ (U-критерий Манна–Уитни).

При блокировании IK_{Ca} -каналов уменьшалось число АХ-индуцированных дилатаций во всех группах артерий: мелких – на 70%, средних – на 45% и крупных – на 80% (рис. 3а). Амплитуда дилатации в группе мелких и крупных сосудов также значительно снижалась (примерно на 40 и 60% соответственно), тогда как у средних артерий она увеличивалась примерно на 16% (рис. 4а). У крыс, перенесших ишемию, на 2-е сутки после И/Р, по сравнению с ЛО животными, аппликация клотримазола вызвала достоверно меньшее число констрикций только в группе крупных сосудов (24.3 ± 4.5 по сравнению с $57.9 \pm 8.4\%$ у ЛО крыс; $p = 0.03$, U-критерий = 16) (рис. 2а). Число АХ-индуцированных дилатаций на фоне введения клотримазола во всех группах артерий снижалось примерно на 55–75% (рис. 3а). Амплитуда дилатации снижалась на 30–60% (рис. 4а).

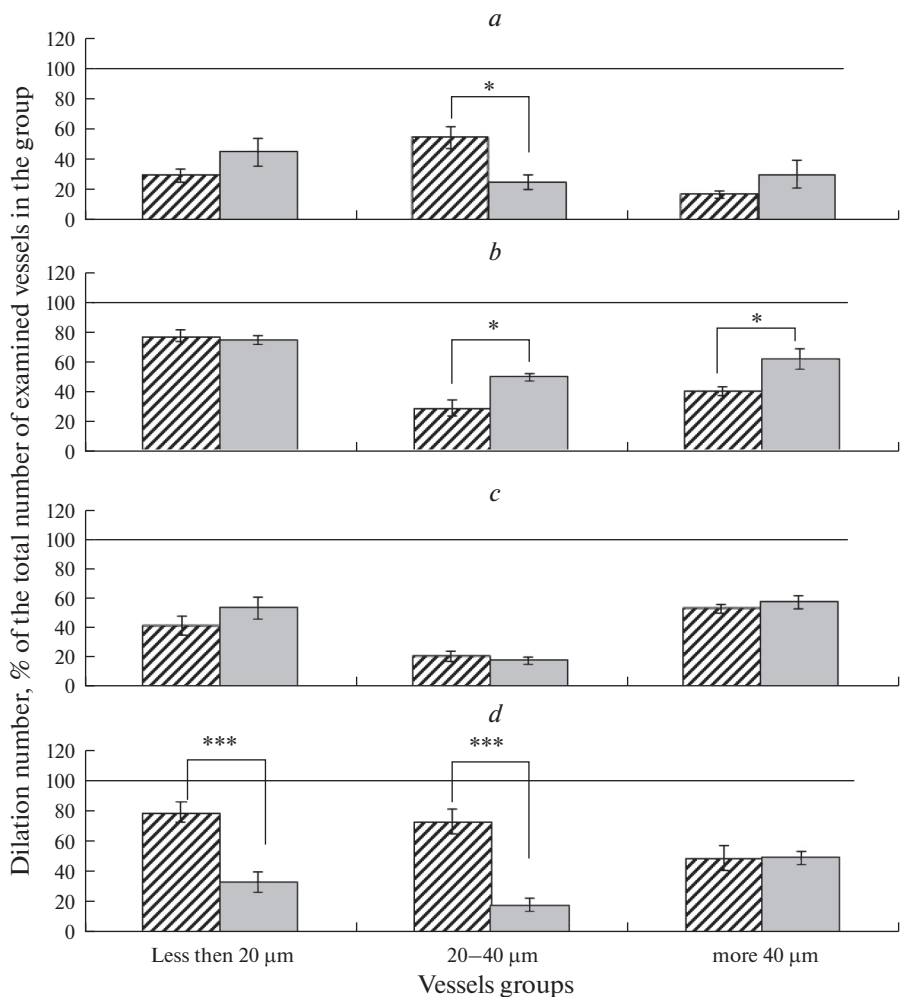


Рис. 3. Число дилатаций пиальных артерий на воздействие АХ на фоне блокады IK_{Ca} -каналов. Косая штриховка – ЛО крысы; серая заливка – крысы после И/Р (*a* – 2 сут; *b* – 7 сут; *c* – 14 сут; *d* – 21 сут). Горизонтальная линия – дилатация артерий в группе на воздействие АХ без применения блокатора, принятая за 100%. Различия статистически значимы: * – $p < 0.05$, *** – $p < 0.001$ (U-критерий Манна–Уитни).

Аппликация клофимазола у ЛО крыс на 7-е сутки после операции приводила к констрикции примерно 30% мелких и средних и 50% крупных артерий (рис. 2b). На фоне введения клофимазола число дилатаций мелких артерий на воздействие АХ уменьшалось на 22%, а в группах средних и крупных артерий – в среднем на 70 и 60% соответственно. Амплитуда АХ-индуцированной дилатации снижалась во всех группах артерий (рис. 4b) по сравнению с реакцией на АХ в отсутствие блокады IK_{Ca} -каналов. У подвергнутых ишемии крыс на 7-е сутки после И/Р орошение поверхности головного мозга раствором клофимазола приводило к констрикции примерно 40–47% всех исследованных артерий (рис. 2b). Число дилатаций на воздействие АХ на фоне блокады IK_{Ca} -каналов клофимазолом по сравнению

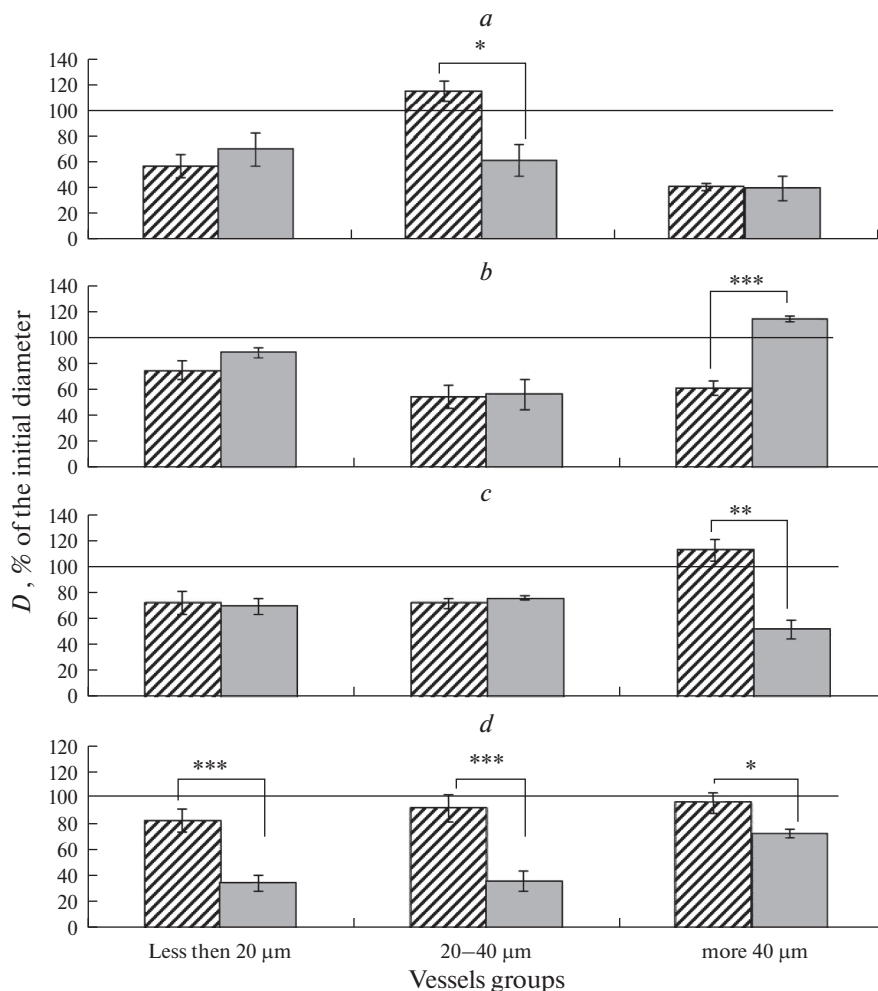


Рис. 4. Амплитуда дилатаций пиальных артерий на воздействие АХ на фоне блокады IK_{Ca} -каналов. Косая штриховка – ЛО крысы; серая заливка – крысы после И/Р (*a* – 2 сут; *b* – 7 сут; *c* – 14 сут; *d* – 21 сут). Горизонтальная линия – дилатация артерий в группе на воздействие АХ без применения блокатора, принятая за 100%. Различия статистически значимы: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ (U-критерий Манна–Уитни).

с реакцией на АХ в отсутствие блокады в группе мелких сосудов снижалось в среднем на 25% (рис. 3б). Число АХ-индуцированных дилатаций средних артерий на фоне блокады было в 2 раза ниже, чем в ее отсутствие, а число дилатаций крупных артерий снизилось на 40% (рис. 3б). Амплитуда АХ-индуцированной дилатации мелких артерий на фоне блокады IK_{Ca} -каналов примерно соответствовала значениям, полученным без применения блокатора, была снижена на 40% у средних артерий и увеличилась на 17% у крупных артерий (рис. 4б). У подвергнутых И/Р и ЛО крыс число и амплитуда АХ-индуцированных дилатаций мелких артерий на фоне предварительного введения клотримазола были выражены в равной степени; в группе средних артерий при одинаковой амплитуде число дилатаций у И/Р крыс бы-

ло выше, чем у ЛО (50.2 ± 2.9 по сравнению с $29.7 \pm 5.6\%$, $p = 0.02$, U-критерий = 12), а в группе крупных артерий у перенесших ишемию крыс и число (62.5 ± 6.7 по сравнению с $41.1 \pm 3.0\%$, $p = 0.03$, U-критерий = 48), и амплитуда (117.1 ± 2.0 по сравнению с 63.1 ± 5.9 , $p < 0.001$, U-критерий = 10) дилатаций были больше, чем у ЛО крыс (рис. 3b, 4b).

Апликация клотримазола у ЛО крыс на 14-е сутки после операции вызывала констрикцию $35.4 \pm 2.2\%$ мелких артерий и около 30% средних и крупных артерий (рис. 2c). На фоне блокады IK_{Ca} -каналов во всех группах артерий снижалось число дилатаций на воздействие АХ (примерно на 58, 80 и 46%, у мелких, средних и крупных артерий соответственно) относительно реакции в отсутствие блокады (рис. 3c). Также снижалась амплитуда дилатации мелких и средних артерий (примерно на 25%), но амплитуда дилатации крупных артерий увеличилась на 16% (рис. 4c). У перенесших ишемию крыс на 14-е сутки после И/Р орошение поверхности головного мозга раствором клотримазола приводило к констрикции от 46 до 55% артерий в разных группах (рис. 2c). Число дилатаций на воздействие АХ на фоне блокады IK_{Ca} -каналов уменьшилось во всех группах артерий (примерно на 46–42% у мелких и крупных артерий и на 82% у средних артерий) относительно реакции в отсутствие блокады (рис. 3c). Амплитуда дилатаций после И/Р также снижалась во всех группах артерий (рис. 4c). У подвергнутых И/Р и ЛО крыс число АХ-индуцированных дилатаций на фоне предварительного введения клотримазола были выражены в равной степени во всех группах артерий; при этом амплитуды дилатаций также снижались и были одинаково выражены у И/Р и ЛО крыс у мелких и средних артерий, а в группе крупных артерий амплитуда дилатации у И/Р крыс была примерно в 2 раза меньше, чем у ЛО (53.8 ± 7.5 по сравнению с $115.6 \pm 8.5\%$, $p = 0.002$, U-критерий = 4) (рис. 4c).

На 21-е сутки после операции апликация клотримазола вызывала у ЛО крыс констрикцию всех исследованных артерий: 60% мелких, 53% средних и 38% крупных (рис. 2d). Число АХ-индуцированных дилатаций на фоне блокады IK_{Ca} -каналов у мелких и средних сосудов снижалось в среднем на 20 и 27% соответственно, а у крупных артерий снизилось в 2 раза (рис. 3d). Амплитуда дилатации у ЛО крыс не изменялась (рис. 4d). У подвергнутых И/Р крыс в ответ на апликацию клотримазола сужалось 57% мелких артерий и около 70% средних и крупных артерий (рис. 2d). Число дилатаций на воздействие АХ на фоне блокады IK_{Ca} -каналов у подвергнутых И/Р крыс снижалось во всех группах артерий относительно реакции в отсутствие блокады: примерно на 66% у мелких артерий, на 80% у средних и на 50% у крупных (рис. 3d). Это снижение было наиболее выраженным (относительно числа дилатаций у ЛО крыс) в группах мелких (33.8 ± 6.9 по сравнению с $80.0 \pm 6.5\%$, $p = 0.0002$, U-критерий = 4) и средних артерий (18.8 ± 4.4 по сравнению с 73.7 ± 8.4 , $p = 0.0002$, U-критерий = 4). Амплитуда дилатаций также снижалась во всех группах артерий (рис. 4d).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ишемия изменяла дилатацию пиальных артериальных сосудов крыс на воздействии АХ. На 2-е сутки после И/Р наблюдалось снижение числа АХ-индуцированных дилатаций относительно аналогичных показателей у ЛО крыс в группе крупных артерий (в среднем на 45%, рис. 1a). На 7–21-е сутки у крыс, подвергнутых И/Р, число дилатаций было снижено во всех группах исследованных артерий (рис. 1b–d). Степень дилатации во всех группах сосудов в течение 21 сут постишемического периода не отличалась от показателей у ЛО крыс. Данные результаты показывают, что однократная глобальная И/Р коры головного мозга ведет к угнетению АХ-индуцированной дилатации пиальных артериальных сосудов крыс, сохраняющемуся в тече-

ние 21 сут после восстановления кровотока. Основной механизм вазодилататорного эффекта АХ связывают с его воздействием на мускариновые рецепторы ЭК, в результате чего повышается ток Ca^{2+} и активируется выработка NO по пути TRPV4 (канал транзиторного рецепторного потенциала валлиноидного типа) \rightarrow eNOS \rightarrow NO [14, 15]. Угнетение вазодилатации после И/Р может быть обусловлено дисфункцией сосудистого эндотелия [16] вследствие снижения синтеза и биодоступности NO. Это, в свою очередь, может усилить вклад других механизмов в осуществление АХ-опосредованной вазодилатации, в частности механизма эндотелиальной гиперполяризации, связанной с активацией IK_{Ca} -каналов [4, 6]. АХ индуцирует эндотелиальную гиперполяризацию и последующую релаксацию сосудов через сигнальный путь TRPV4 + $Ca^{2+} \rightarrow IK_{Ca}$ [17].

Применение блокатора IK_{Ca} -каналов клотримазола в наших экспериментах на 2-е сутки после оперативного вмешательства у ЛО крыс вызывало сужение примерно 60% пиальных артерий во всех группах сосудов. У подвергнутых ишемии крыс на 2-е сутки после И/Р изменение числа констрикций по сравнению с показателями у ЛО крыс было обнаружено только в группе крупных артерий (снизилось примерно вдвое относительно ЛО, рис. 2а). Отсюда следует, что IK_{Ca} -каналы участвуют в поддержании базального тонуса пиальных артерий крыс, а И/Р снижает их вклад в поддержание тонуса только крупных пиальных артерий, что согласуется с данными других исследований [18, 19]. Одним из факторов, вызывающих снижение роли IK_{Ca} -каналов в поддержании тонуса крупных артерий, может быть наличие более выраженного слоя гладкомышечных клеток, что затрудняет перенос гиперполяризации [12]. Также это может быть связано с различиями в экспрессии IK_{Ca} -каналов [6]. На 7-е сутки после И/Р у крыс, перенесших ишемию, по сравнению с ЛО крысами число констрикций на воздействие клотримазола увеличивалось. Эти изменения наблюдались в группах мелких и средних артерий. Через 14 сут увеличение числа констрикций на аппликацию клотримазола, по отношению к аналогичным показателям у ЛО крыс наблюдалось во всех группах исследованных артерий, а на 21-е сутки увеличение отмечалось преимущественно в группах средних и крупных сосудов. Эти результаты свидетельствуют об усилении роли IK_{Ca} -каналов в поддержании тонуса данных сосудов в период с 7-х по 21-е сутки после И/Р и не противоречат данным других исследований [18, 19]. Считается, что IK_{Ca} -каналы выполняют защитную функцию в поддержании базального тонуса после И/Р [18, 20]. Например, блокада этих каналов в паренхиматозных артериях вызывала значительное повышение базального тонуса, который сохранялся после повреждений, вызванных И/Р [20]. В большинстве исследований изменения тонуса артерий после И/Р оценивались однократно, мы же предприняли попытку оценить вклад IK_{Ca} -каналов в поддержание базального тонуса артерий на протяжении 3 недель постшемического периода, что позволило продемонстрировать различный вклад IK_{Ca} -каналов в тонус артерий разного калибра и в разные сроки после И/Р.

Число и амплитуда АХ-индуцированных дилатаций артерий на фоне применения клотримазола по сравнению с реакцией на АХ в отсутствие блокады IK_{Ca} -каналов у ЛО крыс снижались во все отрезки послеоперационного периода. Клотримазол блокирует Ca^{2+} -чувствительные K^+ -каналы промежуточной проводимости по пути воздействия на систему цитохрома P450 \rightarrow 5,6-эпоксиэйкозатриеновая кислота \rightarrow TRPV4 $\rightarrow IK_{Ca}$ [21–24], увеличивая выход K^+ из клетки и тем самым снижая гиперполяризацию мембраны, что в итоге приводит к ослаблению вазодилатации. Наши результаты указывают на то, что вклад IK_{Ca} -каналов в АХ-индуцированную дилатацию пиальных артерий ЛО крыс весьма значителен.

В наших экспериментах у крыс, перенесших ишемию, число АХ-опосредованных дилататорных реакций пиальных артерий на фоне предварительной блокады IK_{Ca} -каналов снижалось относительно показателей в отсутствие блокады. Однако по сравнению с показателями у ЛО крыс достоверные отличия наблюдались только на 2-, 7- и 21-е сутки постишемического периода. На 2-е сутки после И/Р уменьшались число и амплитуда дилатаций в группе средних артерий относительно ЛО. Через 7 сут после И/Р уменьшение числа АХ-дилатаций на фоне применения блокатора IK_{Ca} -каналов у крыс, перенесших ишемию, по сравнению с ЛО крысами было выражено в меньшей степени, что указывает на снижение роли EDHF-опосредованной дилатации в этот отрезок постишемического периода. Механизм, реализуемый АХ для активации IK_{Ca} каналов, осуществляется через активацию TRPV4, вызванную притоком Ca^{2+} . TRPV4 опосредуют АХ-индуцированную дилатацию в мозговых артериях, но их функция нарушается при И/Р. Увеличение уровня внутриклеточного Ca^{2+} после И/Р может быть причиной активации TRPV4 каналов, и связанной с этим гиперактивации IK_{Ca} -каналов [25, 26]. Гиперактивация IK_{Ca} -каналов, в свою очередь, может уменьшать сопротивление клеточной мембраны и снижать возможности эндотелия при проведении электрического сигнала [11], тем самым уменьшая вклад IK_{Ca} -каналов в АХ-индуцированную дилатацию артерий. Кроме того, известно, что TRPV4 помимо вазодилатации могут также регулировать вазоконстрикцию по механизму отрицательной обратной связи [17, 27]. Это, в свою очередь, также может служить причиной угнетения АХ-опосредованной вазодилатации у крыс, перенесших ишемию. К 14-м суткам постишемического периода на фоне блокады IK_{Ca} -каналов число АХ-индуцированных дилатаций у крыс, перенесших ишемию, снижалось значительно, но достоверных отличий между этими группами у ЛО животных и крыс после И/Р не отмечено. Однако к 21-м суткам постишемического периода вклад IK_{Ca} -каналов в АХ-индуцированную дилатацию мелких и средних артерий значительно усиливался по сравнению с аналогичным вкладом у ЛО крыс, тогда как у более крупных сосудов он не менялся, это согласуется с утверждением [4], что сосудорасширяющие эффекты EDHF наиболее важны в сосудах малого калибра. Полученные нами результаты позволяют утверждать, что в разные сроки постишемического периода изменение активности IK_{Ca} -каналов в АХ-опосредованной дилатации артерий разного калибра выражены в различной степени.

Таким образом, мы установили, что однократная глобальная И/Р коры головного мозга ведет к изменению вклада IK_{Ca} -каналов в поддержание базального тонуса пиальных артерий крыс, сохраняющемуся в течение 21 сут после восстановления кровотока. Через 2 сут снижается вклад IK_{Ca} -каналов в тонус крупных пиальных артерий. А в последующий постишемический период наблюдается последовательное усиление вклада этих каналов в поддержание тонуса сосудов всех исследованных диаметров. Вклад IK_{Ca} -каналов в АХ-опосредованную дилатацию пиальных артерий у перенесших ишемию крыс в разные сроки постишемического периода также меняется и в большой степени зависит от диаметра артериальных сосудов. Через 2 сут после И/Р наблюдается увеличение вклада IK_{Ca} -каналов в дилатацию на АХ артерий средних диаметров. К 7-м суткам число IK_{Ca} -опосредованных дилатаций снижается, и эти изменения наблюдаются в группах средних и крупных артерий. В последующие 14 сут роль IK_{Ca} -каналов в АХ-индуцированной дилатации крупных пиальных артерий восстанавливается до уровня показателей у ЛО крыс, а в группах мелких и средних артерий усиливается.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликта интересов относительно публикации этой статьи не существует.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (О.П.Г.), сбор данных (В.Н.Ш.), обработка данных (В.Н.Ш.), написание и редактирование статьи (В.Н.Ш., О.П.Г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Мухаджиева АШ, Евзельман МА* (2018) Хроническая ишемия головного мозга. Молодой ученый 27 (213): 54–58. [*Muskhadzhieva ASH, Evzelman MA* (2018) Chronic cerebral ischemia. Young scientist 27 (213): 54–58. (In Russ)]. <https://moluch.ru/archive/213/51990/>
2. *Winship IR* (2015) Cerebral collaterals and collateral therapeutics for acute ischemic stroke. Microcirculation 22(3): 228–236. <https://doi.org/10.1111/micc.12177>
3. *Van der Worp HB, Van Gijn J* (2007) Acute ischemic stroke. New Engl J Med 357(6): 572–579.
4. *Davis CM, Siler DA, Alkayed NJ* (2011) Endothelium-derived hyperpolarizing factor in the brain: influence of sex, vessel size and disease state. Womens Health (Lond) 7(3): 293–303. <https://doi.org/10.2217/whe.11.26>
5. *Ma J, Ma Y, Shuaib A, Winship IR* (2020) Impaired collateral flow in pial arterioles of aged rats during ischemic stroke. Transl Stroke Res 11(2): 243–253. <https://doi.org/10.1007/s12975-019-00710-1>
6. *Yang Q, He GW, Underwood MJ, Yu CM* (2016) Cellular and molecular mechanisms of endothelial ischemia/reperfusion injury: perspectives and implications for postischemic myocardial protection. Am J Transl Res 8(2): 765–777.
7. *Goto K, Ohtsubo T, Kitazono T* (2018) Endothelium-dependent hyperpolarization (EDH) in hypertension: The role of endothelial ion channels. Int J Mol Sci 19(1): 315. <https://doi.org/10.3390/ijms19010315>
8. *Tano JY, Gollasch M* (2014) Calcium-activated potassium channels in ischemia reperfusion: a brief update. Front Physiol 5: 381. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00381>
9. *Garland CJ, Bagher P, Powell C, Ye X, Lemmey HAL, Borysova L, Dora KA* (2017) Voltage-dependent Ca^{2+} entry into smooth muscle during contraction promotes endothelium-mediated feedback vasodilation in arterioles. Sci Signal 10: eal13806. <https://doi.org/doi:10.1126/scisignal.aal3806>
10. *Lensman M, Korzhovskii D, Mourouvs VO, Kostkin V, Izvarina N, Perasso L, Gandolfo C, Otellin V, Polenov S, Balestrino M* (2006) Intracerebroventricular administration of creatine protects against damage by global cerebral ischemia in rat. Brain Res 1114(1): 187–194. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.06.103>
11. *Behringer EJ, Hakim MA* (2019) Functional interaction among K_{Ca} 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>
12. *Cipolla MJ, Smith J, Kohlmeyer MM, Godfrey JA* (2009) SK_{Ca} and IK_{Ca} channels, myogenic tone, and vasodilator responses in middle cerebral arteries and parenchymal arterioles: effect of ischemia and reperfusion. Stroke 40(4): 1451–1457. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.535435>
13. *Shimokawa H, Yasutake H, Fujii K, Owada MK, Nakaike R, Fukumoto Y, Takayanagi T, Nagao T, Egashira K, Fujishima M, Takeshita A* (1996) The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. J Cardiovasc Pharmacol 28(5): 703–711. <https://doi.org/10.1097/00005344-199611000-00014>
14. *Tran QK, Watanabe H* (2006) Calcium signalling in the endothelium. Handb Exp Pharmacol 176 (Pt 1): 145–187. https://doi.org/10.1007/3-540-32967-6_5

15. *Chen M, Li X* (2021) Role of TRPV4 Channel in Vasodilation and Neovascularization. *Microcirculation* 28(6): e12703.
<https://doi.org/10.1111/micc.12703>
16. *Горшкова ОП, Шуваева ВН, Ленцман МВ, Артемьева АИ* (2016) Постишемические изменения вазомоторной функции эндотелия. *Совр пробл науки и образов* 5. [*Gorshkova OP, Shuvaeva VN, Lentsman MV, Artemyeva AI* (2016) Postischemic changes in the vasomotor function of the endothelium. *Modern Problems Sci Educat* 5. (In Russ)].
17. *Xin Ma, Juan Du, Peng Zhang, Jianxin Deng, Jie Liu, Francis Fu-Yuen Lam, Ronald A Li, Yu Huang, Jian Jin, Xiaoqiang Yao* (2013) Functional role of TRPV4-KCa2.3 signaling in vascular endothelial cells in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Hypertension* 62(1): 134–139.
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01500>
18. *Palomares SM, Cipolla MJ* (2011) Vascular protection following cerebral ischemia and reperfusion. *J Neurol Neurophysiol* 2011: S1–S004.
<https://doi.org/10.4172/2155-9562.s1-004>
19. *Cipolla MJ, Bullinger LV* (2008) Reactivity of brain parenchymal arterioles after ischemia and reperfusion. *Microcirculation* 15(6): 495–501.
<https://doi.org/10.1080/10739680801986742>
20. *Cipolla MJ, Smith J, Kohlmeyer MM, Godfrey JA* (2009) SK_{Ca} and IK_{Ca} Channels, myogenic tone, and vasodilator responses in middle cerebral arteries and parenchymal arterioles: effect of ischemia and reperfusion. *Stroke* 40: 1451–1457.
<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.535435>
21. *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>
22. *Lopez-Canales JS, Lozano-Cuenca J, Munoz-Islas E, Aguilar-Carrasco JC, Lopez-Canales OA, Lopez-Mayorga RM, Castillo-Henkel EF, Valencia-Hernandez I, Castillo-Henkel C* (2015) Mechanisms involved in the vasorelaxant effects produced by the acute application of amfepramone in vitro to rat aortic rings. *Braz J Med Biol Res* 48(6): 537–544.
<https://doi.org/10.1590/1414-431X20144261>
23. *Кузнецова ЭЭ, Горохова ВГ, Горохов АГ, Сергеева АС, Курильская ТЕ, Пивоваров ЮИ, Руневич АА* (2007) Микросомальное окисление в физиологических и патологических процессах. *Бюл ВСНЦ СО РАМН* 4(56): 170–180. [*Kuznetsova EE, Gorokhova VG, Gorokhov AG, Sergeeva AS, Kurilskaya TE, Pivovarov YuI, Runovich AA* (2007) Microsomal oxidation in physiological and pathological processes. *Bull East-Siber Scient Center Russ Acad Med Sci* 4(56): 170–180. (In Russ)].
24. *Meves H* (2008) Arachidonic acid and ion channels: an update. *Br J Pharmacol* 155(1): 4–16.
<https://doi.org/10.1038/bjp.2008.216>
25. *Butenko O, Dzamba D, Benesova J, Honsa P, Benfenati V, Rusnakova V, Ferroni S, Anderova M* (2012) The increased activity of TRPV4 channel in the astrocytes of the adult rat hippocampus after cerebral hypoxia/ischemia. *PLoS One* 7(6): e39959.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039959>
26. *Audero MM, Prevarskaya N, Fiorio Pla A* (2022) Ca²⁺ Signalling and Hypoxia/Acidic Tumour Microenvironment Interplay in Tumour Progression. *Int J Mol Sci* 23(13): 7377.
<https://doi.org/10.3390/ijms23137377>
27. *Kwangseok Hong, Eric L Cope, Leon J DeLalio, Corina Marziano, Brant E Isakson, Swapnil K Sonkusare* (2018) TRPV4 (Transient Receptor Potential Vanilloid 4) Channel-Dependent Negative Feedback Mechanism Regulates Gq Protein–Coupled Receptor–Induced Vasoconstriction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 38: 542–554.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.310038>

Contribution of IK_{Ca}-Channels to Dilatation of Pial Arteries in Young Rats after Ischemia/Reperfusion

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*

The study of the relationship between the primary ischemic lesion and subsequent changes in the cerebral vasculature remains relevant. Impaired cerebral blood flow after ischemia/reperfusion (I/R) may be due to endothelial dysfunction, which is characterized by an imbalance of vasoactive factors, which leads to a change in vascular tone. Changes in the functional activity of calcium-sensitive intermediate conduction potassi-

um channels (IK_{Ca}) can affect the vascular endothelium, but data on the vasoactive role of IK_{Ca} in cerebral vessels after I/R are scarce. The aim of this work was to study the contribution of IK_{Ca} channels to the regulation of pial artery tone after ischemia/reperfusion in young rats. Changes in the contribution of IK_{Ca} to the vascular tone and acetylcholine (ACh)-induced the pial arteries dilatation of Wistar rats aged 4 months after a single I/R (clamping of both carotid arteries with a simultaneous decrease and strict maintenance of mean blood pressure at 45 ± 2 mm Hg for 12 minutes) at different times of the postischemic period were studied. Vessels were examined on days 2, 7, 14, and 21 after I/R. The method of intravital microphotography was used to evaluate the reactions of arteries in rats that underwent ischemia and sham-operated rats. The change in the contribution of IK_{Ca} to the pial artery tone was assessed by the change in the number of arteries that narrowed in response to the action of an IK_{Ca} blocker (clotrimazole, 10^{-7} M, 5 min). It was found that a single global I/R of the cerebral cortex leads to a change in the contribution of IK_{Ca} to the basal tone of the pial arteries of rats, which persists for 21 days after the restoration of blood flow. After 2 days, the contribution of IK_{Ca} to the tone of large pial arteries decreases. And in the subsequent post-ischemic period, there is a consistent increase in the contribution of these channels to the tone of all diameters vessels studied. The contribution of IK_{Ca} to ACh-mediated dilatation of pial arteries in ischemic rats also varies at different times of the post-ischemic period and largely depends on the diameter of arterial vessels. 2 days after I/R, the contribution of IK_{Ca} to dilatation on ACh of medium-sized arteries increases. On day 7, the number of IK_{Ca} -mediated dilatations decreases, and these changes are observed in groups of medium and large arteries. In the next 14 days, the role of IK_{Ca} in ACh-induced dilatation of large pial arteries is restored to the level of indicators in SO rats, and intensifies in groups of small and medium arteries. Thus, different activity of IK_{Ca} in ACh-mediated vasodilation was demonstrated not only in arteries of different calibers, but also at different times of the post-ischemic period.

Keywords: cerebral ischemia, dilatation of pial arteries, calcium-sensitive intermediate conduction potassium channels

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ВЗАИМОСВЯЗЬ МИКРОБИОМА КРОВИ И СОДЕРЖАНИЯ
НЕЙРОТРОФИНОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ
ТИПАХ ОЖИРЕНИЯ

© 2022 г. И. М. Колесникова^{1, *}, А. М. Гапонов^{2, 3}, С. А. Румянцев^{1, 2},
М. С. Карбышев¹, Т. В. Григорьева⁴, В. В. Макаров⁵, С. М. Юдин⁵,
О. В. Борисенко¹, А. В. Шестопапов^{1, 2, 6}

¹Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова,
Москва, Россия

²Центр цифровой и трансляционной биомедицины “Центр Молекулярного Здоровья”,
Москва, Россия

³НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского, Москва, Россия

⁴Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

⁵Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью,
Москва, Россия

⁶Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии,
онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва, Россия

*E-mail: ir.max.kolesnikova@gmail.com

Поступила в редакцию 07.07.2022 г.

После доработки 11.09.2022 г.

Принята к публикации 11.10.2022 г.

Микробная ДНК крови – один из патоген-ассоциированных молекулярных паттернов, сигнальные пути которого способны изменять экспрессию нейротрофинов, таких как нейротрофический фактор мозга (BDNF) и фактор роста нервов (NGF). Изучение нейротрофинов интересно при ожирении, так как оно сопряжено с риском развития нейропатий. При этом риск развития осложнений зависит от метаболического типа ожирения: при метаболически нездоровом типе (МНЗО) этот риск существенно выше, чем при метаболически здоровом (МЗО). Целью работы стало изучение взаимосвязи между отдельными таксонами микробиома крови и сывороточными концентрациями BDNF и NGF при различных метаболических типах ожирения. У здоровых доноров содержание таксонов-обитателей почв и вод было негативно взаимосвязано с содержанием BDNF, тогда как при ожирении, особенно МНЗО, эта связь носила положительный характер. У пациентов с ожирением с уровнем BDNF негативно ассоциировались таксоны-представители флоры желудка (*Helicobacter pylori*) и кишечника (*Sutterella* spp.). Содержание NGF у здоровых лиц было позитивно ассоциировано с *Akkermansia muciniphila* – таксоном, участвующим в поддержании целостности кишечной стенки и снижающим кишечную проницаемость. У пациентов с МНЗО положительная связь была отмечена между уровнем NGF и *Ruminococcus bromii*. Для здоровых доноров и пациентов с МНЗО, но не с МЗО, были также выявлены многочисленные негативные взаимосвязи между таксонами-представителями кишечной флоры и концентрацией NGF. В целом, влияние микробной ДНК крови на сывороточную концентрацию нейротрофинов зависит от источников транслокации, проницаемости внешних барьеров, особенностей микробиомов (кишечника, кожи и т.д.), а также наличия или отсутствия метаболических нарушений у пациентов с разной массой тела.

Ключевые слова: нейротрофины, ожирение, метаболически здоровое ожирение, метаболически нездоровое ожирение, микробиом крови, бактериальная ДНК крови, фактор роста нервов, нейротрофический фактор мозга, нейротропный фактор мозга, BDNF, NGF

DOI: 10.31857/S0869813922110048

Распространенность ожирения в последние годы начала приобретать катастрофические масштабы. По оценкам исследования NCD-RisC к 2025 г. практически четверть населения планеты может иметь индекс массы тела (ИМТ) свыше 30 кг/м² [1]. В связи с этим, изучение патогенеза осложнений ожирения становится особенно актуальным. Однако риск развития осложнений не одинаков у разных пациентов и определяется метаболическим типом ожирения – метаболически нездоровое ожирение (МНЗО) ассоциировано с высоким риском развития осложнений, тогда как у пациентов с метаболически здоровым типом (МЗО) этот риск существенно ниже [2]. Поражение центральной и периферической нервных систем (ЦНС и ПНС соответственно) при ожирении снижает качество жизни пациентов и является одной из причин их инвалидизации [3]. В связи с этим представляется интересным исследование нейротрофинов – белков, участвующих в дифференцировке, функционировании и выживании нейронов, при разных типах ожирения. Основными нейротрофинами являются фактор роста нервов (Nerve Growth Factor, NGF) и нейротрофический фактор мозга (Brain-Derived Neurotrophic Factor, BDNF). NGF и BDNF играют значительную роль и в энергетическом гомеостазе, что также актуально у пациентов с ожирением. В гипоталамусе действие BDNF связано с формированием чувства насыщения, в том числе и в рамках реализации анорексигенного эффекта лептина [4]. Действие NGF способствует пластичности симпатических нейронов в жировой ткани при охлаждении, что приводит к “бежевой” трансдифференцировке белых адипоцитов и рассеиванию энергии в виде тепла [5]. Кроме того, и указанные нейротрофины и их рецепторы экспрессируются как белой, так и бурой жировой тканью [6].

В последние десятилетия уделяется пристальное внимание роли кишечной микробиоты в развитии ожирения, метаболического синдрома и сахарного диабета II типа [7]. Многочисленные двусторонние взаимодействия между кишечной микробиотой и нервной системой получили название оси “микробиота–кишечник–мозг”. Наиболее изученными медиаторами в этой системе являются короткоцепочечные жирные кислоты, серотонин и другие метаболиты триптофана, а также патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), такие как липополисахариды [8, 9]

Ожирение также ассоциировано с увеличением кишечной проницаемости, что приводит к увеличению альфа-разнообразия и изменению таксономического состава микробиома крови [10, 11]. Микробная ДНК представляет собой один из PAMPs, способных стимулировать иммунный ответ через ряд внутриклеточных сенсоров. Основным рецептором распознавания образов (pattern-recognition receptors, PRRs) микробной ДНК является толл-подобный рецептор 9-го типа (toll-like receptor 9, TLR9), локализованный на эндосомах и лизосомах [12]. Стимуляция TLR9 приводит к активации ядерного фактора каппа-В (nuclear factor κB, NF-κB), что усиливает продукцию фактора некроза опухоли альфа (tumor necrosis factor alpha, TNFα) и других провоспалительных цитокинов [12]. Помимо клеток иммунной системы, TLR9 присутствует и в адипоцитах, в которых его стимуляция приводит к парадоксальному противовоспалительному эффекту [13]. Также TLR9 экспрессируется в нервной ткани микроглией, астроцитами и даже нейронами, что демон-

стрирует вовлеченность этих рецепторов в формирование нейровоспаления, которое является распространенным осложнением ожирения [14, 15].

Внутриклеточное распознавание ДНК не ограничено TLR9 и включает ряд цитозольных сенсоров, таких как путь циклической ГМФ–АМФ синтазы (cyclic GMP–AMP synthase, cGAS) и белок, отсутствующий при меланоме 2 (absent in melanoma 2, AIM2) [16]. Путь cGAS связан с активацией NF-κB и усилением синтеза провоспалительных цитокинов, в частности интерлейкина 6 (interleukin 6, IL6) и TNFα [17]. Однако путь cGAS не является только прерогативой иммунных клеток и может вносить свой вклад в патогенез ожирения. Было показано, что ожирение приводит к высвобождению митохондриальной ДНК в цитозоль, что активирует сигнальный каскад cGAS и способствует формированию хронического воспаления в жировой ткани [18]. Также активация этого пути приводит к подавлению термогенеза и уменьшению рассеивания энергии при ожирении [19]. Взаимодействие AIM2 с двухцепочечной ДНК приводит к сборке инфламмосомы, активирует каспазу-1 и запускает процессинг интерлейкина 1β (interleukin 1β, IL1β) и интерлейкина 18 (interleukin 18, IL18) [20]. В контексте ожирения роль AIM2 неоднозначна. Было показано, что IL1β вносит вклад в формирование системного воспаления и инсулинорезистентности при ожирении [21]. С другой стороны, IL18, который также продуцируется инфламмосомой AIM2, стимулирует липолиз и защищает от метаболической дисфункции, что было показано на модели мышей с ожирением [22].

Активация сигнальных путей и синтез провоспалительных цитокинов в ответ на PAMPs способствует не только формированию иммунного ответа, но может регулировать экспрессию нейротрофинов. Было показано, что активация NF-κB способствует усилению выработки NGF β-клетками и микроглией [23, 24]. Кроме того, провоспалительные цитокины IL1β, TNFα и IL6 способны стимулировать синтез NGF в различных типах клеток [25]. Экспрессия BDNF в ЦНС также регулируется IL1β [26]. Наличие этих сигнальных путей позволяет рассматривать микробную ДНК крови как один из медиаторов оси “микробиота–кишечник–мозг”, а нейротрофины – в качестве индукторов. Поэтому целью нашей работы стало изучение взаимосвязи между отдельными таксонами бактериальной ДНК крови и сывороточной концентрацией нейротрофинов BDNF и NGF у пациентов с разными метаболическими типами ожирения.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Проведение научно-исследовательской работы одобрено ЛЭК ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (протокол №186 от 26.06.2019) и ЛНЭК ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России (протокол № 20/19 от 12.12.2019). От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Проведено когортное одномоментное исследование на базе Центра цифровой и трансляционной биомедицины ООО “Центр молекулярного здоровья”, кафедры внутренних болезней № 3, ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России и ФГАОУ ВО “Казанский (Приволжский) федеральный университет” в период 2018–2020 гг. Группу 1 сформировали 114 здоровых доноров с ИМТ от 18.5 до 24.9 кг/м², при отсутствии метаболических нарушений (дислипидемия, гипергликемия, гиперурикемия) и без признаков артериальной гипертензии. В Группу 2 вошли 98 пациентов с ожирением (ИМТ ≥ 30 кг/м²), окружность талии которых превышала 102 см у мужчин или 88 см у женщин. Пациенты Группы 2 были разделены на подгруппы в за-

висимости от метаболического типа ожирения в соответствии с критериями NCEP-АТР III [27]. Ожирение считалось метаболически нездоровым, если для пациента были характерны три и более критериев: 1) объем талии ($\delta > 102$ см; $\text{♀} > 88$ см); 2) триглицериды сыворотки (≥ 1.7 ммоль/л); 3) холестерол ЛПВП ($\delta < 1.03$ ммоль/л; $\text{♀} < 1.29$ ммоль/л); 4) артериальное давление (sys ≥ 130 мм рт. ст.; dia ≥ 85 мм рт. ст.); 5) глюкоза натощак (≥ 5.6 ммоль/л). В подгруппу пациентов с МЗО вошли 36 человек, тогда как подгруппу с МНЗО составили 53 пациента. Для 9 пациентов не было получено убедительных данных для включения их в одну из подгрупп, поэтому результаты их исследований не были включены в анализ влияния микробиома крови на сывороточную концентрацию нейротрофинов при различных метаболических типах ожирения.

У всех пациентов проводился отбор крови, в образцах сыворотки которой проводилось определение концентрации нейротрофинов BDNF и NGF методом мультиплексного иммуноферментного анализа на анализаторе Magpix (BioRad, США) с использованием наборов Milliplex: Human Adipokine Magnetic Bead Panel 2 и Human Myokine Magnetic Bead Panel (Merck, Германия). Также из образцов крови проводилось выделение бактериальной ДНК в соответствии с протоколом производителя QIAamp BiOstic Bacterimia DNA Kit (Qiagen, Германия). Секвенирование переменного участка v3–v4 гена 16S рРНК проводили на платформе “Illumina MiSeq” на базе Междисциплинарного центра коллективного пользования Казанского федерального университета. Полученные последовательности генов были проанализированы с помощью программы “QIIME v.1.9.1” с использованием референсной базы данных “Greengenes v.13.8” с 97%-ным порогом сходства между последовательностями. Данные представленности бактериальных таксонов в общем пуле ридов были получены в долях (от 0 до 1), которые были рассчитаны на основе количества картированных ридов для каждого таксона. Также для характеристики альфа-разнообразия микробиома крови были рассчитаны стандартные индексы: индекс Simpson, индекс Chao1, индекс Shannon, индекс филогенетического разнообразия (Phylogenetic diversity, PD), а также общее количество наблюдаемых операционных таксономических единиц (OTUs).

Статистический анализ проводился с помощью программного обеспечения MedCalc (MedCalc Software Ltd, Бельгия). Все полученные массивы данных были проверены на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро–Уилка. Содержание нейротрофинов в Группе 1 и 2 носило нормальный характер, однако в подгруппах, ввиду меньшей выборки, распределение данных содержания нейротрофинов и показателей альфа-разнообразия не всегда носило нормальный характер, поэтому полученные данные были представлены в виде медианы и 25–75 перцентилей, а сравнение групп/подгрупп между собой проводили с использованием критерия Манна–Уитни. Для установления наличия или отсутствия влияния разнообразия микробиома крови на содержание нейротрофинов пациенты Группы 1 и Группы 2, а также пациенты с МЗО и МНЗО были разделены на три подгруппы: с высокими, средними и низкими показателями α -разнообразия. Разделение по каждому из показателей альфа-разнообразия на подгруппы проводилось по квантилям. Для выявления различий между содержанием нейротрофинов в сформированных подгруппах использовался однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) при условии нормального распределения и равенства дисперсий в подгруппах. В случае отсутствия нормального распределения или при неравенстве дисперсий в сформированных подгруппах для выявления различий использовался непараметрический критерий Краскела–Уоллиса. Для многих таксонов не было характерно нормальное распределение, поэтому для установления взаимосвязи между содержанием отдельных таксонов кишечного микробиома и концентрацией нейротрофинов был проведен корреляционный анализ с расчетом коэффициента

Таблица 1. Содержание нейротрофинов в сыворотке и характеристики α -разнообразия микробиома крови у исследуемых групп пациентов

	Группа 1	Группа 2	МЗО	МНЗО
BDNF, нг/мл	7346.8 [5635.0–9589.9]	8063.2 [5525.63–10272.13]	7821.1 [6301.3–9592.3]	8388.2 [5461.7–10489.0]
NGF, нг/мл	0.57 [0.34–1.38]	0.50* [0.34–0.92]	0.47* [0.33–0.66]	0.52*† [0.34–0.93]
Индекс Simpson	0.975 [0.953–0.983]	0.977 [0.965–0.984]	0.972 [0.957–0.980]	0.980*† [0.970–0.984]
Индекс Shannon	5.99 [5.26–6.72]	6.22 [5.53–6.66]	6.08 [5.53–6.56]	6.31* [5.81–6.83]
Индекс Chao1	168.46 [114.50–280.50]	210.47* [134.00–280.09]	205.03 [129.57–265.22]	220.80* [141.46–343.35]
OTUs	125.50 [79.00–206.00]	148.00 [99.00–209.00]	140.00 [92.00–201.50]	149.00* [109.25–233.00]
PD	12.12 [8.45–17.44]	14.32* [10.69–18.57]	13.43 [9.78–16.92]	14.95* [11.61–19.63]

Данные представлены в виде медианы [25 – 75 перцентили]; * – различия достоверны по сравнению с Группой 1 ($p \leq 0.05$); † – различия достоверны по сравнению с МЗО ($p \leq 0.05$).

ранговой корреляции Спирмена. Коэффициенты корреляции (ρ) принимались во внимания, если они по модулю были более 0.3 (умеренная сила связи в соответствии со шкалой Чеддока) при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее мы показали, что для пациентов с ожирением, вне зависимости от его метаболического типа, характерна сниженная концентрация NGF по сравнению со здоровыми донорами, на фоне неизменного содержания BDNF (табл. 1) [28]. При этом МНЗО ассоциировано с увеличением альфа-разнообразия микробиома крови, тогда как пациенты с МЗО не демонстрируют отличий от здоровых доноров [11].

Разделение исследуемых групп пациентов в зависимости от величин индексов альфа-разнообразия показало, что подгруппы были сравнимы между собой по сывороточным концентрациям нейротрофинов BDNF и NGF. Единственным близким к статистически значимому различию было сниженное содержание BDNF у пациентов с МНЗО с высокими значениями индекса Simpson (рис. 1). Учитывая, что МНЗО ассоциировано с высокими показателями индексов альфа-разнообразия, можно предполагать, что высокие показатели этого индекса могут быть связаны со снижением сывороточной концентрации BDNF. Подобное предположение подтверждает слабая отрицательная корреляция между содержанием BDNF и индексом Shannon ($\rho = -0.267$, $p = 0.05$). Следует отметить, что пациенты с МНЗО были единственной подгруппой, для которой были характерны корреляции между уровнем BDNF и характеристиками альфа-разнообразия микробиома крови.

Корреляционный анализ показал множественные взаимосвязи между отдельными таксонами микробиома крови и сывороточным содержанием нейротрофинов. Следует отметить, что среди таксонов, ДНК которых было выделено из крови подавляющего большинства пациентов каждой из групп, не было отмечено корреляции с уровнем BDNF и NGF. Таксоны, взаимосвязанные с содержанием нейротрофинов, в основном выделялись не более чем у трети пациентов каждой из исследуемых групп. Подобное наблюдение дает основание предполагать, что ста-

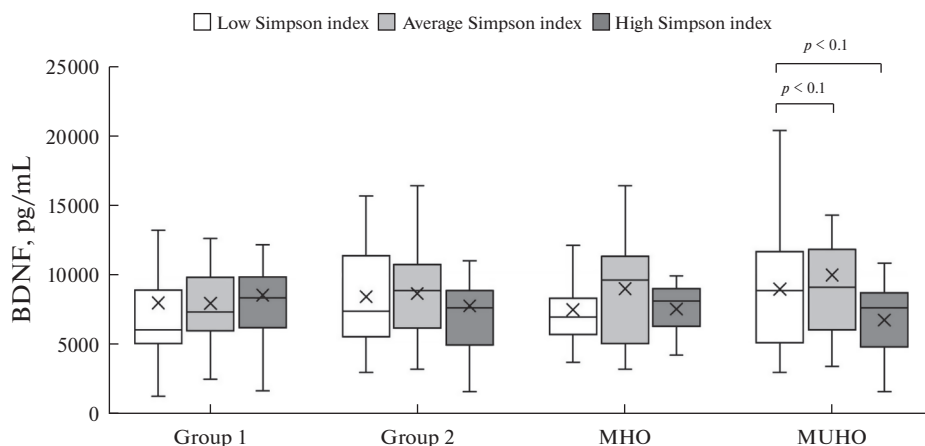


Рис. 1. Содержание BDNF в сыворотке крови у исследуемых групп в зависимости от величины индекса Simpson.

бильное, “конститутивное” ядро микробиома крови напрямую не влияет на синтез и секрецию нейротрофинов в кровь. Однако среди менее часто выделяемых видов, родов и семейств присутствовал спектр таксонов как положительно, так и отрицательно коррелировавших с уровнем BDNF (табл. 2 и 3) и NGF (табл. 4 и 5).

Интересно, что среди таксонов, положительно взаимосвязанных с уровнем BDNF у лиц Группы 1, присутствовали обитатели разных микробных сообществ человеческого организма – кишечника, вагинальной флоры, микробиома ротовой полости и кожи. При этом таксоны, отрицательно коррелировавшие с содержанием этого нейротрофина у здоровых доноров, преимущественно принадлежали к представителям микробиомов почвы и воды. Подобная среда обитания может быть основанием для предположения, что микробная ДНК этих таксонов могла быть транслоцирована в кровь с поверхности кожи и/или слизистых дыхательных путей. Возможно, у здоровых лиц, не страдающих ожирением, микробная транслокация по этим путям негативно взаимосвязана с сывороточной концентрацией BDNF.

Напротив, у пациентов Группы 2 некоторые таксоны-обитатели почв продемонстрировали положительную корреляцию с уровнем этого нейротрофина. Если ДНК данных таксонов транслоцируется в кровь с поверхности кожи, подобное наблюдение может быть объяснимо взаимосвязью ожирения и дерматологических патологий [29]. Ожирение повышает риск развития атопического дерматита, который, в свою очередь, ассоциирован с усиленной продукцией BDNF эозинофилами [30, 31]. Кроме того, ожирение является одним из факторов риска развития бронхиальной астмы, при которой также наблюдается повышение плазменной концентрации BDNF [32, 33]. Появление положительной взаимосвязи у пациентов с ожирением между BDNF и таксонами-обитателями почв, является объяснимой, учитывая, что микробиомы кожи, легких и желудочно-кишечного тракта вовлечены в развитие аллергических заболеваний, включая атопический дерматит и бронхиальную астму [34]. Если предположить, что ДНК таксонов, обитающих в почве, попадает в кровь с поверхности кожи, остается непонятным, почему подобная транслокация у здоровых доноров отрицательно взаимосвязана с содержанием BDNF, а у пациентов с ожирением – положительно. Возможно, эта взаимосвязь находится под влиянием специфических факторов, характерных для пациентов с ожирением, таких как гипергликемия, гиперинсулинемия или гиперлептинемия. Например,

Таблица 2. Таксоны, доля которых в микробиоме крови положительно коррелировала с сывороточной концентрацией BDNF

Группа	Таксон	Среда обитания	
Группа 1	<i>Micrococcus</i> spp. rho = 0.692, $p < 0.01$, $n = 13$	Кожа, почва, вода	
	<i>Lactobacillus iners</i> rho = 0.551, $p < 0.005$, $n = 26$	Вагинальная флора	
	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> rho = 0.463, $p = 0.05$, $n = 18$	Ротовая полость, дыхательные пути	
	<i>Clostridium</i> spp. rho = 0.334, $p < 0.06$, $n = 33$	Кишечник, почва, вода	
	Gemellaceae rho = 0.622, $p < 0.05$, $n = 12$	Ротовая полость	
Группа 2	<i>Rickettsiales f. mitochondria</i> rho = 0.709, $p < 0.005$, $n = 16$	Внутриклеточные паразиты	
	Rhizobiales ¹ rho = 0.537, $p < 0.05$, $n = 17$	Почва	
	Coriobacteriaceae ² rho = 0.636, $p < 0.005$, $n = 20$	Ротовая полость, кишечник, половые пути	
	<i>Providencia</i> spp. rho = 0.503, $p < 0.05$, $n = 18$	Вода, кишечник	
	<i>Nocardioideaceae</i> rho = 0.327, $p < 0.05$, $n = 42$	Почва, вода, кожа	
	<i>Rhodococcus</i> spp. rho = 0.436, $p < 0.005$, $n = 48$	Почва	
	<i>Paracoccus</i> spp. ³ rho = 0.455, $p < 0.005$, $n = 40$	Почва	
	<i>Lachnospira</i> spp. rho = 0.369, $p < 0.05$, $n = 36$	Толстый кишечник	
	Chitinophagaceae ⁴ rho = 0.369, $p < 0.05$, $n = 36$	Почва, вода, кишечник	
	МЗО	<i>Micrococcus</i> spp. rho = 0.457, $p < 0.05$, $n = 22$	Кожа, почва, вода
	МНЗО	<i>Rhodococcus</i> spp. rho = 0.499, $p < 0.01$, $n = 26$	Почва
<i>Lachnospira</i> spp. rho = 0.482, $p < 0.05$, $n = 23$		Кишечник	
<i>Providencia</i> spp. rho = 0.794, $p < 0.01$, $n = 10$		Вода, кишечник	
<i>Streptophyta</i> rho = 0.565, $p < 0.01$, $n = 20$		Вода	
<i>Paracoccus</i> spp. ³ rho = 0.509, $p < 0.05$, $n = 23$		Почва	
Rhizobiales ¹ rho = 0.721, $p < 0.05$, $n = 10$		Почва	
<i>Rickettsiales f. mitochondria</i> rho = 0.673, $p < 0.05$, $n = 10$		Внутриклеточные паразиты	
<i>Nocardioideaceae</i> rho = 0.499, $p < 0.01$, $n = 26$		Почва, вода, кожа	

¹ Неидентифицированные таксоны порядка, не принадлежащие к семействам Aurantimonadaceae, Beijerinckiaceae, Bradyrhizobiaceae, Brucellaceae, Нурhomicobiaceae, Methylobacteriaceae, Phyllobacteriaceae, Rhizobiaceae, Xanthobacteraceae; ² неидентифицированные таксоны семейства, не принадлежащие к родам *Adlercreutzia*, *Atopobium*, *Collinsella*, *Eggerthella*, *Slackia*; ³ неидентифицированные виды, не принадлежащие к видам *P. aminovorans*, *P. marcusii*; ⁴ неидентифицированные таксоны, не принадлежащие к семействам Chitinophaga, Flaviumibacter, Flavisolibacter, Niabella, Sediminibacterium.

лептин является одним из факторов, стимулирующих экспрессию BDNF в ЦНС, а также вовлечен в патогенез атопического дерматита и бронхиальной астмы [35–37]. Учитывая, что эти патологии взаимосвязаны с изменением в микробных сообществах организма и гиперпродукцией BDNF, лептин может выступать одним из факторов, регулирующих выявленную связь между BDNF и транслокацией ДНК таксонов-обитателей почв.

Среди таксонов, отрицательно коррелировавших с уровнем BDNF в Группе 2, присутствовал *Helicobacter pylori*, представитель патогенной флоры желудка. Вместе с *H. pylori*, негативно с содержанием BDNF были связаны таксоны, характерные для пищевых продуктов – *Microbacterium* spp. и *Thermus* spp. Можно предполагать, что ожирение сопровождается увеличением проницаемости стенки желудка для бактериальной ДНК на фоне гиперфагии и перерастяжения желудка. Косвенно это подтверждает работа Rohm и соавт., которые отметили, что ожирение ассоциировано с увеличением количества провоспалительных макрофагов в стенке желудка [38].

Таблица 3. Таксоны, доля которых в микробиоме крови отрицательно коррелировала с сывороточной концентрацией BDNF

Группа	Таксон	Среда обитания
Группа 1	<i>Hymenobacter</i> spp. $\rho = 0.636, p < 0.05, n = 11$	Почва
	Micrococcaceae ¹ $\rho = -0.441, p < 0.01, n = 34$	Почва, кожа
	<i>Dorea</i> spp. ² $\rho = -0.392, p < 0.05, n = 35$	Кишечник
	<i>Chryseobacterium</i> spp. $\rho = -0.366, p < 0.05, n = 30$	Почва, вода, пища
	Geodermatophilaceae $\rho = -0.437, p < 0.05, n = 27$	Почва, вода
Группа 2	<i>Microbacterium</i> spp. $\rho = -0.756, p < 0.001, n = 16$	Пища
	<i>Thermus</i> spp. $\rho = -0.608, p < 0.01, n = 17$	Минеральные источники
	<i>Helicobacter pylori</i> $\rho = -0.587, p < 0.05, n = 12$	Желудок
	Solirubrobacterales ³ $\rho = -0.523, p < 0.05, n = 20$	Почва, вода
МЗО	<i>Sutterella</i> spp. $\rho = -0.330, p = 0,05, n = 35$	Кишечник
	<i>Pseudomonas</i> spp. ⁴ $\rho = -0.709, p < 0.05, n = 10$	Почва, вода, пища
	[<i>Eubacterium</i>] spp. $\rho = -0.697, p < 0.05, n = 10$	Кишечник
	<i>Bacteroides uniformis</i> $\rho = -0.566, p = 0,05, n = 12$	Кишечник
МНЗО	Leuconostocaceae $\rho = -0.624, p = 0,05, n = 10$	Пища, кишечник
	<i>Microbacterium</i> spp. $\rho = -0.714, p < 0.05, n = 8$	Пища
	<i>Clostridium</i> spp. $\rho = -0.521, p < 0.05, n = 16$	Кишечник, почва, вода
	Gaiellaceae $\rho = -0.709, p < 0.05, n = 10$	Почва, вода

¹ Неидентифицированные таксоны семейства, не принадлежащие к родам *Arthrobacter*, *Kocuria*, *Microbispora*, *Micrococcus*, *Nesterenkonia*, *Renibacterium* и *Rothia*; ² неидентифицированные виды, не принадлежащие к виду *D. formicigenerans*; ³ неидентифицированные таксоны порядка, не принадлежащие к семействам Conexibacteraceae, Patulibacteraceae, Solirubrobacteraceae; ⁴ неидентифицированные виды, не принадлежащие к видам *P. fragi* и *P. viridiflava*.

Таблица 4. Таксоны, доля которых в микробиоме крови положительно коррелировала с сывороточной концентрацией NGF

Группа	Таксон	Среда обитания
Группа 1	<i>Akkermansia muciniphila</i> $\rho = 0.495, p < 0.005, n = 38$	Кишечник
	<i>Dorea</i> spp. ¹ $\rho = 0.399, p < 0.05, n = 35$	Кишечник, почва
	<i>Aerococcus</i> spp. $\rho = 0.661, p < 0.05, n = 10$	Кожа, пыль
Группа 2	<i>Ruminococcus bromii</i> $\rho = 0.640, p < 0.01, n = 17$	Кишечник
МЗО	[<i>Prevotella</i>] spp. $\rho = 0.706, p < 0.05, n = 9$	Кишечник
МНЗО	<i>Ruminococcus bromii</i> $\rho = 0.619, p < 0.05, n = 14$	Кишечник

¹ Неидентифицированные виды, не принадлежащие к виду *D. formicigenerans*.

Возможно, усиление микробной транслокации из желудка может негативно сказываться на концентрации BDNF сыворотки.

После разделения пациентов Группы 2 на подгруппы по метаболическому типу ожирения было выявлено, что для пациентов с МНЗО, так же, как и для общей группы пациентов с ожирением, характерна позитивная связь между таксонами-обитателями почвы и воды и сывороточной концентрацией BDNF. В целом, большее разнообразие микробиома крови, характерное для пациентов с МНЗО, обуслав-

Таблица 5. Таксоны, доля которых в микробиоме крови отрицательно коррелировала с сывороточной концентрацией NGF

Группа	Таксон	Среда обитания
Группа 1	<i>Clostridium</i> spp. $\rho = -0.386, p < 0.05, n = 35$	Кишечник, почва, вода
	Oxalobacteraceae ¹ $\rho = -0.409, p < 0.05, n = 34$	Кишечник, почва, вода
	Pirellulaceae $\rho = -0.636, p < 0.05, n = 11$	Кишечник, почва, вода
	Chitinophagaceae ² $\rho = -0.709, p < 0.01, n = 13$	Кишечник, почва, вода
	Nocardioideaceae ³ $\rho = -0.450, p < 0.05, n = 21$	Почва, вода
	[<i>Eubacterium</i>] spp. $\rho = -0.297, p < 0.05, n = 49$	Кишечник
	Hyphomicrobiaceae $\rho = -0.548, p < 0.05, n = 17$	Почва, вода
МЗО	Christensenellaceae $\rho = -0.929, p < 0.001, n = 8$	Кишечник
МНЗО	<i>Bacteroides</i> spp. ⁴ $\rho = -0.446, p < 0.005, n = 46$	Кишечник
	<i>Thermus</i> spp. $\rho = -0.756, p < 0.05, n = 8$	Минеральные источники
	[Barnesiellaceae] $\rho = -0.492, p < 0.05, n = 19$	Кишечник
	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> $\rho = -0.490, p < 0.05, n = 19$	Кишечник
	<i>Roseburia</i> spp. $\rho = -0.479, p < 0.05, n = 26$	Кишечник
	Oxalobacteraceae $\rho = -0.433, p < 0.05, n = 26$	Кишечник, почва, вода

¹ Неидентифицированные таксоны семейства, не принадлежащие к родам *Cupriavidus*, *Janthinobacterium*, *Oxalobacter*, *Polynucleobacter*, *Ralstonia*; ² неидентифицированные таксоны семейства, не принадлежащие к родам *Chitinophaga*, *Flavihumibacter*, *Flavisolibacter*, *Niabella*, *Sediminibacterium*; ³ неидентифицированные таксоны семейства, не принадлежащие к родам *Aeromicrobium*, *Friedmanniella*, *Kribbella*, *Nocardioides*, *Pimelobacter*, *Nocardioipsis*; ⁴ неидентифицированные виды, не принадлежащие к видам *B. acidifaciens*, *B. barnesiiae*, *B. cacaee*, *B. coprophilus*, *B. eggerthii*, *B. fragilis*, *B. ovatus*, *B. plebeius*, *B. uniformis*.

ливают большее количество таксонов, для которых была выявлена связь с содержанием BDNF, по сравнению МЗО. У пациентов с МЗО единственным таксоном, продемонстрировавшим положительную корреляцию с содержанием этого нейротрофина был *Micrococcus* spp. Для пациентов с МЗО, как и для пациентов с МНЗО, был характерен уникальный спектр таксонов с отрицательной корреляцией с уровнем BDNF. Преимущественно эти таксоны были представлены обитателями кишечника, а также таксонами, характерными для продуктов питания. Следует отметить, что выделенная негативная взаимосвязь “*Eubacterium*–BDNF” у пациентов с МЗО не является новой, Kim и соавт. показали, что содержание *Eubacterium* в микробиоме кишечника также отрицательно коррелирует с содержанием BDNF [39].

Анализ взаимосвязи содержания отдельных таксонов микробиома крови и NGF показал, что у пациентов Группы 1 одним из основных таксонов, положительно коррелировавших с концентрацией этого нейротрофина, был *Akkermansia muciniphila*. В последние годы роли *A. muciniphila* в кишечном микробиоме уделяется пристальное внимание. Являясь облигатным анаэробом, *A. muciniphila* обитает непосредственно в толще муцина, в отличие от других представителей кишечного микробиома, которые в основном формируют микробный барьер поверх муцинового слоя [40, 41]. Было показано, что *A. muciniphila* участвует в поддержании целостности эпителиоцитов кишечника и нормальной толщины слизистого слоя, а также регулирует экспрессию генов в энтероцитах и иммунокомпетентных клетках [42]. Применение этого микроорганизма в качестве пробиотика представляется перспективным с целью уменьшения проницаемости кишечника и нормализации метаболического гомеостаза у пациентов с ожирением и сахарным диабетом II типа, для которых характерно снижение содержания *A. muciniphila* [43]. Микробная

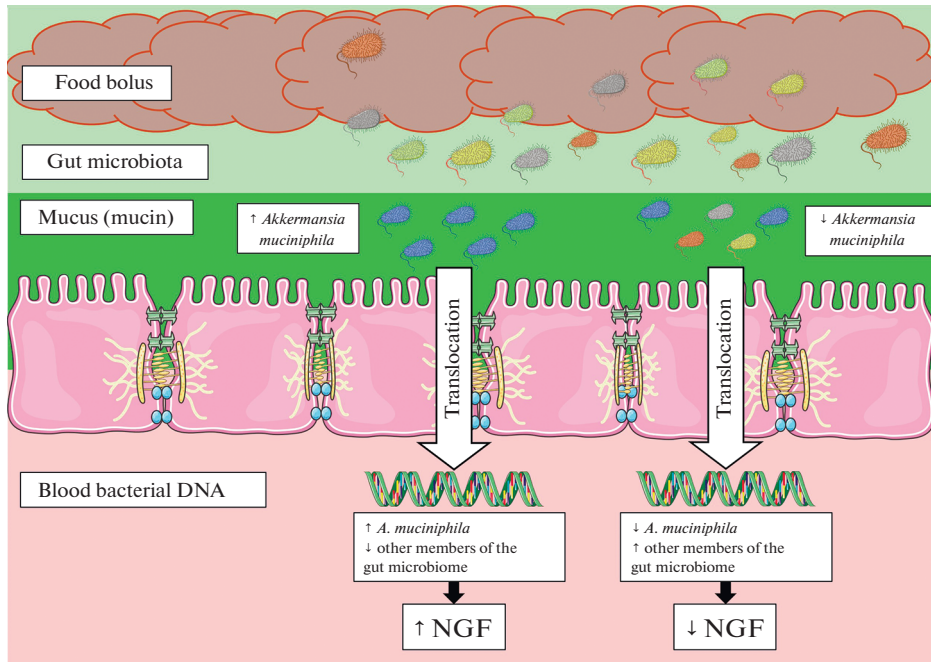


Рис. 2. Возможное влияние *A. muciniphila* на транслокацию других представителей кишечного микробиома и формирование пула NGF сыворотки у пациентов Группы 1, комментарии в тексте. Рисунок создан с частичным использованием изображений Servier Medical Art, распространяемых по лицензии Creative Commons Attribution 3.0 Unported License [44].

транслокация из кишечника, очевидно, происходит из муцинового слоя, находящегося непосредственно поверх кишечного эпителия. Можно предполагать, что большее содержание *A. muciniphila* препятствует проникновению других микроорганизмов в слой слизи и их транслокации из просвета кишечника (рис. 2). Появление положительной взаимосвязи “*A. muciniphila*–NGF” у здоровых доноров свидетельствует о том, что деятельность этого микроорганизма, направленная на поддержание целостности стенки кишечника, ассоциирована с более высокими уровнями NGF. По-видимому, микробная транслокация ряда представителей кишечной флоры негативно сказывается на содержании NGF. Подобное предположение подтверждают многочисленными негативными взаимосвязями между уровнем этого нейротрофина и представителями кишечной флоры, такими как [*Eubacterium*] spp., *Clostridium* spp. и *Oxalobacteraceae*.

У пациентов с ожирением и, в частности, с МНЗО, единственным таксоном, положительно коррелировавшим с уровнем NGF, был *Ruminococcus bromii*. Следует отметить, что *R. bromii* является одним из основных бутират-продуцирующих бактерий кишечника, который, в свою очередь, способен усиливать экспрессию NGF [45, 46]. Возможно, появление связи “*R. bromii*–NGF” обуславливается бутиратом и объяснимо повышенной проницаемостью кишечника, характерной для ожирения, особенно метаболически нездорового типа. У пациентов с МЗО такой связи выявлено не было, что, скорее всего, связано с более редкой представленностью этого таксона в микробиоме крови. ДНК *R. bromii* было выделено почти у половины ($n = 17$) пациентов с МНЗО, тогда как в группе лиц с МЗО ДНК данного вида

определялась только у 2 пациентов. Так же, как и у здоровых доноров, у пациентов с МНЗО был выделен ряд таксонов, характерных для кишечного микробиома, и негативно коррелировавших с содержанием NGF. Однако у пациентов с МЗО подобные таксоны практически отсутствовали. Ранее мы высказывали предположение, что более разнообразный кишечный микробиом, характерный для лиц с МЗО обуславливает меньшую проницаемость кишечной стенки для микробной ДНК [11].

Несмотря на то, что PAMPs и провоспалительные цитокины, такие как IL1 β , IL6 и TNF α , способствуют продукции NGF [25], полученные нами данные предполагают, что транслокация бактериальной ДНК некоторых таксонов из кишечника, в целом, негативно взаимосвязана с содержанием NGF в плазме. При этом подобная динамика наблюдается как у здоровых лиц, так и у пациентов с ожирением. Можно предполагать, что влияние транслокации кишечной микробиоты на уровень NGF не ограничивается потенцированием воспаления, а включает пока не установленные сигнальные молекулы и/или сигнальные пути.

ВЫВОДЫ

Транслокация бактериальной ДНК в кровь может оказывать влияние на сывороточную концентрацию нейротрофинов BDNF и NGF. Транслокация ДНК таксонов-обитателей почв и вод у здоровых доноров оказывает негативное влияние на содержание BDNF, тогда как при ожирении – позитивное. Подобная взаимосвязь характерна для пациентов с метаболически нездоровым ожирением, но не для лиц с метаболически здоровым типом. Ожирение также ассоциировано с появлением негативной взаимосвязи между сывороточным уровнем BDNF и представленностью ДНК таксонов-обитателей желудка в микробиоме крови.

Среди таксонов микробиома крови, взаимосвязанных с сывороточной концентрацией NGF, наибольшим влиянием обладают представители микробного сообщества кишечника. Как у здоровых лиц, так и у пациентов с ожирением, по-видимому, транслокация бактериальной ДНК из кишечника оказывала преимущественно негативное влияние на содержание этого нейротрофина. У здоровых доноров была выделена положительная ассоциация между уровнем NGF и *Akkermansia muciniphila* – таксоном, участвующим в поддержании целостности кишечной стенки. Для пациентов с ожирением, особенно с метаболически нездоровым типом, была характерна позитивная связь NGF с *Ruminococcus bromii*, который представляет один из основных бутират-продуцирующих таксонов кишечника.

В целом, взаимосвязь микробной ДНК крови и сывороточной концентрации нейротрофинов зависит от источников транслокации, проницаемости внешних барьеров, особенностей микробиомов (кишечника, кожи и т.д.), а также наличия или отсутствия метаболических нарушений у пациентов с разной массой тела.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИ

Работа выполнена в рамках договора № 0373100122119000041 по проекту “Создание банка биообразцов сыворотки крови и фекалий от здоровых доноров и пациентов с ожирением, метаболическим синдромом, сахарным диабетом II типа, нарушением мукозального барьера желудочно-кишечного тракта с целью выявления кандидатных видонеспецифических медиаторов систем quorum sensing микробиоты человека, модулирующих эндокринную и метаболическую функцию жировой ткани”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы (А.В.Ш., С.А.Р., С.М.Ю., А.М.Г., В.В.М.), планирование эксперимента (А.В.Ш., С.А.Р., А.М.Г., Т.В.Г), сбор данных (Т.В.Г., И.М.К., М.С.К.), обработка данных (И.М.К., М.С.К.), написание манускрипта (И.М.К., М.С.К., А.В.Ш.), редактирование манускрипта (А.В.Ш., С.А.Р., С.М.Ю., А.М.Г., В.В.М.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC)* (2016) Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: A pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet* 387: 1377–1396.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30054-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30054-X)
2. *Iacobini C, Pugliese G, Blasetti Fantauzzi C, Federici M, Menini S* (2019) Metabolically healthy versus metabolically unhealthy obesity. *Metabolism* 92: 51–60.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.11.009>
3. *Stino AM, Smith AG* (2017) Peripheral neuropathy in prediabetes and the metabolic syndrome. *J Diabetes Invest* 8: 646–655.
<https://doi.org/10.1111/jdi.12650>
4. *Rios M* (2014) Neurotrophins and the regulation of energy balance and body weight. *Handb Exp Pharmacol* 220: 283–307.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-45106-5_11
5. *Cao Y, Wang H, Zeng W* (2018) Whole-tissue 3D imaging reveals intra-adipose sympathetic plasticity regulated by NGF-TrkA signal in cold-induced beiging. *Protein Cell* 9: 527–539.
<https://doi.org/10.1007/s13238-018-0528-5>
6. *Camerino C, Conte E, Cannone M, Caloiero R, Fonzino A, Tricarico D* (2016) Nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and osteocalcin gene relationship in energy regulation, bone homeostasis and reproductive organs analyzed by mrna quantitative evaluation and linear correlation analysis. *Front Physiol* 7: 1–9.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00456>
7. *Tseng C, Wu C* (2018) The gut microbiome in obesity. *J Formos Med Assoc* 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.jfma.2018.07.009>
8. *Jamar G, Ribeiro DA, Pisani LP* (2020) High-fat or high-sugar diets as trigger inflammation in the microbiota-gut-brain axis. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1–19.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1747046>
9. *Margolis KG, Cryan JF, Mayer EA* (2022) The Microbiota-Gut-Brain Axis: From Motility to Mood. *Gastroenterology* 160: 1486–1501.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.10.066>
10. *Massier L, Blüher M, Kovacs P, Chakaroun RM* (2021) Impaired Intestinal Barrier and Tissue Bacteria: Pathomechanisms for Metabolic Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)* 12: 1–18.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2021.616506>
11. *Шестопалов АВ, Колесникова ИМ, Гапонов АМ, Григорьева ТВ, Хуснутдинова ДР, Камальдинова ДР, Волкова НИ, Макаров ВВ, Юдин СМ, Румянцев АГ, Румянцев СА* (2022) Влияние метаболического типа ожирения на микробиом крови. *Вопр биол мед фармацевт химии* 25: 35–41. [*Shestopalov AV, Kolesnikova IM, Gaponov AM, Grigoryeva TV, Khusnutdinova DR, Kamaldinova DR, Volkova NI, Makarov VV, Yudin SM, Rumyantsev AG, Rumyantsev SA* (2022) Effect of metabolic type of obesity on blood microbiome. *Problems Biol Med Pharmac Chem* 25(2): 35–41. (In Russ)].
<https://doi.org/10.29296/25877313-2022-02-06>
12. *Kumagai Y, Takeuchi O, Akira S* (2008) TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA. *Adv Drug Deliv Rev* 60: 795–804.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.12.004>
13. *Thomalla M, Schmid A, Neumann E, Pfefferle PI, Müller-Ladner U, Schäffler A, Karrasch T* (2019) Evidence of an anti-inflammatory toll-like receptor 9 (TLR 9) pathway in adipocytes. *J Endocrinol* 240: 325–343.
<https://doi.org/10.1530/JOE-18-0326>
14. *Guillemot-Legris O, Muccioli GG* (2017) Obesity-Induced Neuroinflammation: Beyond the Hypothalamus. *Trends Neurosci* 40: 237–253.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.02.005>
15. *Kumar V* (2019) Toll-like receptors in the pathogenesis of neuroinflammation. *J Neuroimmunol* 332: 16–30.
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2019.03.012>
16. *Cheng Z, Abrams ST, Austin J, Toh J, Wang SS, Wang Z, Yu Q, Yu W, Toh CH, Wang G* (2020) The Central Role and Possible Mechanisms of Bacterial DNAs in Sepsis Development. *Mediators Inflamm* 2020: 7418342.
<https://doi.org/10.1155/2020/7418342>

17. *Motwani M, Pesiridis S, Fitzgerald KA* (2019) DNA sensing by the cGAS–STING pathway in health and disease. *Nat Rev Genet* 20: 657–674.
<https://doi.org/10.1038/s41576-019-0151-1>
18. *Bai J, Cervantes C, Liu J, He S, Zhou H, Zhang B, Cai H, Yin D, Hu D, Li Z, Chen H, Gao X, Wang F, O'Connor JC, Xu Y, Liu M, Dong LQ, Liu F* (2017) Dsba-L prevents obesity-induced inflammation and insulin resistance by suppressing the mtDNA release-activated cGAS-cGAMP-STING pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: 12196–12201.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1708744114>
19. *Bai J, Cervantes C, He S, He J, Plasko GR, Wen J, Li Z, Yin D, Zhang C, Liu M, Dong LQ, Liu F* (2020) Mitochondrial stress-activated cGAS-STING pathway inhibits thermogenic program and contributes to overnutrition-induced obesity in mice. *Commun Biol* 3: 257.
<https://doi.org/10.1038/s42003-020-0986-1>
20. *Kumari P, Russo AJ, Shivcharan S, Rathinam VA* (2021) AIM2 in health and disease: inflammasome and beyond. *Immunol Rev* 297:83–95.
<https://doi.org/10.1111/immr.12903>
21. *Engin AB* (2017) Adipocyte-Macrophage Cross-Talk in Obesity. *Adv Exp Med Biol* 960: 327–343.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_14
22. *Murphy AJ, Kraakman MJ, Kammoun HL, Dragoljevic D, Lee MKS, Ramlor KE, Wentworth JM, Vasanthakumar A, Gerlic M, Whitehead LW, DiRago L, Cengia L, Lane RM, Metcalf D, Vince JE, Harrison LC, Kallies A, Kile BT, Croker BA, Febbraio MA, Masters SL* (2016) IL-18 Production from the NLRP1 Inflammasome Prevents Obesity and Metabolic Syndrome. *Cell Metab* 23: 155–164.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.024>
23. *Heese K, Fiebich BL, Bauer J, Otten U* (1998) NF-kappaB modulates lipopolysaccharide-induced microglial nerve growth factor expression. *Glia* 22: 401–407.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-1136\(199804\)22:4<401::aid-glia9>3.0.co;2-5](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-1136(199804)22:4<401::aid-glia9>3.0.co;2-5)
24. *Heese K, Inoue N, Sawada T* (2006) NF-κB Regulates B-Cell-Derived Nerve Growth Factor Expression. *Cell Mol Immunol* 3: 63–66.
25. *Minnone G, De Benedetti F, Bracci-Laudiero L* (2017) NGF and its receptors in the regulation of inflammatory response. *Int J Mol Sci* 18.
<https://doi.org/10.3390/ijms18051028>
26. *Rage F, Silhol M, Tapia-Arancibia L* (2006) IL-1beta regulation of BDNF expression in rat cultured hypothalamic neurons depends on the presence of glial cells. *Neurochem Int* 49: 433–441.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2006.03.002>
27. Expert panel on detection evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (2001) Executive summary of the third report (NCEP) – adult treatment panel III. *J Am Med Assoc* 285: 2486–2497.
<https://doi.org/10.1001/jama.285.19.2486>
28. *Kolesnikova IM, Romyantsev SA, Volkova NI, Gaponov AM, Grigor'eva TV, Laikov AV, Makarov VV, Yudin SM, Borisenko OV, Shestopalov AV* (2022) Influence of Obesity and Its Metabolic Type on the Serum Concentration of Neurotrophins. *Neurochem J* 16: 200–206.
<https://doi.org/10.1134/S1819712422020088>
29. *Hirt PA, Castillo DE, Yosipovitch G, Keri JE* (2019) Skin changes in the obese patient. *J Am Acad Dermatol* 81: 1037–1057.
<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2018.12.070>
30. *Son MJ, Yang G-J, Jo E-H, Shim Y-H, Kang S-J, Hong J-E, Kim Y-E, Lee J-E, Chun J, Park S, Jung J, Park M-C* (2019) Association of atopic dermatitis with obesity via a multi-omics approach: A protocol for a case-control study. *Medicine (Baltimore)* 98: e16527.
<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000016527>
31. *Guseva D, Rüdrieh U, Kotnik N, Gehring M, Patsinakidis N, Agelopoulos K, Ständer S, Homey B, Kapp A, Gibbs BF, Ponimaskin E, Raap U* (2020) Neuronal branching of sensory neurons is associated with BDNF-positive eosinophils in atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 50: 577–584.
<https://doi.org/10.1111/cea.13560>
32. *Sideleva O, Black K, Dixon A* (2013) Effects of obesity and weight loss on airway physiology and inflammation in asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 26: 455–458.
<https://doi.org/10.1201/b13996-3>
33. *Sreter KB, Popovic-Grle S, Lampalo M, Konjevod M, Tudor L, Nikolac Perkovic M, Jukic I, Bin-gulac-Popovic J, Safic Stanic H, Markeljevic J, Pivac N, Svob Strac D* (2020) Plasma Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Concentration and BDNF/TrkB Gene Polymorphisms in Croatian Adults with Asthma. *J Pers Med* 10.
<https://doi.org/10.3390/jpm10040189>
34. *Pascal M, Perez-Gordo M, Caballero T, Escribese MM, Lopez Longo MN, Luengo O, Manso L, Matheu V, Seoane E, Zamorano M, Labrador M, Mayorga C* (2018) Microbiome and Allergic Diseases. *Front Immunol* 9: 1584.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01584>
35. *Zhang L, Yin Y, Zhang H, Zhong W, Zhang J* (2017) Association of asthma diagnosis with leptin and adiponectin: a systematic review and meta-analysis. *J Investig Med Off Publ Am Fed Clin*

- Res 65: 57–64.
<https://doi.org/10.1136/jim-2016-000127>
36. Jiménez-Cortegana C, Ortiz-García G, Serrano A, Moreno-Ramírez D, Sánchez-Margalet V (2021) Possible Role of Leptin in Atopic Dermatitis: A Literature Review. *Biomolecules* 11: 1–11.
<https://doi.org/10.3390/biom11111642>
 37. Li C, Meng F, Lei Y, Liu J, Liu J, Zhang J, Liu F, Liu C, Guo M, Lu X-Y (2021) Leptin regulates exon-specific transcription of the *Bdnf* gene via epigenetic modifications mediated by an AKT/p300 HAT cascade. *Mol Psychiatry* 26: 3701–3722.
<https://doi.org/10.1038/s41380-020-00922-0>
 38. Rohm T V, Fuchs R, Müller RL, Keller L, Baumann Z, Bosch AJT, Schneider R, Labes D, Langer I, Pilz JB, Niess JH, Delko T, Hruz P, Cavelti-Weder C (2021) Obesity in Humans Is Characterized by Gut Inflammation as Shown by Pro-Inflammatory Intestinal Macrophage Accumulation. *Front Immunol* 12: 668654.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.668654>
 39. Kim C-S, Cha L, Sim M, Jung S, Chun WY, Baik HW, Shin D-M (2021) Probiotic Supplementation Improves Cognitive Function and Mood with Changes in Gut Microbiota in Community-Dwelling Older Adults: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter Trial. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 76: 32–40.
<https://doi.org/10.1093/gerona/glaa090>
 40. Geerlings SY, Kostopoulos I, de Vos WM, Belzer C (2018) *Akkermansia muciniphila* in the human gastrointestinal tract: When, where, and how? *Microorganisms* 6: 1–26.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms6030075>
 41. Portincasa P, Bonfrate L, Khalil M, De Angelis M, Calabrese FM, D'amato M, Wang DQH, Di Ci-aula A (2022) Intestinal Barrier and Permeability in Health, Obesity and NAFLD. *Biomedicines* 10: 1–62.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines10010083>
 42. Zhang T, Li Q, Cheng L, Buch H, Zhang F (2019) *Akkermansia muciniphila* is a promising probiotic. *Microb Biotechnol* 12: 1109–1125.
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.13410>
 43. Xu Y, Wang N, Tan HY, Li S, Zhang C, Feng Y (2020) Function of *Akkermansia muciniphila* in Obesity: Interactions With Lipid Metabolism, Immune Response and Gut Systems. *Front Microbiol* 11: 1–12.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00219>
 44. Servier Medical Art by Servier is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. <https://smart.servier.com/>. Accessed 6 Jul 2022
 45. Rosés C, Cuevas-Sierra A, Quintana S, Riezu-Boj JI, Martínez JA, Milagro FI, Barceló A (2021) Gut Microbiota Bacterial Species Associated with Mediterranean Diet-Related Food Groups in a Northern Spanish Population. *Nutrients* 13.
<https://doi.org/10.3390/nu13020636>
 46. Long X, Li M, Li L-X, Sun Y-Y, Zhang W-X, Zhao D-Y, Li Y-Q (2018) Butyrate promotes visceral hypersensitivity in an IBS-like model via enteric glial cell-derived nerve growth factor. *Neurogastroenterol Motil* 30: e13227.
<https://doi.org/10.1111/nmo.13227>

Relationship between Blood Microbiome and Neurotrophins in Different Metabolic Types of Obesity

I. M. Kolesnikova^{a, *}, A. M. Gaponov^{b, c}, S. A. Roumiantsev^{a, b},
 M. S. Karbyshev^a, T. V. Grigoryeva^d, V. V. Makarov^e, S. M. Yudin^e,
 O. V. Borisenko^a, and A. V. Shestopalov^{a, b, f}

^aPirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

^bCenter for Digital and Translational Biomedicine, Center for Molecular Health, Moscow, Russia

^cNegovsky Research Institute of General Reanimatology, Federal Research
and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation, Moscow, Russia

^dKazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia

^eCenter for Strategic Planning and Management of Medical and Biological Health Risks,
Moscow, Russia

^fDmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology,
Oncology and Immunology, Moscow, Russia

*E-mail: ir.max.kolesnikova@gmail.com

Blood bacterial DNA is one of the pathogen-associated molecular patterns whose signaling pathways can alter the expression of neurotrophins such as brain-derived neuro-

trophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF). The study of neurotrophins is interesting in the context of obesity, which is associated with a risk of neuropathy. At the same time, the risk of complications depends on the metabolic type of obesity: in the metabolically unhealthy type (MUHO), this risk is significantly higher than in the metabolically healthy (MHO). The aim was to study the relationship between the blood microbiome and serum BDNF and NGF in different metabolic types of obesity. Healthy non-obese donors ($n = 114$) and obese patients ($n = 98$) were examined. Obese patients were divided into subgroups depending on the obesity metabolic type: patients with MHO ($n = 36$) and patients with MUHO ($n = 53$). Serum concentrations of neurotrophins were measured, and the blood microbiome qualitative assessment was determined by sequencing of the variable region of the 16S rRNA gene. In healthy donors, taxa translocated from the skin and respiratory tract were negatively associated with BDNF, but in obesity, especially MUHO, this relationship was positive. Taxa translocated from the stomach (*Helicobacter pylori*) and from the intestine (*Sutterella* spp.) were negatively associated with BDNF in obese patients. NGF in healthy donors was positively associated with *Akkermansia muciniphila*, which supports intestinal integrity and reduces intestinal permeability. Patients with MUHO had a positive relationship between NGF and *Ruminococcus bromii*. Numerous negative relationships between taxa of the intestinal flora and NGF were found in healthy donors and in patients with MUHO, but not with MHO. In general, the effect of blood bacterial DNA on serum neurotrophins depends on the translocation sources, the barriers permeability, the characteristics of microbiomes (gut, skin, etc.), as well as the presence or absence of metabolic disorders in patients with different weight.

Keywords: neurotrophins, blood microbiome, blood bacterial DNA, nerve growth factor, NGF, brain-derived neurotrophic factor, BDNF, obesity, metabolically healthy obesity, metabolically unhealthy obesity

РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА (NO) В МЕХАНИЗМАХ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ИНТЕРСТИЦИЯ ПОЧЕЧНОЙ МЕДУЛЛЫ В УСЛОВИЯХ ГИПОТИРЕОЗА У КРЫС С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ ВАЗОПРЕССИНА В КРОВИ

© 2022 г. П. Д. Правикова¹, *, Л. Н. Иванова¹

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

*E-mail: PollyPravi@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.08.2022 г.

После доработки 07.10.2022 г.

Принята к публикации 11.10.2022 г.

У крыс линии WAG с высоким уровнем вазопрессина и у вазопрессин-дефицитной линии крыс Brattleboro в условиях гипотиреоза исследована роль почечного аутокоида оксида азота (NO) в механизмах структурных изменений интерстиция почечной медуллы, влияющих на внеклеточную проницаемость матрикса для воды и ионов. Установлено, что гипотиреоз у крыс WAG не приводит к существенным изменениям параметров гидроуретической функции, тогда как для крыс Brattleboro характерна антидиуретическая реакция вследствие активации реабсорбции осмотически свободной воды. Предполагается, что отсутствие изменений параметров гидроуреза у крыс WAG при гипотиреозе обусловлено увеличением в медулярной зоне почки содержания гиалуронана, основного компонента интерстиция, образующего барьер на пути диффузии воды и ионов. В то же время у крыс Brattleboro стимуляция концентрирующей функции при моделировании гипотиреоза не сопровождается существенными изменениями состояния внеклеточного матрикса, который для данной линии крыс в интактном состоянии характеризуется практически полным отсутствием гиалуронана. Установлено, что NO играет существенную роль в изменении структуры почечного интерстиция у крыс WAG в условиях гипотиреоза. Блокада синтеза NO с помощью L-NAME приводит к устранению выявленных при гипотиреозе изменений внеклеточного матрикса сосочка почки в связи с изменением до базальных значений контрольной группы уровня экспрессии гена гиалуронансинтазы-2 (HAS2), кодирующего фермент синтеза гиалуронана. Результаты исследования позволяют заключить, что гипотиреоз приводит к нарастанию содержания гиалуронана в интерстиции почечной медуллы, причем ключевую роль в проявлении данного эффекта играет NO, базальная активность которого в сосочке почки зависит от уровня вазопрессина в крови.

Ключевые слова: гиалуронан, гипотиреоз, оксид азота, вазопрессин, реабсорбция воды, крысы линии WAG и Brattleboro

DOI: 10.31857/S0869813922110097

Процесс осмотического концентрирования реализуется в зоне почечной медуллы, где барьер, разделяющий элементы концентрирующего механизма, представлен не только эпителием канальцев, но и экстрацеллюлярным матриксом, определяющим внеклеточную проницаемость для диффузии воды и ионов [1]. Одним из главных компонентов почечного интерстиция является кислый гликозаминогликан (ГАГ), гиалуронан (ГН) [2, 3], формирующий в сосочке почки гель с высоким

сопротивлением для диффузии жидкости [4]. Процесс биосинтеза ГН в соматических тканях млекопитающих, в том числе в интерстициальных клетках почки, осуществляется с участием ключевого фермента гиалуронансинтазы (HAS) [5], тогда как основную роль в деградации полимера играет семейство ферментов гиалуронидаз (HYAL1, 2) [6]. Нейрогипофизарный гормон вазопрессин, основной регулятор осмотического гомеостаза, реализует антидиуретический эффект не только путем стимуляции факультативной реабсорбции воды [7], но также посредством контроля проницаемости внеклеточного матрикса, регулируя гиалуронидазную активность [8, 9] и экспрессию генов метаболизма ГН [10]. Установлена тесная зависимость эффективности осмотического концентрирования от взаимодействия системных гормонов и тканевых аутокоидов в регуляции содержания ГН в интерстиции сосочка почки [11, 12]. Однако механизм вовлечения ГН интерстиция почки в процесс осмотического концентрирования остается дискуссионным и требует дальнейших исследований [13].

Тиреоидные гормоны (ТГ), секретируемые щитовидной железой, являются одним из главных факторов в системе регуляции водно-электролитного гомеостаза, влияющих как на почечную гемодинамику [14], так и на реабсорбцию солей и воды [15, 16]. Гипотиреоз сопровождается снижением скорости клубочковой фильтрации [17] и нарушением водовыделительной функции на фоне гиперсекреции ВП [18, 19], однако изменения внеклеточного матрикса почечной медуллы, определяющего скорость диффузии воды и ионов между элементами концентрирующего механизма, при гипотиреозе остается неизученными. Данные о развитии тканевых отеков при гипотиреозе вследствие увеличения содержания муцинов и ГН [20, 21] позволяют предположить, что дисфункция щитовидной железы приводит к изменению содержания ГН в интерстиции почки, образующего барьер на пути диффузии воды и ионов из просвета канальцев в кровоток.

Адекватность работы любой регуляторной системы зависит от факторов, модулирующих эффект основного гормона, и в последние годы значительное внимание уделяется роли местных, аутокоидных агентов, синтез которых нередко активируется самим гормоном, формирующим отрицательную обратную связь [22]. При хроническом гипотиреозе наблюдается увеличение уровня почечного аутокоида NO в сосочке почки [23], что позволяет предположить участие данного фактора в регуляции состояния внеклеточного матрикса почечной медуллы при подавлении синтеза ТГ. Целью данной работы явилось исследование роли NO в механизмах структурных изменений интерстициального матрикса почечной медуллы в условиях гипотиреоза у крыс с различным уровнем эндогенного вазопрессина в крови.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на крысах инбредной линии WAG (Wistar Albino Glaxo) с высоким уровнем вазопрессина в крови, а также на гомозиготных крысах Brattleboro, лишенных вазопрессина вследствие мутации гена, кодирующего предшественник гормона [24]. В опытах использованы крысы в возрасте 60 дней и массой 150–200 г из вивария конвенциональных животных Института цитологии и генетики СО РАН, содержащиеся в условиях стандартного рациона со свободным доступом к питьевой воде и сухому корму. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ (Приложение к Приказу Министерства здравоохранения РФ № 267 от 19.06.2003), а также с учетом международных рекомендаций по работе с экспериментальными животными.

Животные каждой линии были разделены на 3 экспериментальные группы (по 9 особей в каждой): 1) контрольная группа; 2) крысы в условиях блокады синтеза ти-

реоидных гормонов раствором метимазола; 3) гипотиреоидные крысы с блокадой синтеза NO путем введения L-NAME. Крысы WAG в течение 6 недель потребляли 0.05%-ный раствор метимазола (Тирозол, Merck, Германия), блокирующего пероксидазу, участвующую в йодировании ТГ [25]. Учитывая межлинейные различия в суточном объеме потребляемой жидкости, для уравнивания суточной дозы препарата особи Brattleboro, характеризовавшиеся полидипсией, получали для питья 0.01%-ный раствор метимазола. Контрольные особи двух линий потребляли дистиллированную воду. Принимая во внимание увеличение в условиях гипотиреоза уровня NO во многих тканях [26, 27], в том числе в почке [23], для выявления значимости NO при гипотиреозе была предпринята серия экспериментов, в которых блокада синтеза NO при внутрибрюшинном введении L-NAME – неселективного ингибитора синтаз NO – дважды в день в течение последних 2 сут в дозе 3 мг на 100 г массы тела [28] осуществлялась на фоне подавления синтеза ТГ метимазолом.

По окончании экспериментального периода животных взвешивали и на 2 ч помещали в индивидуальные клетки с проволочным дном для сбора спонтанно экскретируемой мочи, затем животных анестезировали тиопенталом натрия (10 мг/100 г массы тела, внутрибрюшинно) и забирали пробы крови и образцы почечной ткани для гистохимического и молекулярно-генетического анализа.

Осмоляльность мочи и сыворотки крови определяли криоскопическим методом (миллиосмометр ОСКР-1М КИВИ, Россия). Концентрацию креатинина в моче и сыворотке крови определяли методом Яффе на спектрофотометре (BioPhotometr plus, “Eppendorf”, Германия, 490 нм), скорость клубочковой фильтрации рассчитывали по клиренсу эндогенного креатинина. Расчет почечных функций проводили по стандартным формулам на 100 г массы тела. Концентрацию общего уровня тетраiodтиронина (Т4) в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом (Rat thyroxine (T4) ELISA Kit, Cusabio, CSB-E05082r).

Пробоподготовку почечной ткани для гистохимического анализа проводили по стандартному протоколу [29]. Окрашивание срезов толщиной 5 мкм для специфического выявления кислых ГАГ производили альциановым синим (БиоВитрум, Россия). Гистологические препараты изучали с использованием светового микроскопа Axioscop 40 (Carl Zeiss), морфометрическое исследование высоты эпителиоцитов собирательных трубок середины сосочка проводили с помощью программы AxioVision 4.5.

Уровень экспрессии генов, кодирующих ферменты метаболизма гиалуроновой кислоты (HAS2, Hyal2) в почечной медулле, определяли методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). В качестве внутреннего стандарта использовались праймеры для гена, кодирующего белок “домашнего хозяйства” гипоксантинфосфорибозилтрансферазу-1 (*HPRT1*). Выделенные образцы ткани почки помещали в стерильные пробирки, замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C . Тотальную РНК из ткани почек выделяли при помощи набора реагентов Aurum Total RNA Mini kit (Bio-Rad, США) на спин-колонках согласно прилагаемому протоколу. Концентрацию РНК в полученном образце измеряли на спектрофотометре Bio-Photometer plus (“Eppendorf”, Германия). Для получения кДНК использовали коммерческий набор “MMLV RT Kit” (“Евроген”, Россия): смешивали 0.5–1 мкг тотальной РНК в 20 мкл реакционной смеси. Реакционная смесь инкубировалась в течение 60 мин при 42°C , для остановки реакции смесь прогревали в течение 10 мин при 70°C . ПЦР-РВ проводили в присутствии красителя EVA Green (Синтол, Россия) объемом 20 мкл, содержащей 2 мкл кДНК, 8 мкл $2.5\times$ реакционной смеси, 8 мкл деионизированной воды, 1 мкл MgCl_2 25 мМ, по 0.5 мкл прямого и обратного праймеров с концентрацией 8 пкмоль/мкл (Биосинтез, Новосибирск, Россия). Амплификацию проводили в системе CFX96 (BioRad, США) по следующей схеме: 1) денатурация 95°C – 5 мин; 2) денатурация 95°C – 10 с, отжиг при оптимальной

Таблица 1. Последовательность ген-специфичных олигонуклеотидных праймеров

Ген	Последовательность праймера	Длина ампликона, п.н.	T_m (°C)	Источник
<i>Has2</i>	F: 5'-CTTCCGAGAGTGGCTATACAATGC-3'	198	61	[31]
	R: 5'-GCGAAAGACGACTTGATGAGACC-3'		62	
<i>Hyal2</i>	F: 5'-CGTTACGTCAAGGCAGTCAG-3'	188	59	[32]
	R: 5'-AGGTACACGGAGGGAAAGAG-3'		58	
<i>HPRT1</i>	F: 5'-AGTTTGTGTGGATATGCCCTTG-3'	126	60	[33]
	R: 5'-TGTAGATTCAACTTGCCGCTGTC-3'		61	

температуре для выбранных праймеров (60°C) – 30 с, элонгация 72°C – 20 с, 39 циклов; 3) определение кривых плавления продуктов амплификации в диапазоне температур от 65 до 95°C при шаге в 0.5°C для подтверждения специфичности амплификации и отсутствия димерных праймеров. Ген-специфичные праймеры, синтезированные в группе олигонуклеотидного синтеза Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, представлены в табл. 1. После проведения ПЦР-РВ данные анализировали в пакете программ CFX Manager Software ver. 3.1 (Bio-Rad, США). Каждое измерение нормировали относительно экспрессии гена *HPRT1* и рассчитывали по методу $\Delta\Delta Ct$ [30].

Данные представлены в виде среднего значения \pm ошибки среднего ($M \pm SEM$). Достоверность различий оценивали в программе Statistica 8.0 с помощью апостериорного LSD критерия Фишера для множественных сравнений. Для парного сравнения средних между линиями крыс применялся критерий Стьюдента для независимых выборок. Различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Параметры осмотического концентрирования у контрольных крыс линий WAG и вазопрессин-дефицитных Brattleboro, содержащихся на стандартном водно-пищевом рационе, существенно различались (табл. 2). У крыс WAG установлена низкая скорость мочеотделения, тогда как интактные вазопрессин-дефицитные особи Brattleboro характеризовались полиурией вследствие снижения реабсорбции осмотически свободной воды (табл. 2) при увеличении скорости клубочковой фильтрации (рис. 1). У крыс обеих линий, содержащихся в течение 6 недель в условиях

Таблица 2. Влияние блокады NO (L-NAME) на параметры гидроуретической функции у крыс линий WAG и Brattleboro в условиях моделирования гипотиреоза

Параметр	Экспериментальные группы					
	WAG			Brattleboro		
	контроль	метимазол	метимазол + L-NAME	контроль	метимазол	метимазол + L-NAME
Диурез (V), мкл/мин	1.66 \pm 0.25	1.25 \pm 0.1	2.04 \pm 0.16	31.23 \pm 1.49***	20.32 \pm 1.41###	12.27 \pm 2.89 [^]
Реабсорбция осмотически свободной воды	9.04 \pm 1.1	7.38 \pm 0.3	5.06 \pm 0.61&&	-13.6 \pm 1.5***	-7.4 \pm 1.1##	-1.9 \pm 1.5 [^]
$T_{H_2O}^C$, мкл/мин						

Все значения представлены как $M \pm SEM$. Различия достоверны при *** $p < 0.001$ – сравнение с контрольной группой крыс линии WAG; && $p < 0.01$ – сравнение с гипотиреоидной группой WAG; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ – сравнение с контрольными показателями линии Brattleboro; [^] $p < 0.05$ – сравнение с гипотиреоидной группой крыс линии Brattleboro.

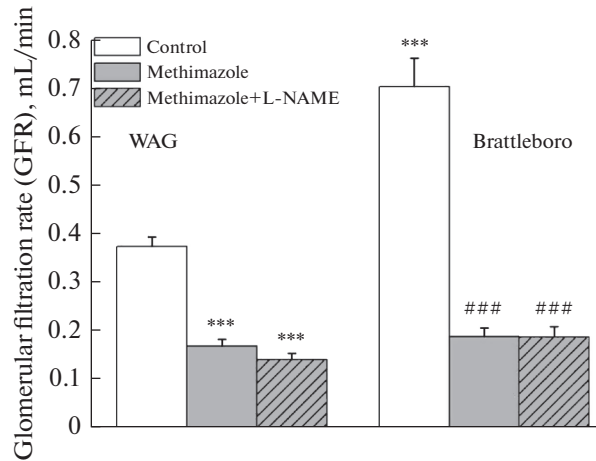


Рис. 1. Скорость клубочковой фильтрации (СКФ) в условиях блокады синтеза NO введением L-NAME на фоне моделирования гипотиреоза у крыс линий WAG и Brattleboro ($M \pm SEM$). Достоверность различий: *** $p < 0.001$ – сравнение с контрольной группой WAG; ### $p < 0.001$ – сравнение с контрольной группой Brattleboro.

подавления метимазолом синтеза ТГ, было выявлено значительное снижение общего уровня тетраодтирониона (Т4) как у крыс WAG (152.6 ± 3.9 нг/мл в контроле; 66.8 ± 13.4 нг/мл при гипотиреозе, $p < 0.001$), так и у крыс Brattleboro (158.5 ± 3.7 нг/мл в контроле; 28.8 ± 8.7 нг/мл при гипотиреозе, $p < 0.001$). Моделирование гипотиреоза вызвало снижение скорости клубочковой фильтрации у крыс обеих линий (рис. 1), тогда как параметры гидроуретической функции почек достоверно изменились лишь у вазопрессин-дефицитной линии Brattleboro (табл. 2). У гипотиреоидных крыс Brattleboro, в отличие от линии WAG, была зафиксирована антидиуретическая реакция: снижение диуреза вследствие увеличения реабсорбции осмотически свободной на фоне замедления скорости клубочковой фильтрации. Вместе с тем устранение действия NO при введении L-NAME на фоне гипотиреоза способствовало у крыс WAG снижению реабсорбции осмотически свободной воды, тогда как у линии Brattleboro, напротив, установлена стимуляция концентрирующей функции почек (табл. 2).

С изменением параметров осмотического концентрирования у экспериментальных крыс коррелируют морфологические перестройки эпителиоцитов собирательных трубок гормон-чувствительной области средней трети сосочка, анализ состояния которых представляет существенный интерес, поскольку высота клеток зависит от осмоляемости интерстициальной и внутриканальцевой жидкости и является отражением изменений уровня осмотического концентрирования. Высота эпителиоцитов собирательных трубок различалась у контрольных групп: у крыс линии WAG эпителий был заметно уплощен (5.51 ± 0.03 мкм) по сравнению с особями линии Brattleboro (5.88 ± 0.04 мкм). У гипотиреоидных крыс WAG при отсутствии изменений параметров гидроуреза высота эпителиоцитов не изменялась (5.51 ± 0.03 мкм в контроле; 5.62 ± 0.04 мкм при гипотиреозе), тогда как блокада синтеза NO на фоне диуретического ответа приводила к увеличению высоты эпителиоцитов собирательных трубок почечной медуллы (6.03 ± 0.06 мкм, $p < 0.001$). Между тем у крыс Brattleboro при гипотиреозе антидиуретическая реакция сопровождалась уплощением эпителиоцитов собирательных трубок (5.88 ± 0.04 мкм в контроле; 4.67 ± 0.04 мкм при

гипотиреозе, $p < 0.001$), которое частично нивелировалось при введении L-NAME (5.44 ± 0.03 мкМ, $p < 0.001$).

Барьер на пути движения воды и солей из почечных канальцев в кровоток представлен не только эпителием, но также внеклеточным матриксом, основным компонентом которого является ГН, разделяющий элементы концентрирующей системы и определяющий скорость диффузии воды и солей по осмотическому градиенту [1, 10]. У контрольных крыс WAG, экскретирующих мочу с осмоляльностью выше 2000 мОсм/кг H_2O , выявлена типичная для высокого уровня секреции вазопрессина структура медуллярной зоны почек: уплощенный эпителий собирательных трубок, открытая дренажная сеть множества капилляров и окрашивание кислых ГАГ интерстиция почечной медуллы (рис. 2а). Между тем гомозиготные вазопрессин-дефицитные крысы Bralleboro, экскретирующие гипотоничную мочу, характеризовались практически полным отсутствием ГАГ в интерстиции гормон-чувствительной части средней трети сосочка почки (рис. 2б).

Подавление синтеза тиреоидной системы при потреблении раствора метимазола сопровождалось структурными перестройками интерстиция почечной медуллы только у крыс WAG с высоким уровнем эндогенного вазопрессина в крови. Согласно качественному гистохимическому анализу у гипотиреоидных крыс WAG, несмотря на отсутствие изменений параметров гидроуреза, установлено увеличение интенсивности окрашивания ГН в интерстиции сосочка по сравнению с контролем (рис. 2с). Качественные изменения экстрацеллюлярного матрикса почки у крыс WAG сопровождалось увеличением содержания мРНК *HAS2* гена, кодирующего фермент синтеза ГН (рис. 3а), в то время как уровень экспрессии гена *Hyal2*, ключевого фермента его катаболизма, увеличился незначительно (рис. 3б). Вместе с тем блокада синтеза NO с помощью L-NAME приводила к восстановлению внеклеточного матрикса до базального эутиреоидного состояния у гипотиреоидных крыс WAG (рис. 2е) в связи со снижением уровня экспрессии *HAS2* в сосочке почки до базальных значений контрольной группы с нормальным уровнем секреции ТГ (рис. 3а). Моделирование гипотиреоза у крыс Brattleboro не вызывало существенных изменений состояния интерстиция почечной медуллы (рис. 2д), несмотря на снижение уровня экспрессии *HAS2* в сосочке почки, устранявшееся при блокаде синтеза NO (рис. 3а). Вместе с тем при введении L-NAME крысам Brattleboro на фоне потребления метимазола не установлено качественных изменений интерстициального матрикса сосочка почки по сравнению с гипотиреоидной группой (рис. 2ф).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В осморегулирующий процесс вовлекается не только эпителий почечных канальцев и сосудистая система почки, но также интерстициальный матрикс, разделяющий элементы концентрирующего механизма и определяющий внеклеточную проницаемость для воды и ионов [1]. Учитывая ранее полученные данные об увеличении содержания ГН в почечной медулле на фоне диуретического ответа и его снижении при дегидратации [34, 35], в последние годы активно обсуждается вопрос о роли внеклеточного матрикса в регуляции диффузии воды между структурами концентрирующего механизма [12, 36]. ТГ участвуют в регуляции осмотического концентрирования, и нарушение уровня их секреции приводит к существенным перестройкам этого процесса вследствие изменений почечной гемодинамики [14] и экскреции солей и воды [16]. Несмотря на прогресс в понимании молекулярных событий, индуцируемых ТГ в эпителии почечных канальцев [37], выявление новых звеньев в регуляции концентрирующей функции почек представляется актуальным, поскольку дает возможность разработки новых подходов к коррекции тубуло-интерстициальных нарушений в почках при дисфункции щитовидной железы.

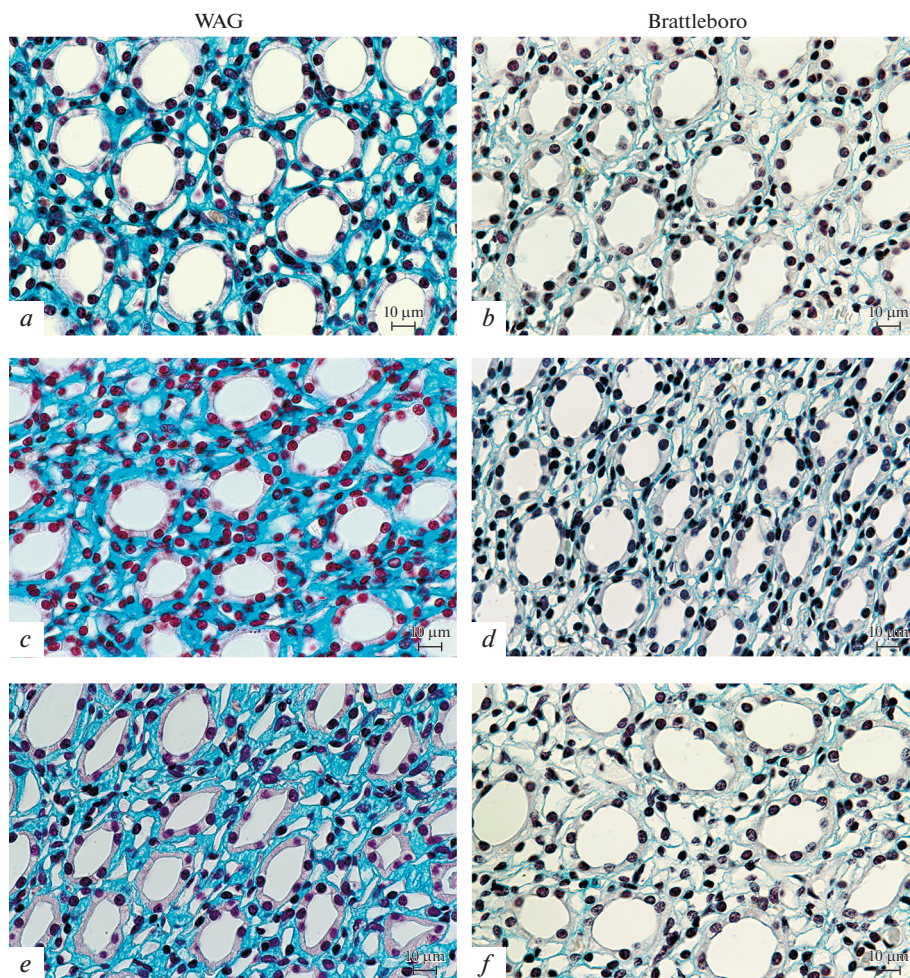


Рис. 2. Локализация гиалуронана (ГН) средней трети сосочка в условиях блокады синтеза NO введенным L-NAME на фоне гипотиреоза у крыс линий WAG и Brattleboro.

(a) – WAG контроль (2050 мОсм/кг H_2O); (b) – Brattleboro контроль (197 мОсм/кг H_2O); (c) – гипотиреотидная группа WAG (2130 мОсм/кг H_2O); (d) – гипотиреотидная группа Brattleboro (300 мОсм/кг H_2O); (e) – гипотиреотидные WAG + L-NAME (1083 мОсм/кг H_2O); (f) – гипотиреотидные Brattleboro + L-NAME (458 мОсм/кг H_2O).

Примечание: в скобках дано значение осмоляльности мочи; окрашивание срезов алциановым синим, увеличение объектива $\times 63$. Снимки выполнены с помощью цифровой фотонасадки AxioCam.

При снижении уровня ТГ повышается чувствительность эпителиоцитов собирательных трубок к вазопрессину, что приводит к усилению реабсорбции воды [38] вследствие увеличения экспрессии AQP1-3 в ткани почки [25, 39]. Как известно, при связывании вазопрессина с V_2 -рецепторами стимулируется по цАМФ-зависимому каскаду транслокация тканеспецифичного белка AQP2 в апикальную мембрану эпителиоцитов собирательных трубок [40]. Вместе с тем при гипотиреозе усиливается секреция тиреотропного гормона (ТТГ), рецепторы к которому экс-

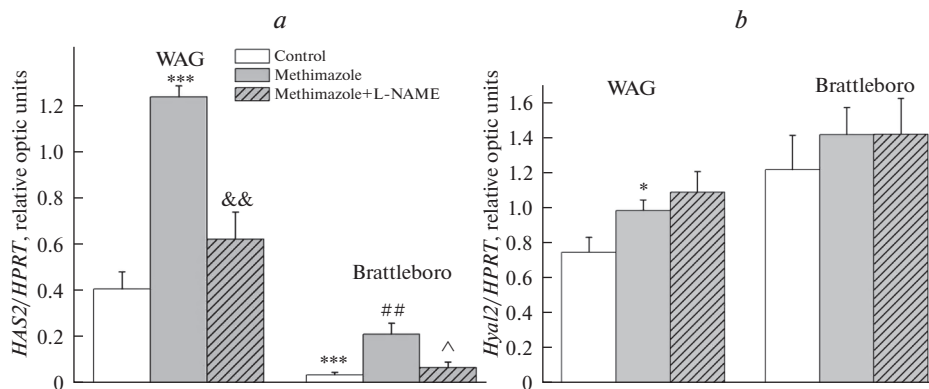


Рис. 3. Влияние блокады синтеза NO (L-NAME) на уровень экспрессии мРНК генов гиалуронансинтазы-2 (*HAS2*) (a), гиалуронидазы-2 (*Hyal2*) (b) в сосочке почки у гипотиреоидных крыс WAG и Brattleboro. Уровень экспрессии мРНК *HAS2*, *Hyal2* приведен относительно гена домашнего хозяйства *HPRT1*. Данные представлены как $M \pm SEM$. Достоверность различий: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ – сравнение с контрольной группой WAG; && $p < 0.01$ – сравнение с гипотиреоидной группой WAG; ## $p < 0.01$ – сравнение с контрольной группой Brattleboro; ^ $p < 0.05$ – сравнение с гипотиреоидной группой крыс линии Brattleboro.

прессуруются в почечной ткани [41] и сопряжены с G_s -белком, стимулирующим цАМФ-путь [42]. Предполагается, что механизм, стимулирующий транскрипцию AQP2 в почечной ткани при гипотиреозе, обусловлен не только увеличением секреции вазопрессина, но также действием ТТГ. В то же время нами было выявлено, что изменения параметров гидроуреза при моделировании гипотиреоза были существенны лишь у крыс линии Brattleboro, лишенных эндогенного вазопрессина. У гипотиреоидных крыс WAG с высоким уровнем вазопрессина в крови параметры гидроуреза оставались на уровне контрольной группы, тогда как у вазопрессина-дефицитных крыс Brattleboro был установлен антидиуретический ответ вследствие усиления реабсорбции осмотически свободной воды. С изменением гидроуретической функции у гипотиреоидных крыс Brattleboro коррелирует реакция эпителия собирательных трубок гормон-чувствительной зоны сосочка: зафиксировано уплотнение эпителиоцитов, обусловленное увеличением гипертоничности внутриканальцевой жидкости [43]. В то же время у крыс WAG в условиях гипотиреоза высота эпителия собирательных трубок не изменялась вследствие отсутствия достоверной реакции диуретической функции и осмоляльности внутриканальцевой жидкости. Следует заметить, что у гипотиреоидных крыс Brattleboro осмотическое концентрирование оставалось на достаточно низком уровне, что, по всей видимости, связано со сниженным базальным уровнем экспрессии AQP2. Известно, что введение крысам Brattleboro агониста V_2R , DDAVP, приводит к увеличению транслокации AQP2 в апикальную мембрану, при этом общее содержание AQP2 в клетке не изменяется [44].

Недостаток гормонов щитовидной железы нередко сопровождается развитием микседемы, которая характеризуется накоплением ГН в межклеточном пространстве [21] и является одной из причин задержки жидкости в организме при гипотиреозе [45, 46]. В почке млекопитающих высокая концентрация ГН характерна для мозговой зоны [47], где в интерстиции почечной медуллы формируется гель, физико-химические свойства которого определяют возможность связывания больших

объемов воды и положительно заряженных ионов [1]. Подавление синтеза ТГ у крыс WAG раствором метимазола приводило к увеличению интенсивности окрашивания ГН интерстиция гормон-чувствительной средней трети сосочка почки. Такая реакция интерстиция у гипотиреоидных крыс WAG может свидетельствовать о количественном росте компонентов внеклеточного матрикса, что подтверждается увеличением в сосочке мРНК *HAS2* вследствие устранения ингибирующего влияния ТГ на экспрессию гена *HAS2*, кодирующего фермент синтеза ГН. В исследованиях *in vitro* на неонатальных фибробластах ранее было найдено, что добавление в среду трийодтиронина (Т3) приводит к подавлению синтеза ГН путем снижения уровня экспрессии *HAS2* [48, 49]. Предполагается, что у крыс WAG в условиях гипотиреоза при нарастании в сосочке почки гистохимически выявляемого ГН формируется барьер на пути диффузии воды из просвета собирательных трубок в почечный кровоток, снижая стимулирующий эффект гипотиреоза на реабсорбцию воды. Одной из наиболее существенных морфологических особенностей почек гомозиготных вазопрессин-дефицитных крыс Brattleboro является снижение плотности ГН в интерстиции почечной медуллы [50], которое, как предполагают, является следствием повышенной гиалуронидазной активности в почечной ткани [10, 51]. Нами было установлено, что подавление синтеза ТГ раствором метимазола не вызывает у крыс Brattleboro качественных изменений состояния интерстиция сосочка почки, несмотря на увеличение мРНК *HAS2*, уровень экспрессии которого, тем не менее, оставался на достаточно низком уровне. Учитывая, что содержание ГН может регулироваться не только на уровне экспрессии генов, а также на посттранскрипционном и посттрансляционном уровне [52], отсутствие качественных изменений внеклеточного матрикса у гипотиреоидных крыс Brattleboro связано, по всей видимости, со сниженной активностью *HAS2*.

При снижении уровня ТГ помимо возникновения синдрома неадекватной секреции вазопрессина, приводящего к гипонатриемии в связи с задержкой воды в организме [19], установлено увеличение уровня NO в сосочке почки [23], который, как известно, является почечным аутокидом, модулирующим процесс осмотического концентрирования [53]. Ранее нами было выявлено, что в модуляцию осморегулирующего эффекта вазопрессина оксидом азота вовлекаются структуры интерстиция почки, реструктуризация которых приводит к модуляции концентрирующей функции почек вследствие изменений внеклеточной диффузии [54]. Установлено, что NO играет существенную роль в преобразованиях почечного интерстиция у крыс WAG в условиях гипотиреоза: введение ингибитора синтеза NO (L-NAME) приводит у крыс WAG к восстановлению внеклеточного матрикса почки до контрольного эутиреоидного состояния. Снижение интенсивности окрашивания альциановым синим ГН у гипотиреоидных крыс WAG в условиях введения L-NAME, вероятно, явилось следствием установленного снижения мРНК *HAS2* до значений контрольной группы. Предполагается, что увеличение уровня NO в условиях подавления синтеза ТГ является ключевым фактором, стимулирующим ферментную активность и уровень экспрессии *HAS2*, способствуя увеличению биосинтеза ГН экстрацеллюлярного матрикса почки у крыс WAG.

Поскольку, как известно, синтез NO в почечной медулле стимулируется вазопрессинном [55], представляло интерес сравнить морфофункциональные особенности почек крыс WAG и вазопрессин-дефицитных особей Brattleboro в условиях блокады синтеза NO с помощью введения L-NAME на фоне гипотиреоза. У крыс Brattleboro при гипотиреозе введение L-NAME не приводило к качественным изменениям внеклеточного матрикса сосочка почки, что, по-видимому, явилось следствием сниженного базального уровня активности синтеза NO в сосочке почки у данной линии крыс [56]. Отсутствие существенных качественных изменений интерстиция почки у крыс Brattleboro при введении L-NAME на фоне гипотиреоза

предполагает важность вазопрессин-зависимого механизма в регуляции оксидом азота внеклеточной проницаемости почечной медуллы при подавлении синтеза ТГ.

Таким образом, результаты исследований позволяют заключить, что ключевую роль в нарастании содержания ГН в интерстициальном матриксе почечной медуллы в условиях гипотиреоза играет NO, базальная активность которого в сосочке почки зависит от уровня эндогенного вазопрессина в крови.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 20-04-00298 А), а также за счет средств бюджетного финансирования по государственному заданию № FWNR-2022-0007. Авторы благодарны Центру коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН (<http://www.bionet.nsc.ru/microscopy/>) за предоставленное оборудование.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы (Л.Н.И.), планирование эксперимента (Л.Н.И., П.Д.П.), сбор данных (П.Д.П.), обработка данных (П.Д.П.), написание манускрипта (Л.Н.И., П.Д.П.), редактирование манускрипта (Л.Н.И.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Stridh S, Palm F, Hansell P* (2012) Renal interstitial Hyaluronan: functional aspects during normal and pathological conditions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 302: R1235–R1249. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00332.2011>
2. *Lee JY, Spicer AP* (2000) Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Curr Opin Cell Biol* 12(5): 581–586. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00135-6](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00135-6)
3. *Cowman MK* (2017) Hyaluronan and Hyaluronan Fragments. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 74: 1–59. <https://doi.org/10.1016/bs.accb.2017.10.001>
4. *Laurent TC, Laurent UB, Fraser JR* (1996) The structure and function of Hyaluronan: An overview. *Immunol Cell Biol* 74: A1–A7. <https://doi.org/10.1038/icb.1996.32>
5. *Itano N* (2008) Simple Primary Structure, Complex Turnover Regulation and Multiple Roles of Hyaluronan. *J Biochem* 144: 131–137. <https://doi.org/10.1093/jb/mvn046>
6. *Erickson M, Stern R* (2012) Chain gangs: new aspects of hyaluronan metabolism. *Biochem Res Int* 2012: 893947. <https://doi.org/10.1155/2012/893947>
7. *Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, Engel A, Nielsen S* (2002) Aquaporin water channels—from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol* 542(1): 3–16. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.020818>
8. *Ivanova LN, Melidi NN* (2001) Effects of vasopressin on hyaluronate hydrolase activities and water permeability in the frog urinary bladder. *Pflugers Arch* 443: 72–77. <https://doi.org/10.1007/s004240100575>
9. *Dzgoev SG* (2015) Selective V₂-Agonist of Vasopressin Desmopressin Stimulates Activity of Serum Hyaluronidase. *Bull Exp Biol Med* 159(4): 424–426. <https://doi.org/10.1007/s10517-015-2981-y>
10. *Ivanova LN, Babina AV, Baturina GS, Katkova LE* (2013) Effect of vasopressin on the expression of genes for the key enzymes of hyaluronan turnover in WAG and Brattleboro rat kidney. *J Exp Physiol* 98(11): 1608–1619. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2013.073163>

11. *Rügheimer L, Johnsson C, Maric C, Hansell P* (2008) Hormonal regulation of renomedullary hyaluronan. *Acta Physiol (Oxf)* 193: 191–198.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2007.01795.x>
12. *Stridh S, Palm F, Takahashi T, Ikegami-Kawai M, Friederich-Persson M, Hansell P* (2017) Hyaluronan Production by Renomedullary Interstitial Cells: Influence of Endothelin, Angiotensin II and Vasopressin. *Int J Mol Sci* 18(12): 2701.
<https://doi.org/10.3390/ijms18122701>
13. *Pinter GG, Shoheit JL* (2009) An inner medullary concentrating process activated by renal pelvicalyceal muscle contractions: assessment and hypothesis. *J Nephrol Physiol* 113: 1–6.
<https://doi.org/10.1159/000228082>
14. *den Hollander JG, Wulkan RW, Mantel MJ, Berghout A* (2005) Correlation between severity of thyroid dysfunction and renal function. *Clin Endocrinol* 62: 423–427.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2005.02236.x>
15. *Mariani LH, Berns JS* (2012) The renal manifestations of thyroid disease. *J Am Soc Nephrol* 23(1): 22–26.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2010070766>
16. *Iglesias P, Bajo MA, Selgas R, Diez JJ* (2009) Thyroid dysfunction and kidney disease. *Eur J Endocrinol* 160: 503–515.
<https://doi.org/10.1007/s11154-016-9395-7>
17. *Vargas F, Moreno JM, Rodriguez-Gomez I, Wangenstein R, Osuna A, Alvarez Guerra M, Garcia-Estan J* (2006) Vascular and renal function in experimental thyroid disorders. *Eur J Endocrinol* 2: 197–212.
<https://doi.org/10.1530/eje.1.02093>
18. *Skowsky WR, Kikuchi TA* (1978) The role of vasopressin in the impaired water excretion of myxedema. *Am J Med* 64(4): 613–621.
[https://doi.org/10.1016/0002-9343\(78\)90581-8](https://doi.org/10.1016/0002-9343(78)90581-8)
19. *Chen YC, Cadnapaphornchai MA, Yang J, Summer SN, Falk S, Li C, Wang W, Schrier RW* (2005) Nonosmotic release of vasopressin and renal aquaporins in impaired urinary dilution in hypothyroidism. *Am J Physiol: Renal Physiol* 289: 672–678.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00384.2004>
20. *Menzinger S, Kaya A, Saurat JH, Kaya G* (2016) Injected Hyaluronidase Reduces the Volume of Exogenous Hyaluronate Fillers in Mice and Results in Clinical Improvement in a Patient with Pretibial Myxedema. *Dermatopathology (Basel)* 3(3): 61–67.
<https://doi.org/10.1159/000446699>
21. *Hoesly PM, Tolaymat LM, Sluzevich JC, Keeling JH* (2018) Pretibial myxedema successfully treated with intralesional hyaluronidase. *JAAD Case Rep* 4(9): 874–876.
<https://doi.org/10.1016/j.jdcr.2018.08.018>
22. *Leipzig J, Praetorius H* (2020) Renal Autocrine and Paracrine Signaling: A Story of Self-protection. *Physiol Rev* 100(3): 1229–1289.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2019>
23. *Sarati LI, Toblli JE, Martinez CR, Uceda A, Feldman M, Balaszczuk AM, Fellet AL* (2013) Nitric oxide and aqp2 in hypothyroid rats: A link between aging and water homeostasis. *Metabolism* 62: 1287–1295.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.04.013>
24. *Valtin H, Schroeder HA* (1997) Familial hypothalamic diabetes insipidus in rats (Brattleboro rat). 1964 [classical article]. *J Am Soc Nephrol* 8: 1333–1341.
<https://doi.org/10.1681/ASN.V881333>
25. *Schmitt R, Klussmann E, Kahl T, Ellison DH, Bachmann S* (2003) Renal expression of sodium transporters and aquaporin-2 in hypothyroid rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: 1097–1104.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00368.2002>
26. *Rong S, Gao Y, Yang Y, Shao H, Okeunle AP, Lv C, Du Y, Sun H, Jiang Y, Darko GM, Sun D* (2018) Nitric oxide is involved in the hypothyroidism with significant morphology changes in female Wistar rats induced by chronic exposure to high water iodine from potassium iodate. *Chemosphere* 206: 320–329.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.015>
27. *Zhou J, Cheng G, Pang H, Liu Q, Liu Y* (2018) The effect of 131I-induced hypothyroidism on the levels of nitric oxide (NO), interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), total nitric oxide synthase (NOS) activity, and expression of NOS isoforms in rats. *Bosn J Basic Med Sci* 18(4): 305–312.
<https://doi.org/10.17305/bjbm.2018.2350>
28. *Tain YL, Huang LT, Lee CT, Chan JY, Hsu CN* (2015) Maternal citrulline supplementation prevents prenatal NG-nitro-l-arginine-methyl ester (l-NAME)-induced programmed hyperten-

- sion in rats. *Biol Reprod* 92: 1–7.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.121384>
29. *Bancroft JD, Gamble M, Jones ML, Totty BA* (2004) Theory and practice of histological techniques. Connective tissues and stains, 15th edn. Churchill Livingstone Publications 139–200.
 30. *Bookout AL, Cummins CL, Mangelsdorf DJ, Pesola JM, Kramer MF* (2006) High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR. *Curr Protoc Mol Biol* 15: Unit 15.8.
<https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1508s73>
 31. *Ivanova LN, Babina AV, Baturina GS, Katkova LE* (2017) The effect of vasopressin on the expression of genes of key enzymes of the interstitial hyaluronan turnover and concentration ability in WAG rat kidneys. *Russ J Genet Appl Res* 7: 249–257.
<https://doi.org/10.1134/S2079059717030066>
 32. *Rügheimer L, Olerud J, Johnsson C, Takahashi T, Shimizu K, Hansell P* (2009) Hyaluronan synthases and hyaluronidases in the kidney during changes in hydration status. *Matrix Biol* 28: 390–395.
<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2009.07.002>
 33. *Kabilova NO, Bondar AA, Ivanova LN* (2009) Expression of type II hyaluronan-synthase gene in kidneys Wistar and Brattleboro rats with diabetes insipidus: effect of vasopressin and its analogues. *Dokl Biochem Biophys* 425: 61–64.
<https://doi.org/10.1134/S160767290902001X>
 34. *Hansell P, Göransson V, Odland C, Gerdin B, Hällgren R* (2000) Hyaluronan content in the kidney in different states of body hydration. *Kidney Int* 58(5): 2061–2068.
<https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2000.00378.x>
 35. *Göransson V, Johnsson C, Nylander O, Hansell P* (2002) Renomedullary and intestinal hyaluronan content during body water excess: a study in rats and gerbils. *J Physiol* 542(Pt 1): 315–322.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.014894>
 36. *Colombaro V, Jaodot I, Declèves AE, Voisin V, Giordano L, Habsch I, Malaisse J, Flamion B, Caron N* (2015) Lack of hyaluronidases exacerbates renal post-ischemic injury, inflammation, and fibrosis. *Kidney Int* 88: 61–71.
<https://doi.org/10.1038/ki.2015.53>
 37. *Iglesias P, Bajo MA, Selgas R, Díez JJ* (2017) Thyroid dysfunction and kidney disease: An update. *Rev Endocr Metab Disord* 18(1): 131–144.
<https://doi.org/10.1007/s11154-016-9395-7>
 38. *Hanna FW, Scanlon MF* (1997) Hyponatraemia, hypothyroidism, and role of arginine-vasopressin. *Lancet* 350(9080): 755–756.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)62563-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)62563-9)
 39. *Yeum CH, Kim SW, Kim NH, Choi KC, Lee J* (2002) Increased expression of aquaporin water channels in hypothyroid rat kidney. *Pharmacol Res* 46: 85–88.
[https://doi.org/10.1016/S1043-6618\(02\)00036-1](https://doi.org/10.1016/S1043-6618(02)00036-1)
 40. *Fenton RA, Murali SK, Moeller HB* (2020) Advances in Aquaporin-2 trafficking mechanisms and their implications for treatment of water balance disorders. *Am J Physiol Cell Physiol* 319(1): C1–C10.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00150.2020>
 41. *Sellitti DF, Akamizu T, Doi SQ, Kim GH, Kariyil JT, Kopchik JJ, Koshiyama H* (2000) Renal expression of two ‘thyroid-specific’ genes: thyrotropin receptor and thyroglobulin. *Exp Nephrol* 8: 235–243.
<https://doi.org/10.1159/000020674>
 42. *Boutin A, Krieger CC, Marcus-Samuels B, Klubo-Gwiedzinska J, Neumann S, Gershengorn MC* (2020) TSH Receptor Homodimerization in Regulation of cAMP Production in Human Thyrocytes *in vitro*. *Front Endocrinol (Lausanne)* 11: 276.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00276>
 43. *Bhave G, Neilson EG* (2011) Body fluid dynamics: back to the future. *J Am Soc Nephrol* 22(12): 2166–2181.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2011080865>
 44. *Christensen BM, Zelenina M, Aperia A, Nielsen S* (2000) Localization and regulation of PKA-phosphorylated AQP2 in response to V(2)-receptor agonist/antagonist treatment. *Am J Physiol Renal Physiol* 278(1): F29–F42.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.2000.278.1.F29>
 45. *Smith TJ, Bahn RS, Gorman CA* (1989) Connective tissue, glycosaminoglycans, and diseases of the thyroid. *Endocr Rev* 10(3): 3663–3691.
<https://doi.org/10.1210/edrv-10-3-366>
 46. *Wiederhielm CA, Black LL* (1976) Osmotic interaction of plasma proteins with interstitial macromolecules. *Am J Physiol* 231(2): 638–641.
<https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1976.231.2.638>

47. *Mcauliffe WG* (1980) Histochemistry and ultrastructure of the interstitium of the renal papilla in rats with hereditary diabetes insipidus (Brattleboro strain). *Am J Anat* 157(1): 17–26.
<https://doi.org/10.1002/aja.1001570103>
48. *Pouyani T, Sadaka BH, Papp S, Schaffer L* (2013) Triiodothyronine (T3) inhibits hyaluronate synthesis in a human dermal equivalent by downregulation of HAS2. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 49(3): 178–188.
<https://doi.org/10.1007/s11626-013-9583-7>
49. *Deshpande M, Papp S, Schaffer L, Pouyani T* (2015) Hydrocortisone and triiodothyronine regulate hyaluronate synthesis in a tissue-engineered human dermal equivalent through independent pathways. *J Biosci Bioeng* 119(2): 226–236.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.08.001>
50. *Ivanova LN, Lavrinenko VA, Shestopalova LV, Korotkova SM* (2007) Structural and functional changes in epitheliocytes of collecting tubes in renal papilla of Brattleboro rats treated with vasopressin. *Bull Exp Biol Med* 143(1): 94–98.
<https://doi.org/10.1007/s10517-007-0026-x>
51. *Ivanova LN, Goryunova TE, Nikiforovskaya LF, Tishchenko NI* (1982) Hyaluronate hydrolase activity and glycosaminoglycans in the Brattleboro rat kidney. *Ann NY Acad Sci* 394: 503–508.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1982.tb37462.x>
52. *Tammi RH, Passi AG, Rilla K, Karousou E, Vigetti D, Makkonen K, Tammi MI* (2011) Transcriptional and post-translational regulation of hyaluronan synthesis. *FEBS J* 278: 1419–1428.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08070.x>
53. *Bouley R, Hasler U, Lu HA, Nunes P, Brown D* (2008) Bypassing vasopressin receptor signaling pathways in nephrogenic diabetes insipidus. *Semin Nephrol* 28: 266–278.
<https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2008.03.010>
54. *Pravikova PD, Lavrinenko VA, Ivanova LN* (2019) Effect of NO Synthesis Blockade on the Hydrouretic Function and Extracellular Matrix of the Kidneys in Rats with Different Blood Vasopressin Levels. *Bull Exp Biol Med* 167(2): 233–236.
<https://doi.org/10.1007/s10517-019-04498-w>
55. *O'Connor PM, Cowley AW Jr* (2007) Vasopressin-induced nitric oxide production in rat inner medullary collecting duct is dependent on V2 receptor activation of the phosphoinositide pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* 293(2): F526–F532.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00052.2007>
56. *Martin PY, Bianchi M, Roger F, Niksic L, Féraille E* (2002) Arginine vasopressin modulates expression of neuronal NOS in rat renal medulla. *Am J Physiol Renal Physiol* 283(3): F559–F568.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00309.2001>

Role of Nitric Oxide (NO) in the Mechanisms of Structural Changes in the Renal Medullary Interstitium under Conditions of Hypothyroidism in Rats with Different Blood Vasopressin Levels

P. D. Pravikova^a, * and L. N. Ivanova^a

^a*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

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

The role of nitric oxide (NO), renal autocoid, in the mechanisms of structural changes in the renal medullary interstitium, affecting the extracellular permeability for water and ions, was studied in WAG rats with high blood vasopressin (AVP) level and AVP-deficient Brattleboro rats under conditions of hypothyroidism. No significant changes in the parameters of the renal hydruretic function were observed in hypothyroid WAG rats, while in Brattleboro rats an antidiuretic response was established due to activation of solute-free water reabsorption. It is assumed that the absence of changes in the parameters of hydruresis in WAG rats with hypothyroidism is due to the increase of the main component of the extracellular matrix content in the renal medulla, hyaluronan (HA), which forms a barrier to the diffusion of water and ions. At the same time, in Brattleboro rats, the stimulation of the concentrating renal function during hypothyroidism modeling is not accompanied by significant structural changes in the extracellular matrix, which in the

intact state is characterized by the almost total absence of HA in this strain. It was found that NO plays a significant role in changing the structure of the renal interstitium in WAG rats under conditions of hypothyroidism. Blockade of NO synthesis with L-NAME leads to the elimination of changes in the extracellular matrix of the renal papilla revealed during hypothyroidism due to a change in the level expression of gene hyaluronan synthase-2 (*HAS2*) encoding the main enzyme catalyzing the synthesis of HA, to the basal values of the control group. The results allow us to conclude that hypothyroidism leads to an increase in the content of HA in the renal medullary interstitium, and the key role in the manifestation of this effect is played by NO, the basal activity of which in the renal papilla depends on the blood AVP level.

Keywords: hyaluronan, hypothyroidism, nitric oxide, vasopressin, water reabsorption, WAG, Brattleboro

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

АНАЛИЗ ОРЕКСИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ГИПОТАЛАМУСА
У КРЫС С РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ ГЕНЕТИЧЕСКИ
ОБУСЛОВЛЕННОЙ ЭПИЛЕПСИИ

© 2022 г. И. Ю. Морина¹, А. Л. Михрина¹, Е. В. Михайлова¹, С. И. Ватаев¹,
З. Р. Хисматуллина², И. В. Романова^{1, *}

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

²Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

*E-mail: irinaromanova@mail.ru

Поступила в редакцию 27.09.2022 г.

После доработки 06.10.2022 г.

Принята к публикации 12.10.2022 г.

Проведено исследование гипоталамуса у половозрелых самцов двух линий крыс с генетической предрасположенностью к различным формам эпилептической активности: линия Крушинского–Молодкиной (КМ) с аудиогенной судорожной активностью и линия WAG/Rij с абсансной эпилепсией. Результаты ПЦР демонстрируют у крыс КМ повышенный уровень мРНК D1- и D2-рецепторов дофамина, у крыс WAG/Rij не выявлено отличий в уровне экспрессии D1-рецепторов, но показано достоверно меньший уровень мРНК D2 рецепторов по сравнению с крысами Вистар. У крыс КМ и WAG/Rij выявлен более высокий уровень мРНК препро-орексина и белка орексиона-А в нейронах перифорникальной области. У крыс КМ не обнаружено отличий в уровне экспрессии орексиновых рецепторов, а у крыс WAG/Rij уровень мРНК OX2R был выше, чем у крыс Вистар. Полученные данные обсуждаются в связи с участием орексиnergической системы мозга в регуляции дофаминергической системы и энергетического баланса организма при эпилептической активности, а также вероятной функции орексинов как факторов адаптации при патологических состояниях.

Ключевые слова: гипоталамус, орексин, орексиновые рецепторы, дофамин, дофаминовые рецепторы, аудиогенная и абсансная эпилепсия

DOI: 10.31857/S0869813922110073

Гипоталамус – отдел мозга, который участвует в регуляции висцеральных функций, в контроле адаптивных реакций организма как при изменении внешних воздействий, так и при патологических состояниях [1]. Нейроны гипоталамуса проецируются в различные области мозга и выполняют интегративную роль. Одной из функций гипоталамуса является контроль энергетического баланса организма [2, 3]. В реализацию этой функции вовлечены различные типы гипоталамических нейронов, в частности вырабатывающие орексины [4–6].

Орексины (А и В) – два нейропептида, которые образуются из общей молекулы препро-орексиона [4, 5]. В мозге экспрессия препро-орексиона осуществляется преимущественно в гипоталамусе в нейронах перифорникальной области. Эффекты орексинов опосредуются двумя типами G-протеин-связанных рецепторов: первого (OX1R) и второго (OX2R) типа [7–9]. Показано, что OX1R селективен только

для орексина-А, а через OX2R осуществляют действие оба типа орексинов [4, 5]. Отростки орексинергических нейронов и рецепторы орексинов выявлены в различных областях мозга (гипоталамусе, таламусе, гиппокампе, ядрах среднего мозга, префронтальной коре, ядрах шва и др.), что свидетельствует об участии орексинов в регуляции различных функций мозга [10, 11]. Общеизвестно, что орексины вовлечены в регуляцию пищевого поведения, энергетического баланса, бодрствования и пробуждения [4, 5, 12, 13], иммунного ответа [14–16] и др.

Тесные морфофункциональные взаимосвязи выявлены между орексинергическими нейронами гипоталамуса и моноаминергическими системами мозга. Проекции орексинергических нейронов, OX1R и OX2R обнаружены в дофаминергических структурах среднего мозга [17], в телах орексин-иммунопозитивных нейронов выявлены рецепторы к дофамину [18]. В связи с этим можно предположить, что дисбаланс дофамина, развивающийся при различных патологиях, должен оказывать влияние и на функциональную активность орексинергической системы гипоталамуса.

Эпилепсия – неврологическое заболевание, которое широко распространено в обществе и является большой проблемой современной медицины. Этиология эпилепсии чрезвычайно разнообразна. При этом некоторые формы эпилепсии связывают с дисбалансом моноаминов, в частности дофамина [19–21]. В экспериментальных исследованиях на животных распространены фармакологические подходы, моделирующие эпилептическую активность. Однако существуют и естественные модели животных с генетической предрасположенностью к развитию эпилептической активности. Исследование таких животных необходимо для разработки подходов возможной фармакологической коррекции этих форм патологии.

Крысы линии Крушинского–Молодкиной (КМ) характеризуются генетической предрасположенностью к аудиогенной судорожной активности. Максимальная судорожная готовность у крыс КМ формируется к 3-месячному возрасту [22], проявляясь в виде однофазных или двухфазных генерализованных клонико-тонических судорожных припадков продолжительностью от 1.5 до 2.5 мин [22–25]. Обнаружено, что структурой мозга, где осуществляется запуск судорожной активности, в частности у крыс с наследственной предрасположенностью к аудиогенным судорогам, являются нижние бугры четверохолмия [26, 27], а дофаминергические нейроны черной субстанции, контролирующей двигательную активность, вовлечены в развертывание судорог [26].

Крысы линии Wistar Albino Glaxo rats, выведенной в Нидерландах в городе Rijswijk (WAG/Rij), являются моделью генетической генерализованной абсансной эпилептиформной активности. Причиной абсансной эпилепсии являются спонтанные пик-волновые комплексы (ПВК), которые инициируются в глубоких слоях соматосенсорной коры больших полушарий [28, 29], быстро распространяются в кортикально-таламокортикальную сеть [30, 31]. У крыс линии WAG/Rij первые ПВК начинают появляться в возрасте 2–3 мес. и полностью разворачиваются к 5–6 мес. За один день у крыс могут развиться сотни ПВК с частотой 7–10 Гц. Были обнаружены ПВК нескольких типов: тип 1 (7.5–9.5 Гц длительностью 3–4 с) и тип 2 (частота 8 Гц длительностью около 1 с), которые спонтанно возникают в корковой ЭЭГ [29, 32]. Известно, что в популяции крыс WAG/Rij встречаются особи со смешанной формой эпилепсии: в дополнение к абсансной проявляется и аудиогенная эпилептиформная активность [33].

Развитие абсансной эпилепсии у человека связывают, в частности, с мутацией гена, кодирующего субъединицу GABA-A рецептора [34, 35]. Нарушение функционирования системы GABA, связанное с дефицитом нейротрансмиттера, отмечается в ряде структур мозга как у крыс WAG/Rij [36], так и у крыс КМ [37, 38]. Также у крыс КМ и WAG/Rij в различных отделах головного мозга отмечается дисбаланс

моноаминов по сравнению с крысами Вистар [39–43]. Однако эти данные получены на разных возрастных группах животных, при этом не было проведено анализа состояния орексинергической и дофаминергической систем в гипоталамусе.

Гипоталамус не является структурой мозга, непосредственно вовлеченной в генерацию эпилептической активности. Однако изменения в функционировании различных его систем при таких патологиях может носить адаптивный характер. Цель настоящего исследования состояла в том, чтобы в гипоталамусе провести анализ уровня орексина и орексиновых рецепторов у крыс с различными формами эпилептической активности (крысы линий КМ и WAG/Rij), а также сопоставить полученные данные с характером изменения в гипоталамусе активности дофаминергической системы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты были выполнены согласно дизайну исследования, одобренному Этическим комитетом Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, European Communities Council Directive 1986 (2010/63/ЕЕС) и согласно правилам, изложенным в “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”. Объектом исследований были самцы крыс КМ (возраст 4.5 мес.) аутбредной популяции, которая поддерживается в виварии Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН [25]. У крыс КМ в 3-месячном возрасте были подтверждены двухфазные генерализованные клонико-тонические судорожные припадки в ответ на звуковое воздействие (синусоидальный тон частотой 8 кГц, интенсивность 90 дБ). Контролем для крыс КМ служили нечувствительные к действию указанной звуковой стимуляции самцы крыс Вистар (4.5 мес.).

Также для исследования использованы самцы крыс WAG/Rij (6.5–7 мес.), популяция которых поддерживается в виварии Башкирского государственного университета. У использованных для исследования крыс WAG/Rij ПВК эпилептиформная активность была предварительно подтверждена энцефалографически с помощью подкожно вживляемых электродов. Отсутствие у этих крыс генерализованных судорожных припадков проверяли, предъявляя им звуковой стимул с указанными выше параметрами. Контролем для крыс WAG/Rij были самцы крыс Вистар того же возраста, у которых в ответ на действие звука аудиогенные эпилептиформные припадки не проявлялись.

Эксперименты проводили с 9:00 до 10:00 ч. После наркоза хлоралгидратом (400 мг/кг, внутривенно) крыс декапитировали, извлекали мозг и 1) либо замораживали в сухом льду, $n = 7–8$ в каждой группе; 2) либо погружали в 4%-ный раствор параформальдегида, разведенного на 0.2 М фосфатном буфере (PB, pH 7.4), для иммуногистохимических исследований ($n = 5$ в каждой группе).

Из замороженного мозга в криостате (при -20°C для избежания разморозки) во фронтальной плоскости вырезали область с гипоталамусом по координатам атласа мозга крысы [44] и делили ее вдоль на две половины: одну использовали для определения катехоламинов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), вторую половину – для анализа уровня экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени. У крыс Вистар и WAG/Rij для анализа уровня экспрессии генов также вырезали область префронтальной коры, которая, как известно, вовлечена в развитие абсансной эпилепсии.

Уровень дофамина (ДА) и его метаболита диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) определяли методом обращеннофазной ВЭЖХ с электрохимической детекцией на хроматографе Beckman Coulter (США) [45]. Протокол приготовления проб и условий детекции подробно описан ранее [46]. Конечная концентра-

Таблица 1. Характеристики праймеров, использованных для ПЦР в “реальном времени”

Ген	Положение	Последовательность (5'–3')	Длина продукта, пн	NCBI номер
<i>pOX</i>	F	GTTCCTGCCGTCTCTACGA	72	NM_013179.2
	R	GCTTCCCAGAGTGAGGATG		
<i>Ox1r</i>	F	TGCGGCCAACCCSTATCATCTA	137	NM_013064.1
	R	ACCGGCTCTGCAAGGACAA		
<i>Ox2r</i>	F	ACTGTCTACGCCTGGTTCAC	183	NM_013074.1
	R	CTCTGTACTTGTGCGTCCCC		
<i>D1r</i>	F	ACATCTGGGTAGCCTTTGACATC	76	NM_012546.3
	R	TACCTGTCCACGCTGATCACG		
<i>D2r(L)</i>	F	GCAGCAGTCGAGCTTTCAGA	124	NM_012547.1
	R	CGCCTGTTCACTGGGAAACT		
<i>Gapdh*</i>	F	GTGTTCCATACCCCAATGTATCC	74	NM_017008.4
	R	GATGTCATCATACTTGGCAGGTTT		

* – контрольный ген (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase).

ция ДА и ДОФУК выражена в процентах относительно соответствующего уровня у крыс Вистар (100%).

Для оценки экспрессии генов, кодирующих препро-орексин (pOX), рецепторы орехина (OX1R и OX2R) и дофамина (D1R, D2R – Lage form) использовали количественную ПЦР в реальном времени. Тотальную РНК выделяли из ткани гипоталамуса с помощью TRI-reagent (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. Чистоту ($A_{260}/A_{280} \geq 1.6$) и концентрацию РНК определяли с помощью “Nanophotometer C40” (Implen, Германия). Синтез обратной транскрипции (ОТ) проводили с помощью ОТ MMLV RT kit (Evrogen, Россия) с 1 мкг тотальной РНК по инструкции производителя. Амплификацию проводили в смеси (25 мкл), содержащей 10 нг ОТ-продукта, по 0.4 мкМ прямого (F – forward) и обратного (R – reverse) праймеров (табл. 1), qPCRmix-HS SYBR + LowROX (“Евроген”, Россия) в 96-луночных ПЦР-планшетах (в триплетах) с помощью прибора “7500 Real-Time PCR System” (“Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc.”, США). Протокол циклов амплификации ранее был подробно описан [47]. Для количественной оценки относительного уровня мРНК использовали метод delta-delta Ct.

Чистоту ПЦР-продукта проверяли с помощью электрофореза в 30%-ном агарозном геле с бромистым этидием. Свечение продукта в геле анализировали с помощью гель-документирующей системы (Chemidoc, Biorad, Великобритания).

Для иммуногистохимических исследований мозг фиксировали в течение 4 сут (4°C), далее промывали в 0.02 М фосфатном буфере с 0.9% NaCl (PBS, pH 7.4) и после криопротекции в 30%-ном растворе сахарозы, растворенной в PBS, замораживали при –42°C с помощью изопентана. Чередующиеся серии фронтальных срезов (20 мкм) из ткани гипоталамуса с перифорникальной областью [44] изготавливали с помощью криостата (Leica CM-1510, Германия). Каждый одиннадцатый срез монтировали на стекла SuperFrost/plus (Menzel, Германия), высушивали и хранили при –20°C. Перед проведением иммуногистохимических реакций стекла высушивали, промывали в PBS, кипятили 5 мин в цитратном буфере (pH 6.0) для демаскировки антигена, промывали в PBS, в течение 30 мин обрабатывали 0.6%-ной перекисью водорода, разведенной в PBS. После промывки в PBS с 0.1% Triton X-100 (PBST) срезы инкубировали 1 ч при комнатной температуре в блокирующем растворе (2% сыворотки быка и 3% сыворотки козы, разведенные в PBST) для предотвращения неспецифического связывания. Срезы инкубировали 48 ч при

4°C с первичными антителами кролика к орексину-А (Sigma, США) в разведении 1 : 1000 на 2%-ном блокирующем растворе. После тщательной промывки срезы инкубировали 1 ч при комнатной температуре со вторичными Ig козы против кролика, конъюгированными с биотином (“VectorLabs”, США), разведенные 1 : 600 в PBST. Стекла тщательно промывали и наносили комплекс стрептовидин–пероксидаза (Sigma, США) в разведении 1 : 1000 на PBS. Визуализацию проводили с помощью 0.05%-ного раствора диаминобензидина (Sigma, США) и 0.015%-ного раствора перекиси водорода. Реакцию останавливали дистиллированной водой и после тщательной промывки и стандартной гистологической обработки срезы заключали под покровное стекло и высушивали. Изображения получали с помощью микроскопа “Carl Zeiss” Axio A1 (Германия) со встроенной телевизионной камерой и программы Axio-Vision 4.8. С помощью программы Image J на каждом из снимков (8–10 для каждого животного) в нейронах определяли оптическую плотность орексина-А в условных единицах (у. е.).

Статистический анализ данных биохимических и иммуногистохимических исследований выполнен с помощью программы STATISTICA.10, при уровне значимости $p < 0.05$. Оценку нормальности распределения данных проводили с использованием теста D’Agostino–Pearson. Сравнение двух независимых групп проводилось с помощью U-критерия Манна–Уитни. Результаты представлены как медиана (М) 50% данных с интерквартильными размахами. Статистический анализ результатов ПЦР выполняли с помощью программного обеспечения “GraphPad Prism 7” (“GraphPad Software”, США). Оценку нормальности распределения данных проводили с использованием теста D’Agostino–Pearson. В случае нормального распределения ($\alpha = 0.05$) различия между группами оценивали с помощью непарного t -теста и рассматривали как статистически значимые при $p < 0.05$. Результаты ПЦР представлены как $M \pm SEM$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У крыс КМ с наследственной предрасположенностью к аудиогенной эпилептиформной активности в гипоталамусе отмечался более высокий уровень дофамина $M = 577$ (379; 693) и ДОФУК $M = 160$ (120; 180) по сравнению с крысами Вистар соответственно $M = 100$ (69; 314), $p < 0.05$ и $M = 100$ (80; 120), $p < 0.05$. Таким образом, катаболический коэффициент ДОФУК/ДА крыс КМ $M = 0.29$ (0.17; 0.27) по сравнению с крысами Вистар $M = 1.0$ (0.56; 1.4) был снижен ($p < 0.05$).

Результаты ПЦР демонстрируют в гипоталамусе повышенный уровень мРНК D1- (в 3.5 раза, $p < 0.05$) и D2-рецепторов дофамина (в 5.3 раза, $p < 0.05$) по сравнению с крысами Вистар (рис. 1а). Полученные данные свидетельствуют о том, что дофаминергическая система в гипоталамусе крыс КМ находится в более активном состоянии по сравнению с крысами Вистар.

Результаты ПЦР демонстрируют в гипоталамусе крыс КМ более высокий уровень мРНК препро-орексина (в 2 раза, $p < 0.05$) по сравнению с крысами Вистар, при этом не выявлено отличий в уровне мРНК OX1R и OX2R (рис. 1а).

Анализ орексин-А-иммунопозитивных нейронов перифорникальной области гипоталамуса на препаратах мозга свидетельствует о более интенсивной реакции в телах нейронов и отростках у крыс КМ по сравнению с крысами Вистар (рис. 2а, 2б). Количественный анализ демонстрирует более высокий уровень оптической плотности орексина-А в телах нейронов ($M = 0.56; 0.47, 0.66$, $p < 0.05$, рис. 2с) по сравнению с крысами Вистар ($M = 0.52; 0.37, 0.54$).

Таким образом, в гипоталамусе у крыс КМ на фоне более высокого уровня дофамина, экспрессии D1- и D2-рецепторов наблюдается более высокий уровень как экспрессии гена препро-орексина, так и его белка в нейронах, в частности орекси-

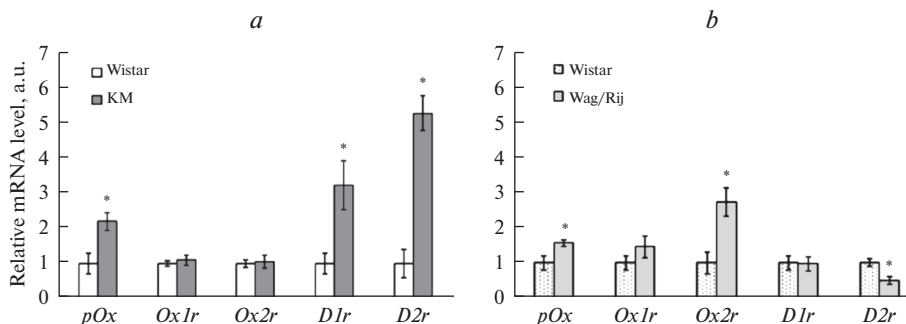


Рис. 1. Анализ экспрессии генов в гипоталамусе крысы KM (a) и Wag/Rij (b) по сравнению с крысами Wistar соответствующего возраста. *Обозначения:* гены, кодирующие препро-орексин (*pOx*), орексиновый рецептор 1 и 2 (*Ox1r* и *Ox2r*), дофаминовые рецепторы 1 и 2 (*D1r* и *D2r*); * – достоверность отличий ($p < 0.05$) от соответствующей группы Wistar. Результаты представлены в условных единицах (arbitrary units – a.u.).

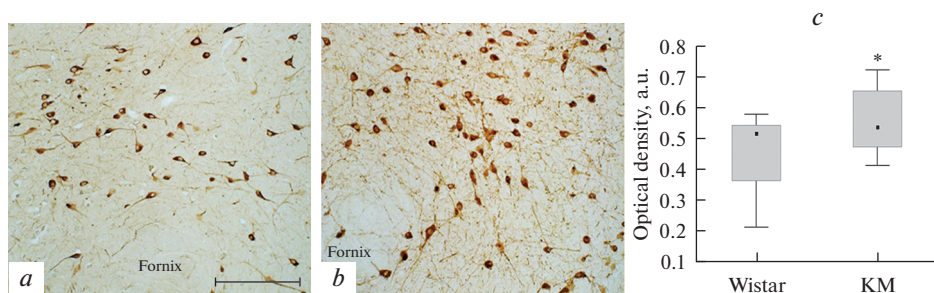


Рис. 2. Иммуногистохимическая реакция к орексину-А в перифорникальной области гипоталамуса крысы Wistar (a) и Крушинского–Молодкиной (KM, b) и количественный анализ оптической плотности орексина-А в нейронах (c). Бокс-плоты соответствуют 50% данных (от 25 до 75%), черная точка внутри бокса – медиана, линии предела – интерквартильный размах. Результаты представлены в условных единицах (arbitrary units – a.u.). * – достоверность отличий ($p < 0.05$). Масштаб 100 мкм.

на-А. Но при этом в гипоталамусе не выявлено изменения экспрессии генов, кодирующих орексиновые рецепторы (OX1R и OX2R).

Результаты ВЭЖХ демонстрируют в гипоталамусе меньший уровень дофамина у крыс WAG/Rij ($M = 87; 78, 92$) по сравнению с крысами Вистар ($M = 100; 84, 115$) на 13% ($p < 0.001$). Но достоверных отличий уровня ДОФУК ($M = 82; 69, 116$ и $M = 100; 91, 188, p > 0.05$) и катаболического коэффициента ДОФУК/ДА ($M = 0.79; 0.63, 1.58$ и $M = 1.0; 0.96, 0.41, p > 0.05$) у крыс WAG/Rij по сравнению с крысами Вистар, несмотря на тенденцию к снижению, не выявлено.

Результаты ПЦР демонстрируют в гипоталамусе у крыс линии WAG/Rij отсутствие отличий в уровне мРНК D1 и более низкий (на 40%, $p < 0.05$) уровень мРНК D2-рецепторов дофамина по сравнению с крысами Вистар (рис. 1b). Полученные данные свидетельствуют о том, что у крыс линии WAG/Rij в гипоталамусе наблюдается снижение активности дофаминергической системы по сравнению с крысами Вистар.

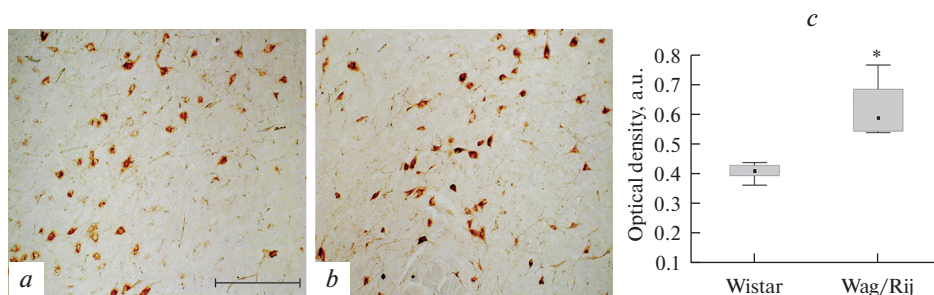


Рис. 3. Иммуногистохимическая реакция к орексину-А в перифорникальной области гипоталамуса крысы Wistar (a) и Wag/Rij (b) и количественный анализ оптической плотности орексина-А в нейронах (c). Бокс-плоты соответствуют 50% данных (от 25 до 75%), черная точка внутри бокса – медиана, линии предела – интерквартильный размах. Результаты представлены в условных единицах (arbitrary units – a.u.). * – достоверность отличий ($p < 0.05$). Масштаб 100 мкм.

Результаты ПЦР демонстрируют в гипоталамусе у крыс WAG/Rij по сравнению с крысами Вистар более высокий уровень мРНК препро-орексина (в 1.5 раза, $p < 0.05$) и OX2R (в 2.7 раз, $p < 0.05$), а изменение уровня мРНК OX1R (увеличение на 45%) не было статистически достоверным (рис. 1b). В области префронтальной коры больших полушарий не выявлено достоверных отличий в уровне мРНК OX1R между крысами WAG/Rij (0.77 ± 0.13 у. е.) и Вистар (1.0 ± 0.08 у. е.). Однако в этой области у крыс WAG/Rij выявлено уменьшение (более низкий уровень) уровня препро-орексина (на 65%, $p < 0.05$) и OX2R (на 69%, $p < 0.05$) по сравнению с крысами Вистар.

Анализ препаратов мозга крыс WAG/Rij свидетельствует о более интенсивной реакции к орексину-А в нейронах перифорникальной области гипоталамуса по сравнению с крысами Вистар (рис. 3a, b). Количественный анализ выявил у крыс WAG/Rij увеличение оптической плотности орексина-А в телах нейронов на 40% ($M = 0.60$; 0.55 , 0.69 , $p < 0.05$) по сравнению с крысами Вистар ($M = 0.43$; 0.41 , 0.44 , рис. 3c).

Таким образом, в гипоталамусе у крыс WAG/Rij на фоне снижения уровня дофамина и экспрессии гена, кодирующего рецепторы D₂, наблюдается увеличение экспрессии генов, кодирующих препро-орексин и OX2R, а также увеличение уровня белка орексина-А в нейронах перифорникальной области.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании был проведен анализ орексинергической системы гипоталамуса у крыс, генетически предрасположенных к эпилептической активности различного генезиса: аудиогенной эпилепсии (крысы линии KM), которая сопровождается развитием судорог, и абсансной эпилепсией (крысы линии WAG/Rij). Использованные линии животных рассматривались нами как модели дисбаланса моноаминов в структурах головного мозга [39, 40, 43]. Полученные нами данные с помощью методов ВЭЖХ и ПЦР подтверждают изменение активности дофаминергической системы в гипоталамусе, однако направленность этих изменений у исследованных животных была различной.

У крыс KM в гипоталамусе отмечается активация дофаминергической системы, что выражается в повышенном уровне дофамина и его метаболита ДОФУК, меньшим значением метаболического коэффициента. Выявлены более высокие уровни

мРНК D1- (активирующих) и D2- (тормозных) рецепторов дофамина, что может быть связано как с повышенной чувствительностью структур гипоталамуса к дофамину, так и быть направлено на уравнивание его эффектов. У крыс WAG/Rij в гипоталамусе, напротив, выявлен статистически достоверно меньший уровень дофамина, но достоверных отличий уровня ДОФУК и катаболического коэффициента от соответствующих показателей у крыс Вистар не обнаружено. Это сопровождалось отсутствием отличия в уровне мРНК D1- и меньшим уровнем мРНК D2-рецепторов ($p < 0.05$), что может быть связано с повышенной чувствительностью структур гипоталамуса к действию дофамина в условиях его дефицита по сравнению с крысами Вистар.

Ранее у крыс WAG/Rij меньший уровень D1-рецепторов дофамина был показан в прилежащем ядре, дорзальном стриатуме, а также меньший уровень D2-рецепторов дофамина выявлен в моторной и соматосенсорной областях коры больших полушарий, дорзальном стриатуме, гиппокампе [41]. В другом исследовании у крыс WAG/Rij 6-месячного возраста в гипоталамусе не выявлено достоверных отличий уровня дофамина и ДОФУК по сравнению с крысами Вистар, однако показано статистически достоверно меньшее значение катаболического коэффициента. В других структурах мозга (префронтальная кора, прилежащее ядро, стриатум) у этих животных также выявлено меньшее значение уровня дофамина, однако его уровень отличался в зависимости от возраста животных (36 дней, 3 и 6 мес.) [43]. Поэтому в настоящем исследовании нам было важно определить уровень дофамина и его метаболита у исследованных нами крыс.

У крыс KM и WAG/Rij, несмотря на разные уровни дофамина в гипоталамусе, результаты ПЦР и иммуногистохимии свидетельствуют о более высоком уровне экспрессии гена, кодирующего препро-орексин, так и уровня его белка орексина-А. У крыс KM повышенный уровень орексина не сопровождался изменением уровня мРНК рецепторов орексина, что, по-видимому, указывает на то, что мишенями орексинов при аудиогенной эпилепсии структуры гипоталамуса являются в меньшей степени, чем другие отделы мозга, куда приходят проекции орексинергических нейронов, возможно структуры, вовлеченные в эпилептогенез. У крыс WAG/Rij в гипоталамусе нами выявлен статистически достоверно повышенный уровень мРНК OX2R и лишь тенденция к увеличению мРНК OX1R, что, по-видимому, свидетельствует об активном участии орексинов в регуляции структур гипоталамуса при данной патологии. При этом в префронтальной коре у крыс WAG/Rij в отличие от гипоталамуса, напротив, выявлен меньший уровень мРНК препро-орексина и OX2R, а результаты, полученные другими авторами [43], демонстрируют уменьшение уровня дофамина в этой структуре мозга.

Известно, что дофамин может оказывать прямое влияние на орексинергические нейроны гипоталамуса: D1- и D2-рецепторы дофамина выявлены непосредственно в телах орексин-иммунопозитивных нейронов [18]. Однако следует отметить, что характер действия дофамина на орексинергические нейроны определяется способностью дофаминовых рецепторов образовывать D1/D2 гетеродимерные комплексы [18]. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что активация орексинергической системы гипоталамуса наблюдается при изменении биосинтеза дофамина независимо от его увеличения или снижения.

Интересно отметить тот факт, что одной из общепризнанных функций орексинов является их участие в регуляции цикла бодрствование—сон [48, 49]. Ранее было показано, что структура цикла бодрствование—сон как у крыс KM [50], так и крыс WAG/Rij [51] существенно не отличается от таковой у крыс Вистар. Таким образом, повышение уровня орексина у этих животных может быть связано с другими функциями этого белка в мозге.

Экспрессия рецепторов орексинов выявлена в структурах мозга, вовлеченных в инициацию и распространение эпилептиформной активности [10, 52]. Так, увеличение количества орексин-иммунопозитивных нейронов показано при эпилепсии [53], что дало основание предполагать участие орексинов в эпилептогенезе. В связи с этим появились исследования, демонстрирующие применение антагонистов орексиновых рецепторов в качестве терапевтических и противосудорожных препаратов [54–57]. Уменьшение судорог показано после введения антагонистов орексиновых рецепторов в гиппокамп [58].

Гипоталамус – важнейший отдел мозга, вовлеченный в регуляцию адаптивных реакций организма. Различные формы эпилепсии являются неврологическими расстройствами, развитие которых может быть следствием энергетического кризиса в нейронах мозга и развития в них гипометаболизма [59–61]. Поскольку орексины вовлечены в регуляцию энергетического баланса, то их активация при эпилепсии различного генезиса может рассматриваться и как механизм компенсации, направленный на поддержание энергетического баланса в нейронах.

Изменение метаболических процессов в нейронах мозга, повреждение их структур, их дегенерация и гибель отмечается после эпилептических припадков, в частности в пилокарпиновой модели эпилепсии [53, 62, 63]. В то же время высказывается гипотеза, предполагающая, что наблюдавшаяся при височной эпилепсии реорганизация слоев гиппокампа является результатом дифференцировки популяции новых пирамидных клеток, а не ремоделированием зрелых нейронов [64]. В контексте этой гипотезы орексины могут являться непосредственными участниками развития эпилепсии, поскольку известна их роль в нейрогенезе клеток гиппокампа [65–67]. Однако нейрохимические и молекулярные основы участия орексинов в патогенезе различных форм эпилепсии не изучены. В связи с этим представленные нами данные об увеличении уровня орексина в гипоталамусе при аудиогенной и абсансной эпилепсии может свидетельствовать о его роли в адаптивных реакциях организма при данных патологиях.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проведено с использованием оборудования центра коллективного пользования Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН в рамках государственного задания № 075-0152-22-00.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея исследования и дизайн эксперимента (И.Ю.М., З.Р.Х., И.В.Р.), проведение экспериментов и сбор материала для исследования (И.Ю.М., А.Л.М., Е.В.М., С.И.В., З.Р.Х.), обработка результатов (И.Ю.М., Е.В.М., С.И.В.), написание и редактирование текста (И.В.Р.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Saper CB, Lowell BB* (2014) The hypothalamus. *Curr Biol* 24 (23): R1111–R1116. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.10.023>
2. *Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG* (2000) Central nervous system control and food intake. *Nature* 404(6778): 661–671. <https://doi.org/10.1038/35007534>
3. *Cakir I, Nillni EA* (2019) Endoplasmic reticulum stress, the hypothalamus, and energy balance. *Trends Endocrinol Metabolism* 30(3): 163–176. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.01.002>

4. *de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X-B, Foye PE, Danielson P E, Fukuhara C, Battenberg ELF, Gautvik V, Bartlett FS, Frankel WN, Van Den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG* (1998) The hypocretins: Hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(1): 322–327.
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.1.322>
5. *Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozłowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M* (1998) Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92(4): 573–585.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80949-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80949-6)
6. *Rodgers RJ, Halford JC, Nunes de Souza RL, Canto de Souza AL, Piper DC, Arch JR, Blundel JE* (2001) Dose-r esponse effects of orexin-A on food intake and the behavioural satiety sequence in rats. *Regul Pept* 96(1–2): 71–84.
[https://doi.org/10.1016/ S0167-0115\(00\)00203-2](https://doi.org/10.1016/ S0167-0115(00)00203-2)
7. *Zhu Y, Miwa Y, Yamanaka A, Yada T, Shibahara M, Abe Y, Sakurai T, Goto K* (2003) Orexin receptor type-1 couples exclusively to pertussis toxin-insensitive G-proteins, while orexin receptor type-2 couples to both pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-proteins. *J Pharmacol Sci* 92(3): 259–266.
<https://doi.org/10.1254/jphs.92.259>
8. *Karteris E, Machado RJ, Chen J, Zervou S, Hillhouse EW, Randeva HS* (2005) Food deprivation differentially modulates orexin receptor expression and signalling in the rat hypothalamus and adrenal cortex. *J Physiol Endocrinol Metab* 288(6): E1089–E1100.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00351.2004>
9. *Kukkonen JP, Leonard CS* (2014) Orexin/hypocretin receptor signalling cascades. *Br J Pharmacol* 171(2): 314–331.
<https://doi.org/10.1111/bph.12324>
10. *Sakurai T* (2005) Roles of orexin/hypocretin in regulation of sleep/wakefulness and energy homeostasis. *Sleep Med Rev* 9(4): 231–241.
<https://doi.org/10.1016/j.smr.2004.07.007>
11. *Li J, Hu Z, de Lecea L* (2014) The hypocretins/orexins: integrators of multiple physiological functions. *Br J Pharmacol* 171(2): 332–350.
<https://doi.org/10.1111/bph.12415>
12. *Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, Qiu X, de Jong PJ, Nishino S, Mignot ES* (1999) The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* 98(3): 365–376.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81965-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81965-0)
13. *Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong Y, Kisanuki Y, Fitch TE, Nakazato M, Hammer RE, Saper CB, Yanagisawa M* (1999) Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 98(4): 437–451.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81973-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81973-x)
14. *Waleh NS, Apte-Deshpande A, Terao A, Ding J, Kilduff TS* (2001) Modulation of the promoter region of prepro-hypocretin by alpha-interferon. *Gene* 262(1–2): 123–128.
[https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(00\)00544-8](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(00)00544-8)
15. *Hara J, Yanagisawa M, Sakurai T* (2005) Difference in obesity phenotype between orexin-knockout mice and orexin neuron-deficient mice with same genetic background and environmental conditions. *Neurosci Lett* 380(3): 239–242.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.01.046>
16. *Tanaka S, Takizawa N, Honda Y, Koike T, Oe S, Toyoda H, Kodama T, Yamada H* (2016) Hypocretin/orexin loss changes the hypothalamic immune response. *Brain Behav Immun* 57: 58–67.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.06.009>
17. *Peyron C, Tighe D, van den Pol A, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS* (1998) Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *Neuroscience* 18(23): 9996–10015.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-23-09996.1998>
18. *Morina IYu, Mikhrina AL, Romanova IV* (2019) An Immunohistochemical Study of the Pathways of the influence of dopamine on orexinergic neurons in the perifornical area of the hypothalamus. *Neurosci Behav Physiol* 49 (9): 1100–1105.
<https://doi.org/10.1007/s11055-019-00846-5>
19. *Bozzi Y, Borrelli E* (2013) The role of dopamine signaling in epileptogenesis. *Front Cell Neurosci* 7: 157.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00157>

20. *Akyuz E, Polat AK, Eroglu E, Kullu I, Angelopoulou E, Paudel YN* (2020) Revisiting the role of neurotransmitters in epilepsy: An updated review. *Life Sci* 265: 118826. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118826>
21. *Juliá-Palacios N, Molina-Anguita C, Sigatulina Bondarenko M, Cortès-Saladelafont E, Aparicio J, Cuadras D, Horvath G, Fons C, Artuch R, García-Cazorla Á* (2022) Monoamine neurotransmitters in early epileptic encephalopathies: New insights into pathophysiology and therapy. *Dev Med Child Neurol* 64(7): 915–923. <https://doi.org/10.1111/dmcn.15140>
22. *Семиохина АФ, Федотова ИБ, Поletaева ИИ* (2006) Крысы линии Крушинского—Молодкиной: исследование аудиогенной эпилепсии, сосудистой патологии и поведения. *Журн высш нерв деятелън* 56 (3): 298–316. 2006. [*Semiokhina AF, Fedotova IB, Poletaeva II* Rats of Krushinsky—Molodkina strain: studies of audiogenic epilepsy, vascular pathology, and behavior. *Zh Vyssh Nerv Deyat* 56 (3): 298–316. (In Russ)].
23. *Крушинский Л* (1959) Генетические исследования по экспериментальной патофизиологии высшей нервной деятельности. *Бюлл Московск общ-ва испытателей природы Отдел биол* 64: 105–117. [*Krushinsky LV* (1959) The genetic studies of experimental pathophysiology in higher nervous activity. *Bull Mosc Soc Natur Testers Biol Sect* 64: 105–117. (In Russ)].
24. *Poletaeva II, Surina NM, Kostina ZA, Perepelkina OV, Fedotova IB* (2017) The Krushinsky-Molodkina rat strain: The study of audiogenic epilepsy for 65years. *Epilepsy Behav* 71 (Pt B): 130–141. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.04.072>
25. *Vataev SI* (2019) Специфические особенности крыс линии Крушинского—Молодкиной как генетической модели генерализованных судорожных припадков. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 105 (6):667–679. [*Vataev SI* (2019) Specific features of the Krushinsky—Molodkina rats as a genetic model of generalized seizures. *Russ J Physiol* 105 (6): 667–679. (In Russ)]. <https://doi.org/10.1134/S0869813919060104>
26. *Faingold CL* (2012) Brainstem Networks: Reticulo-Cortical Synchronization in Generalized Convulsive Seizures. In: *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies. Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV*(eds) 4th edition. Bethesda (MD): Natl Center Biotechnol Informat (US).
27. *Vataev SI, Mal'gina NA, Oganeyan GA* (2016) Effects of stimulation of the inferior colliculi in Krushinskii—Molodkina rats. *Neurosci Behav Physiol* 46 (1): 51–56. <https://doi.org/10.1007/s11055-015-0197-2>
28. *van Luijckelaar EL, Coenen AM* (1986) Two types of electrocortical paroxysms in an in-bred strain of rats. *Neurosci Lett* 70(3): 393–397. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(86\)90586-0](https://doi.org/10.1016/0304-3940(86)90586-0)
29. *Meeren H, van Luijckelaar G, Lopes da Silva F, Coenen A* (2005) Evolving concepts on the pathophysiology of absence seizures: the cortical focus theory. *Arch Neurol* 62 (2): 371–376. <https://doi.org/10.1001/archneur.62.3.371>
30. *Meeren HK, Pijn JP, van Luijckelaar EL, Coenen AM, Lopes da Silva FH* (2002) Cortical focus drives widespread corticothalamic networks during spontaneous absence seizures in rats. *J Neurosci* 22(4): 1480–1495. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-04-01480.2002>
31. *Blumenfeld H* (2005) Cellular and network mechanisms of spike-wave seizures. *Epilepsia* 46 Suppl 9: 21–33. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2005.00311.x>
32. *Midzianovskaia IS, Kuznetsova GD, Coenen AML, Spiridonov AM, van Luijckelaar ELJM* (2001) Electrophysiological and pharmacological characteristics of two types of spike-wave rats. *Brain Res* 911: 62–70. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(01\)02705-6](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(01)02705-6)
33. *Midzianovskaya IS, Kuznetsova GD, Vinogradova LV, Shatskova AB, Coenen AM, van Luijckelaar G* (2004) Mixed forms of epilepsy in a subpopulation of WAG/Rij rats. *Epilepsy Behav* 5(5): 655–661. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2004.06.021>
34. *Bowser DN, Wagner DA, Czajkowski C, Cromer BA, Parker MW, Wallace RH., Harkin LA, Muley JC, Marini C, Berkovic SF, Williams DA, Jones MV, Petrou S* (2002) Altered kinetics and benzodiazepine sensitivity of aGABA_Areceptor subunit mutation [γ 2(R43Q)] found in human epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(23): 15170–15175. <https://doi.org/10.1073/pnas.212320199>
35. *Kang J, Macdonald RL* (2004) The GABA_A receptor γ 2 subunit R43Q mutation linked to childhood absence epilepsy and febrile seizures causes retention of α 1 β 2 α 2S receptors in the endoplasmic reticulum. *J Neurosci* 24(40): 8672–8677. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2717-04.2004>

36. *Van Luijckelaar G, Sitnikova E* (2006) Global and focal aspects of absence epilepsy: the contribution of genetic models. *Neurosci Biobehav Rev* 30(7): 983–1003.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2006.03.002>
37. *Жулин ВВ, Плескачева МГ* (1991) Связывание ГАМК и диазепама в головном мозге крыс линии Крушинского–Молодкиной. *Нейрохимия* 10 (1–2): 10–17. [*Joulin VV, Pleskacheva MG* (1991) GABA and diazepam binding in rats of Krushinsky–Molodkina strain. *Neurochimia* 10 (1–2): 10–17. (In Russ)].
38. *Bashkatova VG, Kudrin VS, Malikova LA, Kosacheva ES, Fedotova IB, Semiokhina AF, Raevsky KS* (1995) Transmitter amino acids, lipid peroxidation and antioxidant defence mechanisms in the brain of rats with audiogenic epilepsy. *J Neurochem* 65: 191–198.
39. *Косачева ЕС, Кудрин ВС, Федотова ИБ, Семиохина АФ, Раевский КС* (1998) Влияние карбамазепина на содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга крыс с аудиогенной эпилепсией. *Эксперим клинич фармакол* 61(3): 25–27. [*Kosacheva ES, Kudrin VS, Fedotova IB, Semiokhina AF, Raevskii KS* (1998) The effect of carbamazepine on the content of monoamines and their metabolites in the brain structures of rats with audiogenic epilepsy. *Eks klin farmakol* 61(3): 25–27. (In Russ)].
40. *de Bruin NM, van Luijckelaar EL, Cools AR, Ellenbroek BA* (2001) Dopamine characteristics in rat genotypes with distinct susceptibility to epileptic activity: apomorphine induced stereotyped gnawing and novelty/amphetamine induced locomotor stimulation. *Behav Pharmacol* 12(6–7): 517–525.
<https://doi.org/10.1097/00008877-200111000-00013>
41. *Birioukova LM, Midzyanovskaya IS, Lensu S, Tuomisto L, van Luijckelaar G* (2005) Distribution of D1-like and D2-like dopamine receptors in the brain of genetic epileptic WAG/Rij rats. *Epilepsy Res* 63(2–3): 89–96.
<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2004.12.001>
42. *Malikova LA, Fedotova IB, Narkevich VB, Kloft PM, Kudrin VS, Poletaeva II, Raevskii KS* (2008) Effects of the novel anticonvulsant levetiracetam on the content of monoamines and their main metabolites in the brain structures of rats of the Krushinskii–Molodkina strain. *Neurochem J* 2(4): 289–292.
<https://doi.org/10.1134/S1819712408040090>
43. *Sarkisova KYu, Kulikov MA, Kudrin VS, Midzyanovskaya IS, Birioukova LM* (2014) Age-related changes in behavior, in monoamines and their metabolites content, and in density of D1 and D2 dopamine receptors in the brain structures of WAG/Rij rats with depression-like pathology. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im IP Pavlova* 64(6): 668–685.
<https://doi.org/10.7868/S0044467714060094>
44. *Paxinos GT, Watson Ch* (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates. (Fourth Edition). Acad Press. San Diego, California, USA. Int Standard Book Number: 0-12-547617-5 CD-ROM.
45. *Krasnova IN, Bychkov ER, Lioudyno VI, Zubareva OE, Dambinova SA* (2000) Intracerebroventricular administration of substance P increases dopamine content in the brain of 6-hydrodopamine lesioned rats. *Neuroscience* 95(1): 113–117.
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(99\)00400-5](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(99)00400-5)
46. *Morina IYu, Stankova EP, Romanova IV* (2020) Effects of Prenatal Stress on the Formation of the Orexinergic System of the Hypothalamus in Rats. *Neurosci Behav Physiol* 50(5): 607–617.
<https://doi.org/10.1007/s11055-020-00942-x>
47. *Romanova IV, Derkach KV, Mikhrina AL, Sukhov IB, Mikhailova EV, Shpakov AO* (2018) The leptin, dopamine and serotonin receptors in hypothalamic POMC-neurons in normal and obese rodents. *Neurochem Res* 43(4): 821–837.
<https://doi.org/10.1007/s11064-018-2485-z>
48. *Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, Qiu X, de Jong PJ, Nishino S, Mignot ES* (1999) The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* 98(3): 365–376.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81965-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81965-0)
49. *Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong Y, Kisanuki Y, Fitch TE, Nakazato M, Hammer RE, Saper CB, Yanagisawa M* (1999) Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 98(4): 437–451.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81973-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81973-x)
50. *Vataev SI, Oganessian GA* (2011) The organization of sleep in Krushinskii–Molodkina rats after sleep deprivation and audiogenic convulsive seizures of different intensities. *Neurosci Behav Physiol* 41(7): 687–695.
<https://doi.org/10.1007/s11055-011-9473-y>
51. *Sitnikova E* (2021) Sleep disturbances in rats with genetic pre-disposition to spike-wave epilepsy (WAG/Rij) *Front Neurol* 12:766566.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2021.766566>

52. *Marcus JN, Aschkenasi CJ, Lee CE, Chemelli RM, Saper CB, Yanagisawa M, Elmquist JK* (2001) Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol* 435(1): 6–25. <https://doi.org/10.1002/cne.1190>
53. *Roundtree HM, Simeone TA, Johnson C, Matthews SA, Samson KK, Simeone KA* (2016) Orexin receptor antagonism improves sleep and reduces seizures in Kcnal-null Mice. *Sleep* 39(2): 357–368. <https://doi.org/10.5665/sleep.5444>
54. *Kortunay S, Erken HA, Erken G, Genç O, Sahiner M, Turgut S, Turgut G* (2012) Orexins increase penicillin-induced epileptic activity. *Peptides* 34(2): 419–422. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.02.013>
55. *Xu TR, Yang Y, Ward R, Gao L, Liu Y* (2013) Orexin receptors: multi-functional therapeutic targets for sleeping disorders, eating disorders, drug addiction, cancers and other physiological disorders. *Cell Signal* 25(12): 2413–2423. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.07.025>
56. *Ng MC* (2017) Orexin and Epilepsy: Potential Role of REM Sleep. *Sleep* 40(3). <https://doi.org/10.1093/sleep/zsw061>
57. *Wang C, Wang Q, Ji B, Pan Y, Xu C, Cheng B, Bai B, Chen J* (2018) The orexin/receptor system: molecular mechanism and therapeutic potential for neurological diseases. *Front Mol Neurosci* 11: eA 220. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00220>
58. *Goudarzi E, Salmani ME, Lashkarbolouki T, Goudarzi I* (2015) Hippocampal orexin receptors inactivation reduces PTZ induced seizures of male rats. *Pharmacol Biochem Behav* 130: 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.01.006>
59. *Blass JP* (2001) Brain metabolism and brain disease: is metabolic deficiency the proximate cause of Alzheimer dementia? *J Neurosci Res* 66(5): 851–856. <https://doi.org/10.1002/jnr.10087>
60. *Zilberter M, Ivanov A, Ziyatdinova S, Mukhtarov M, Malkov A, Alpar A, Tortoriello G, Botting CH, Fulop L, Osypov AA, Pitkanen A, Tanila H, Harkany T, Zilberter Y* (2013) Dietary energy substrates reverse early neuronal hyperactivity in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 125(1): 157–171. <https://doi.org/10.1111/jnc.12127>
61. *Bascuñana P, García-García L, Javela J, de la Rosa RF, Shiha AA, Kelly J, Delgado M, Pozo MÁ* (2019) PET neuroimaging reveals serotonergic and metabolic dysfunctions in the hippocampal electrical kindling model of epileptogenesis. *Neuroscience* 409:101–110. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.04.028>
62. *Fernandes MJ, Dube C, Boyet S, Marescaux C, Nehlig A* (1999) Correlation between hypermetabolism and neuronal damage during status epilepticus induced by lithium and pilocarpine in immature and adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 19(2): 195–209. <https://doi.org/10.1097/00004647-199902000-00011>
63. *Covolan L, Mello LE* (2000) Temporal profile of neuronal injury following pilocarpine or kainic acid-induced status epilepticus. *Epilepsy Res* 39(2): 133–152. [https://doi.org/10.1016/s0920-1211\(99\)00119-9](https://doi.org/10.1016/s0920-1211(99)00119-9)
64. *Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH* (1997) Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 17(10): 3727–3738. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-10-03727.1997>
65. *Ito N, Yabe T, Gamo Y, Nagai T, Oikawa T, Yamada H, Hanawa T* (2008) I.c.v. administration of orexin-A induces an antidepressive-like effect through hippocampal cell proliferation. *J Neurosci* 157(4):720–732. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.09.042>
66. *Bjornstrom K, Turina D, Strid T, Sundqvist T, Eintrei C* (2014) Orexin A inhibits propofol-induced neurite retraction by a phospholipase D/protein kinase C?-dependent mechanism in neurons. *PLoS One* 9(5): e97129. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097129>
67. *Bakos J, Zatkova M, Bacova Z, Ostatnikova D* (2016) The role of hypothalamic neuropeptides in neurogenesis and neuritogenesis. *Neural Plasticity* 2016: 3276383. <https://doi.org/10.1155/2016/3276383>

Analysis of the Orexinergic System of the Hypothalamus in Rats with Various Forms of Genetically Due to Epilepsy

**I. Yu. Morina^a, A. L. Mikhrina^a, E. V. Mikhailova^a, S. I. Vataev^a,
Z. R. Hismatullina^b, and I. V. Romanova^{a, *}**

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

^b*Bashkir State University, Ufa, Russia*

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

The hypothalamus was studied in mature males of two lines of rats with a genetic predisposition to various forms of epileptic activity was carried out: the Krushinsky-Molodkina (KM) with audiogenic convulsive activity and the WAG/Rij with absence epilepsy. The PCR results demonstrated an increased level of D1 and D2 mRNA of dopamine receptors in KM rats; in WAG/Rij rats no differences in the expression level of D1-receptors were found, but a significantly lower level of D2-receptor mRNA was shown compared to Wistar rats. In KM and WAG/Rij rats a higher level of prepro-orexin mRNA and orexin-A protein was found in the perifornical area neurons. In KM rats no differences were found in the level of orexin receptors expression and in WAG/Rij rats, the level of OX2R mRNA was higher than in Wistar rats. The data obtained are discussed in connection with the participation of the brain orexinergic system in the regulation of the dopaminergic system and the energy balance of the body during epileptic activity, as well as the likely function of orexins as adaptation factors in pathological conditions.

Keywords: hypothalamus, orexin, orexin receptors, dopamine, dopamine receptors, audiogenic and absence epilepsy

**ПОВЕДЕНИЕ КРЫС В ТЕСТАХ НА ТРЕВОЖНОСТЬ
ПРИ НЕПРОДОЛЖИТЕЛЬНОМ ИНТРАНАЗАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ
ОДНОСЛОЙНЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК
В ДВУХ НЕБОЛЬШИХ ДОЗАХ**

© 2022 г. Е. В. Лосева^{1, *}, Н. А. Логинова¹, Л. И. Руссу², М. В. Мезенцева²

¹ *Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия*

² *Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздрава России, Москва, Россия*

*E-mail: losynd@mail.ru

Поступила в редакцию 26.07.2022 г.

После доработки 14.09.2022 г.

Принята к публикации 12.10.2022 г.

Углеродные нанотрубки (УНТ) очень перспективны для использования в разных областях деятельности человека, в том числе и в медицине, но могут оказывать негативное воздействие на организм, в частности на нервную систему. УНТ в больших дозах в экспериментах на животных часто вызывают тревожно-депрессивные расстройства. Влияние малых доз УНТ на поведение животных мало изучено. В настоящей работе исследовали показатели поведения в тестах на тревожность у крыс, которым интраназально ежедневно в течение 4 дней вводили взвесь однослойных углеродных нанотрубок (ОСУНТ) в небольших дозах — 5.2 или 52 мкг/кг. Оказалось, что обе дозы ОСУНТ однонаправленно изменяли следующие показатели поведения у крыс: в тесте “открытое поле” снижалась исследовательская активность (стойки), в тесте “свет–темнота” увеличивались латентный период захода в темный отсек и выглядывания из него, в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ) активировалось поведение в открытом рукаве. Однако, если доза 5.2 мкг/кг вызывала у крыс поведение с признаками ажитации (в тестах “свет–темнота” и ПКЛ усиление исследовательской активности, а в тесте ПКЛ и двигательной активности при частых посещениях разных отсеков лабиринта), то доза 52 мкг/кг, наоборот, тормозила ряд поведенческих реакций, что выражалось в усилении тревожности (увеличение показателей замирания в открытом поле и ПКЛ) и увеличении латентного периода входа в закрытый рукав ПКЛ. Предполагается, что разные небольшие дозы ОСУНТ, попадая при интраназальном введении в мозг крыс, могут неодинаково нарушать структурно-функциональное состояние клеток нервной ткани и/или вызывать нейровоспаление в структурах, задействованных в механизмах тревожности и сопутствующих состояний, в результате чего по-разному изменяется и поведение крыс в тестах на тревожность.

Ключевые слова: однослойные углеродные нанотрубки, небольшие дозы, интраназальное введение, поведение крыс, тест “открытое поле”, тест “свет–темнота”, тест “приподнятый крестообразный лабиринт”

DOI: 10.31857/S086981392211005X

В настоящее время отмечается бурный рост производства углеродных нанотрубок (УНТ), которые, обладая уникальными свойствами — значительно повышенными электро- и теплопроводностью, прочностью, гибкостью и другими, востребованы в самых различных областях деятельности человека и очень перспективны для медицины. В экспериментальных работах *in vivo* и *in vitro* было показано, что УНТ могут быть использованы для адресной доставки лекарств и биологически-активных веществ для диагностики и лечения опухолевых процессов, для регенерации тканей, для усиления механических свойств имплантатов [1, 2]. Они могут применяться для создания биосенсорных систем [3], а также быть задействованы в генной терапии и тканевой инженерии. В нейромедицине на УНТ возлагают надежды для лечения опухолей мозга и нейродегенеративных заболеваний [4, 5]. Нанотрубки можно использовать как основу для роста нервных волокон при повреждениях мозга. В их присутствии ускоряется рост и дифференцировка нейральных стволовых клеток [6]. В области инсульта мозга в присутствии гидрофобных УНТ улучшается дифференцировка трансплантированных прогениторов из субвентрикулярной зоны [7]. УНТ бывают однослойные и многослойные. В России особое внимание уделяют производству однослойных углеродных нанотрубок (ОСУНТ) [8]. Однако вместе с развитием производства углеродных нанотрубок возрастает возможность их негативного воздействия на здоровье человека и среду его обитания. В группы риска попадают не только работники, задействованные в производстве УНТ, и население, проживающее недалеко от таких производств, но и потребители продукции, содержащей УНТ. Токсичное влияние УНТ на организм животных активно исследуется, данные противоречивы, и неполная ясность в этом вопросе тормозит использование УНТ в медицинской практике. Из обстоятельного обзора по токсичности ОСУНТ у лабораторных животных известно, что у грызунов при ингаляциях, глоточной аспирации и интратрахеальном введении ОСУНТ наибольшее токсическое воздействие оказывается на легкие и, как следствие, приводит к сердечно-сосудистым заболеваниям. При инъекциях они проникают в разные органы и ткани, в том числе и мозг, задерживаются в легких, селезенке и печени и выводятся через почки и желчные протоки. Предполагается, что при пероральном введении ОСУНТ всасываются из желудочно-кишечного тракта в кровотока у крыс и мышей [9]. При однократном интратрахеальном введении коротких и длинных ОСУНТ в больших дозах (0.2–1 мг/кг) у крыс были обнаружены патологические изменения в легких даже через 104 нед. [10]. Многочисленные токсические эффекты на плаценту и потомство были обнаружены при введении УНТ беременным самкам мышей [11]. На модельном объекте (пекарские дрожжи — *Saccharomyces cerevisiae*) было показано, что ОСУНТ могут прямо или путем эндоцитоза проникать в клетки и распространяться в цитоплазме, везикулах, лизосомах и клеточных ядрах. Кроме того, ОСУНТ (188.2 и 376.4 мг/л) могут вызывать апоптоз в клетках дрожжей, в активации которого участвует окислительный стресс [12].

Особое внимание уделяется нейротоксичности наноматериалов [13]. Так, в экспериментах *in vitro* и *in vivo* показано, что под действием УНТ в больших дозах могут развиваться нейродегенеративные процессы, тормозиться клеточная пролиферация, усиливаться апоптоз, развиваться оксидативный стресс, снижаться мембранный потенциал митохондрий, усиливаться перекисное окисление липидов, подавляться функции астроцитов, нарушаться поведенческие реакции [14]. Данные о поведении животных под действием УНТ немногочисленны и противоречивы. Так, длительное пероральное введение крысам разных доз (0.01; 0.1; 1 и 10 мг/кг) многослойных углеродных нанотрубок (МСУНТ) приводило к снижению массы тимуса и увеличению массы головного мозга и надпочечников, но не влияло на уровень тревожности и когнитивные показатели при выработке условного рефлекс пассивного избегания [15]. В другой работе при получении МСУНТ (в дозе 500 мг/кг) с

пищей у крыс показана динамика увеличения тревожности и снижения исследовательской активности в тесте “открытое поле” [16]. Усиление тревожно-депрессивного поведения было показано и у детенышей при внутрибрюшинном введении разных доз (1–10 мг/кг) МСУНТ и ОСУНТ беременным мышам [17, 18]. Внутрибрюшинные инъекции МСУНТ и ОСУНТ в дозах 80 и 800 мг/кг также приводили к тревожно-депрессивному поведению взрослых мышей [19]. Нейротоксичность, главным образом, была продемонстрирована при использовании больших доз УНТ. Как влияют небольшие дозы УНТ на поведение животных, мало изучено. Появилась работа, в которой МСУНТ вводили мышам однократно в малых дозах – 20 мкг при фарингеальной аспирации и 0.2 мкг внутривенно. Было показано, что через 24 ч в открытом поле при интрафарингеальной аспирации у мышей развивалось эмоциональное напряжение и ослабление ориентировочно-исследовательских реакций, тогда как при внутривенном введении, наоборот, повышалась двигательная и исследовательская активность [20].

Интраназальное введение низкомолекулярных веществ и различных частиц, в том числе и наноматериалов считают наиболее эффективным путем для их доставки в мозг через обонятельную луковицу со слабым гематоэнцефалическим барьером [21, 22]. Есть надежда успешно доставлять в мозг лекарственные пептиды с помощью нанотрубок [23]. Ранее мы показали, что однократное интраназальное введение крысам взвеси ОСУНТ в малой дозе (4 мкг/кг) через сутки приводило к угнетению продукции мРНК большинства цитокинов в селезенке, а также к снижению суммарной активности транскрипции цитокинов в селезенке и мозге, то есть оказывало иммуносупрессивный эффект. При этом наблюдалось усиление экспрессии раннего гена *c-fos* в обонятельной луковице и тесно связанной с ней пириформной области неокортекса, то есть происходила активация этих структур мозга [24]. Мы предположили, что ОСУНТ в небольших дозах при интраназальном введении могут частично проникать в клетки мозга и, благодаря своим уникальным свойствам (сверхпрочности, повышенными электро- и теплопроводности) нарушать их структурно-функциональную целостность, что может привести к нейродегенеративным процессам и нейровоспалению и, как следствие, к изменению поведения животных. Поэтому в данном исследовании было решено использовать две небольшие дозы ОСУНТ для проверки влияния их непродолжительного интраназального введения на поведение крыс в тестах на тревожность.

Задача настоящей работы состояла в сравнительном анализе показателей поведения крыс в тестах на тревожность – “открытое поле”, “свет–темнота”, “приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ) – при непродолжительном интраназальном введении ОСУНТ в двух небольших дозах (5.2 или 52 мкг/кг).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена на 25 крысах-самцах Вистар с массой тела 230–280 г. Животные были разделены на 3 группы. Крысам двух экспериментальных групп по разработанной нами ранее методике [24] вводили интраназально один раз в день (в течение 4 дней) по 100 мкл взвеси двух доз ОСУНТ – 5.2 мкг/кг (доза 1) или 52 мкг/кг (доза 2) в физиологическом растворе (ФР) (группы ОСУНТ-1, $n = 9$ и ОСУНТ-2, $n = 8$ соответственно). Контролем служили крысы, которым аналогично раз в день (в течение 4 дней) интраназально вводили по 100 мкл ФР (группа Контроль, $n = 8$).

В настоящем исследовании была использована паста к-ОСУНТ-90А (производство “Углерод ООО Чг”), любезно предоставленная А.В. Крестининым (Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка, Россия). Эту пасту мы использовали и в предыдущей работе, где подробно описаны ее характеристики [24]. Про-

центное содержание ОСУНТ (диаметр – 1.4–1.6 нм, длина – 0.5–1.5 мкм) в твердой фазе в пасте составляло более 90%. После автоклавирования при 1 атм и 120°C в течение 30 мин из 1 г пасты была приготовлена 1%-ная взвесь ОСУНТ в 100 мл физиологического раствора (ФР) (0.9%-ный NaCl), которую затем разводили в 1000 раз (для получения дозы 1) или в 100 раз (для получения дозы 2). Для однократного введения использовали по 100 мкл каждого раствора, что в перерасчете на массу тела крыс составляло 5.2 или 52 мкг/кг соответственно.

Для исследования показателей поведения всех крыс оценивали в общепринятых в мировой практике тестах на тревожность – “открытое поле”, “свет–темнота”, “приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ) [25]. Для регистрации показателей поведения во всех тестах использовали компьютерную программу RealTimer, разработанную ООО “НПК Открытая Наука” (Россия). Тест “открытое поле” выполняли через сутки после 1-го введения препаратов (ОСУНТ в обеих дозах или ФР), тест “свет–темнота” – через сутки после 3-го, а тест ПКЛ – через сутки после 4-го введения препаратов. То есть, препараты вводили непродолжительно в течение всех поведенческих экспериментов. Более продолжительное интраназальное введение ОСУНТ и оценка его влияния на поведение животных планируется нами в будущем. Особенности использованных поведенческих установок подробно описаны нами ранее [26]. Тест в каждой установке проводили в течение 5 мин для каждой крысы.

Для проведения теста “открытое поле” использовали квадратную камеру (100 × 100 см), пол которой разделен на 25 квадратов (20 × 20 см) – 1 центральный, 8 медиальных, 14 периферических, а высота стенок составляла 40 см. Крыс сажали на периферию открытого поля боком к стенке камеры. Определяли латентные периоды (с) выхода в центральный квадрат и медиальную зону, число пересеченных центрального, медиальных и периферических квадратов, а также общее число пересеченных квадратов. Кроме того, подсчитывали число актов, общую продолжительность (с) и среднюю продолжительность (с) стоек, груминга (умываний и чесаний отдельно) и принюхивания, число периодов неподвижности и замираний (подавление всех движений, кроме дыхательных), а также их общую и среднюю продолжительность (с). Полагают, что чем больше выходов в медиальные и центральный квадраты и продолжительность нахождения в них, тем меньше выражена тревожность, и наоборот.

Для выполнения теста “свет–темнота” использовали стандартную установку, состоящую из светлого и темного отсеков с отверстием в перегородке. Животных сажали в светлый отсек (СО) камеры хвостом к отверстию. Определяли латентные периоды (с) входа в темный отсек (ТО) и выхода в СО, первого выглядывания и вытягивания из ТО; число выходов в СО, продолжительность (с) пребывания в СО при выходах из ТО. Также оценивали число, общую и среднюю продолжительность (с) актов груминга, выглядывания (только весь нос и часть головы или голова) и вытягивания (задние лапы в ТО, голова и передние лапы в СО) из ТО. Кроме того, измеряли число, общую и среднюю продолжительность (с) стоек с опорой и без опоры, всех стоек, а также стоек до первого захода в ТО и при выходах из него в СО. Кроме того, определяли число болюсов в ТО и СО. Считается, что чем больше времени крыса находится в светлом отсеке камеры и выглядывает из темного отсека, тем меньше уровень тревожности.

Для проведения теста ПКЛ использовали установку “Приподнятый крестообразный лабиринт” (НПК Открытая Наука, Россия). Крыс помещали в центр камеры боками к закрытым рукавам (ЗР). Регистрировали латентный период (с) первого захода в ЗР и латентный период (с) первого выхода в открытый рукав (ОР). Каждый рукав делили на 3 квадрата – ближний, средний и дальний от центра лабиринта. Регистрировали число разных пересеченных квадратов в ОР и ЗР, число и время (с)

посещений центральной зоны, число заходов в ЗР и выходов в ОР, а также общую и среднюю продолжительность (с) пребывания в них. Кроме того, определяли число актов, общую и среднюю продолжительность (с) стоек, груминга (умываний и чесаний отдельно), принюхивания, выглядывания из ЗР (только весь нос и часть головы или голова), вытягивания (задние лапы в ЗР, голова и передние лапы в центре или в ОР), свешивания с ОР. Также оценивали число периодов, общее и среднее время (с) замирания и неподвижности. Кроме того, определяли число болюсов в разных отсеках ПКЛ – ЗР, ОР и центре. Принято считать, что чем больше времени крыса проводит в открытом рукаве и выглядывает из закрытого рукава, тем она менее тревожна (если не увеличена общая двигательная активность).

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям биоэтического комитета ИВНД и НФ РАН (протокол № 3 от 10.07.2020 г.).

Для проверки выборок показателей поведения на нормальность распределения был проведен анализ Колмогорова–Смирнова. Поскольку большинство выборок не имело нормального распределения, статистический анализ показателей поведения во всех тестах был проведен с помощью непараметрического критерия Краскела–Уоллиса для нескольких независимых переменных (альтернатива однофакторного межгруппового ANOVA) с последующим сравнением по критерию Манна–Уитни, используя программу STATISTICA 7.0. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$ и на уровне статистической тенденции при $p < 0.1$. По критерию Манна–Уитни проверяли межгрупповые отличия только по тем показателям, в которых были выявлены статистически значимые или в виде тенденции отличия по критерию Краскела–Уоллиса.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В тесте “открытое поле” дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса выявил статистически значимые или в виде тенденции отличия между тремя группами крыс по числу стоек ($H(2.25) = 5.73, p = 0.06$), их общей и средней продолжительности (с) ($H(2.25) = 7.85, p = 0.02$ и $H(2.25) = 5.11, p = 0.08$ соответственно); по числу замираний ($H(2.25) = 5.49, p = 0.06$), их общей и средней продолжительности (с) ($H(2.25) = 8.46, p = 0.01$ и $H(2.25) = 10.87, p = 0.01$ соответственно); по общей и средней продолжительности (с) умываний ($H(2.25) = 5.96, p = 0.05$ и $H(2.25) = 4.67, p = 0.09$ соответственно). Сравнение групп по критерию Манна–Уитни проводили только по этим показателям. Результаты этого анализа представлены на рис. 1.

Было обнаружено, что в тесте “открытое поле” число стоек уменьшалось только в группе ОСУНТ-2 ($p = 0.03$), а общее время стоек и средняя продолжительность акта стойки уменьшались в обеих группах – ОСУНТ-1 ($p = 0.02$ и $p = 0.06$ соответственно) и ОСУНТ-2 ($p = 0.01$ и $p = 0.04$ соответственно). По показателям груминга снижалось общее время умывания только в группе ОСУНТ-1 ($p = 0.1$). Остальные показатели груминга в обеих группах не изменялись. Число замираний снижалось в группе ОСУНТ-1 ($p = 0.09$), а общая и средняя их продолжительность возрастала в группе ОСУНТ-2 ($p = 0.07$ и $p = 0.01$ соответственно).

Таким образом, в тесте “открытое поле” в группе ОСУНТ-1, по сравнению с контролем, уменьшались общая и средняя продолжительность стоек, длительность умываний и число замираний. В группе ОСУНТ-2 уменьшались число, общая и средняя продолжительность стоек, и увеличивались общая и средняя продолжительность акта замирания. То есть группы, получавшие разные дозы ОСУНТ, отличались от контроля по-разному. При этом у группы ОСУНТ-2, по сравнению с

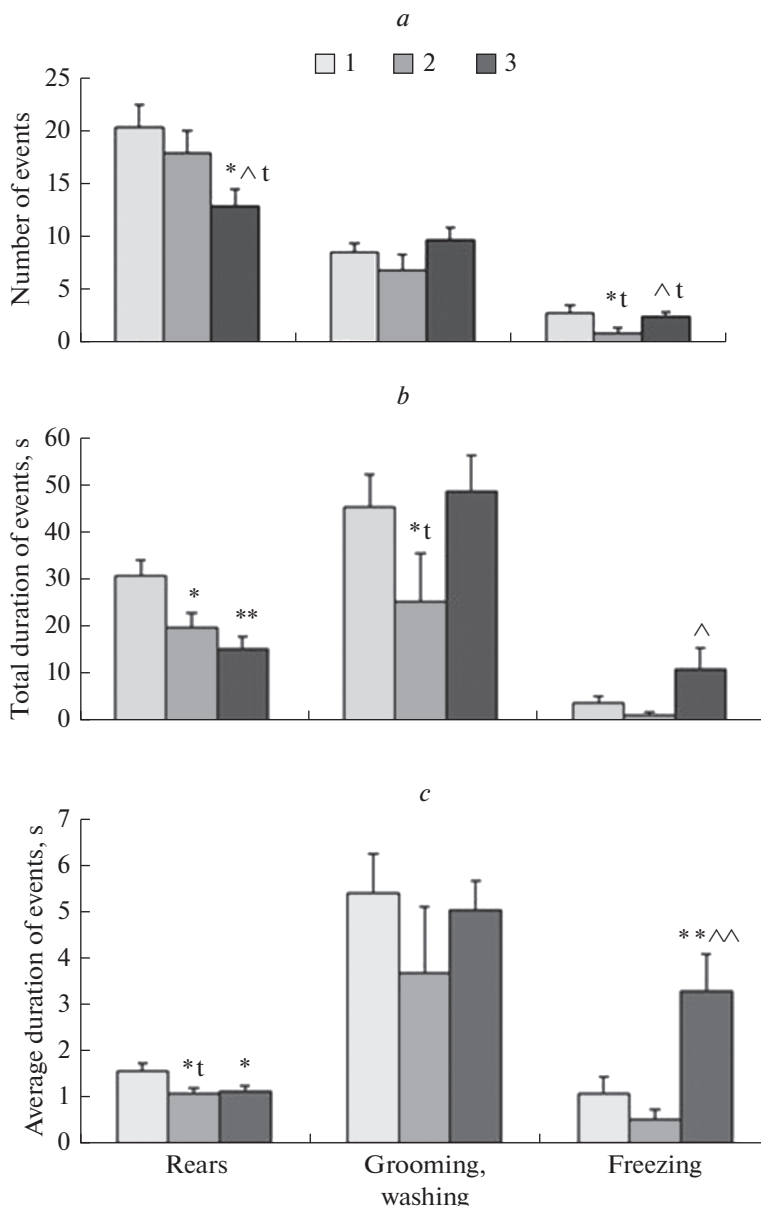


Рис. 1. Сравнение некоторых показателей поведения у групп крыс Контроль, ОСУНТ-1 и ОСУНТ-2 в тесте “открытое поле”.

Показатели поведенческих реакций: стоек (Rears), умываний (Grooming, washing) и замираний (Freezing), по которым выявлены статистически значимые ($p < 0.05$) или в виде тенденции ($p < 0.1$) различия между группами крыс по критерию Краскела–Уоллиса. Группы крыс: 1 – Контроль ($n = 8$), 2 – ОСУНТ-1 ($n = 9$). 3 – ОСУНТ-2 ($n = 8$). Описание групп дано в разделе “Методика исследования”. (a) Число стоек, умываний и замираний. (b) Общая продолжительность тех же событий, с. (c) Средняя продолжительность тех же событий, с. Данные представлены в $\text{mean} \pm \text{SEM}$. ** – $p < 0.01$ и * – $p < 0.05$ – различия статистически значимы или $*t - p < 0.1$ – на уровне статистической тенденции по сравнению с группой Контроль; ^^ – $p < 0.01$, ^ – $p < 0.05$ – различия статистически значимы или $^t - p < 0.1$ на уровне тенденции по сравнению с группой ОСУНТ-1. Критерий Манна–Уитни.

группой ОСУНТ-1, было меньше число стоек ($p = 0.08$), но больше число ($p = 0.09$), общая ($p = 0.04$) и средняя ($p = 0.01$) продолжительность замираний.

То есть группа ОСУНТ-2 демонстрировала в открытом поле более тревожное поведение по сравнению с контролем (больше общая и средняя продолжительность замираний) и с группой ОСУНТ-1 (больше все показатели замираний). В группе ОСУНТ-1 число замираний и длительность умываний, по сравнению с контролем, снижались, следовательно по этим признакам тревожность была меньше. В то же время, вертикальная исследовательская активность (показатели стоек) уменьшалась на фоне обеих доз ОСУНТ, но в группе ОСУНТ-2 в большей степени, чем в группе ОСУНТ-1.

В тесте “свет–темнота” дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса выявил статистически значимые или в виде тенденции отличия между группами Контроль, ОСУНТ-1 и ОСУНТ-2 по числу стоек до первого входа в темный отсек (ТО) ($H(2.25) = 6.52, p = 0.04$) и их средней продолжительности (с) ($H(2.25) = 4.88, p = 0.09$); по числу выглядываний из ТО ($H(2.25) = 4.94, p = 0.09$); по латентным периодам (с) входа в ТО ($H(2.25) = 8.49, p = 0.01$) и выглядывания из ТО ($H(2.25) = 6.95, p = 0.03$). Сравнение групп по критерию Манна–Уитни проводили только по этим показателям. Результаты этого анализа представлены на рис. 2.

В тесте “свет–темнота” по сравнению с контролем, в группах ОСУНТ-1 и ОСУНТ-2 увеличивались латентные периоды первого входа в ТО ($p = 0.04$ и $p = 0.05$ соответственно) и выглядываний из него ($p = 0.05$ и $p = 0.05$ соответственно) (рис. 2а). При этом в группе ОСУНТ-1 увеличивалось число стоек до первого входа в ТО ($p = 0.05$). Группа ОСУНТ-2, по сравнению с группой ОСУНТ-1, меньшее количество раз выглядывала из ТО ($p = 0.08$) (рис. 2б). По остальным показателям значимых различий между группами не обнаружено. Однако следует отметить, что только по критерию Манна–Уитни средняя продолжительность периода нахождения в ТО была меньше в группе ОСУНТ-1, по сравнению с группой Контроль ($p = 0.04$) и больше в группе ОСУНТ-2, по сравнению с группой ОСУНТ-1 ($p = 0.08$).

Итак, после помещения в камеру “свет–темнота” обе группы крыс, получавших ОСУНТ, долго не заходили в темный отсек, а группа ОСУНТ-1 (но не ОСУНТ-2) еще и делала при этом много стоек, демонстрируя повышенную вертикальную исследовательскую активность, а также у нее был меньше средний период посещения ТО. Обе группы дольше, чем в контроле, в первый раз не выглядывали из ТО, а группа ОСУНТ-2 еще и меньше раз выглядывала из ТО. То есть, обе экспериментальные группы крыс, наряду с повышенной активностью в СО, которая проявлялась в большей степени в группе ОСУНТ-1, демонстрировали тревожное поведение в ТО, которое проявлялось в большей степени в группе ОСУНТ-2.

Для теста ПКЛ результаты сравнения по критерию Манна–Уитни тех показателей поведения, которые по критерию Краскела–Уоллиса показали статистически значимые или в виде тенденции различия между группами Контроль, ОСУНТ-1 и ОСУНТ-2, представлены в табл. 1. Далее проанализированы межгрупповые сравнения этих показателей по критерию Манна–Уитни. Оказалось, что в группе ОСУНТ-1, по сравнению с контролем, увеличивалось число посещений центра, но уменьшалось среднее время пребывания в нем, увеличивалось число заходов в ЗР и выходов в ОР. В группе ОСУНТ-2, по сравнению с контролем, не изменялось число посещений центра и ЗР, а в ОР этот показатель увеличивался. При этом общая продолжительность пребывания увеличивалась в ОР, а среднее время пребывания уменьшалось в центре и увеличивалось в ОР. Латентные периоды первого посещения ОР уменьшались в обеих группах с ОСУНТ, но в группе ОСУНТ-2 это уменьшение было выражено гораздо в большей степени (ОСУНТ-1 – $p = 0.06$, ОСУНТ-2 – $p = 0.01$). При этом латентный период первого посещения ЗР был значительно увеличен только в группе ОСУНТ-2. При определении двигательной активности в

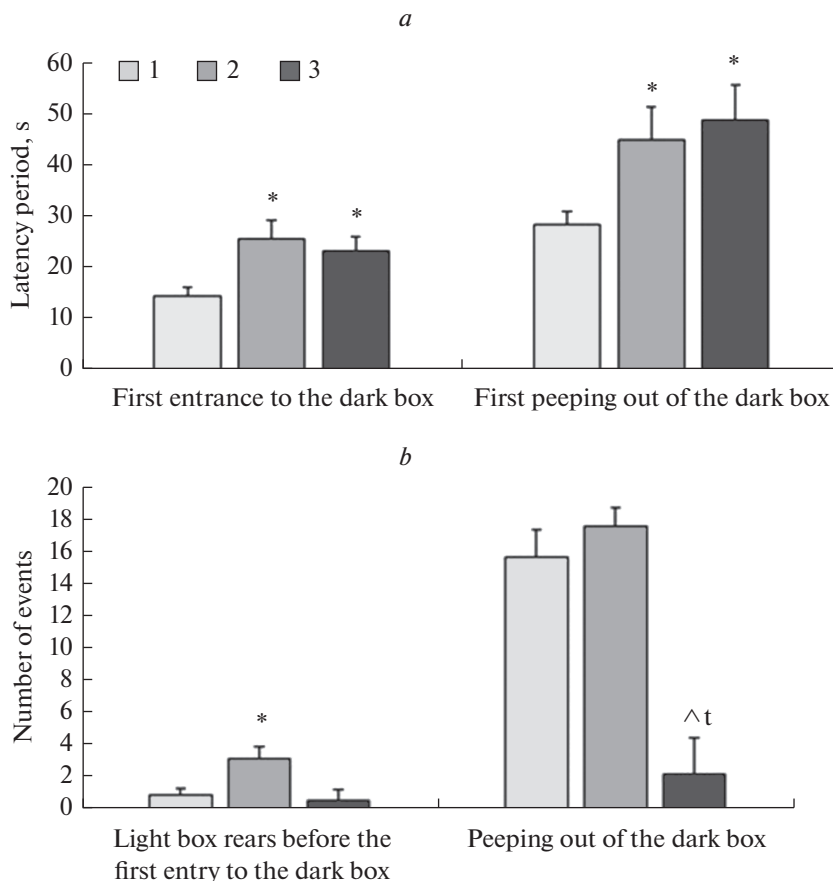


Рис. 2. Анализ некоторых показателей поведения у групп крыс Контроль, ОСУНТ-1 и ОСУНТ-2 в тесте “свет–темнота”.

Показатели поведения, по которым обнаружены статистически значимые ($p < 0.05$) или в виде тенденции ($p < 0.1$) различия между группами крыс по критерию Краскела–Уоллиса. Группы крыс: 1 – Контроль ($n = 8$), 2 – ОСУНТ-1 ($n = 9$), 3 – ОСУНТ-2 ($n = 8$). Описание групп дано в разделе “Методика исследования”. (а) Латентные периоды событий – первого входа в темный отсек (ТО) и первого выглядывания из ТО, с. (б) Число событий – стоек до первого входа в ТО и выглядываний из ТО. Описание групп дано в разделе “Методика”. Данные представлены в $\text{mean} \pm \text{SEM}$. * – $p < 0.05$ – различия статистически значимы по сравнению с группой Контроль; ^{^t} – $p < 0.1$ различия на уровне статистической тенденции по сравнению с группой ОСУНТ-1. Критерий Манна–Уитни.

ПКЛ было обнаружено больше пересечений центральной зоны и ближних квадратов в ОР только у группы ОСУНТ-1. В группе ОСУНТ-2 эти показатели, по сравнению с контролем, не изменялись. В группах ОСУНТ-1 и ОСУНТ-2, по сравнению с контролем, была увеличена средняя продолжительность стоек. При этом у крыс из группы ОСУНТ-2 увеличивались число и общая продолжительность замираний, а увеличение среднего времени акта замирания приблизилось к уровню статистической тенденции ($p = 0.11$).

При сравнении групп, получавших ОСУНТ, оказалось, что группа ОСУНТ-2 меньше раз и времени посещала центр, и меньше раз посещала ЗР, чем группа

Таблица 1. Показатели поведения у групп крыс Контроль, ОСУНТ-1 и ОСУНТ-2 в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ)

Показатели поведения	Результаты непараметрического критерия Краскела—Уоллиса	Контроль, n = 8		ОСУНТ-1, n = 9		ОСУНТ-2, n = 8	
		m ± SEM	p	m ± SEM	p	m ± SEM	p
Число событий, шт.							
Посещения центра	H (2.25) = 4.94, p = 0.08	4.9 ± 1.3		8.9 ± 1.2	p < 0.1*	5.9 ± 1.0	p < 0.1^
Посещения закрытых рукавов (ЗР)	H (2.25) = 5.09, p = 0.08	3.9 ± 0.9		6.6 ± 1.0	p < 0.05*	3.6 ± 0.7	p < 0.1^
Пересечения ближних квадратов в ЗР	H (2.25) = 4.66, p = 0.09	10.2 ± 2.1		14.1 ± 2.0		8.0 ± 1.6	p < 0.1^
Сумма квадратов в ЗР	H (2.25) = 4.98, p = 0.08	29.5 ± 5.2		36.9 ± 4.2		22.38 ± 4.1	p < 0.1^
Посещения открытых рукавов (ОР)	H (2.25) = 5.15, p = 0.08	0.9 ± 0.5		2.3 ± 0.5	p < 0.1*	2.1 ± 0.4	p < 0.1*
Пересечения ближних квадратов в ОР	H (2.25) = 5.28, p = 0.07	1.3 ± 0.7		3.4 ± 0.8	p < 0.1*	2.8 ± 0.4	
Умывания	H (2.25) = 4.87, p = 0.09	4.4 ± 1.2		1.3 ± 0.8	p < 0.1*	2.9 ± 1.0	
Замирания	H (2.25) = 5.47, p = 0.06	0.0 ± 0.0		0.2 ± 0.2		0.6 ± 0.3	p < 0.05*
Болосы в ЗР	H (2.25) = 7.93, p = 0.02	3.1 ± 0.5		0.8 ± 0.4	p < 0.01*	1.4 ± 0.6	p < 0.05*
Болосы в центре	H (2.25) = 6.95, p = 0.03	0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		0.4 ± 0.2	p < 0.05^
Общая продолжительность событий, с							
Нахождение в центре	H (2.25) = 5.34, p = 0.07	31.1 ± 4.8		37.5 ± 7.4		17.2 ± 4.7	p < 0.1^
Нахождение в ОР	H (2.25) = 5.62, p = 0.06	11.3 ± 6.2		30.7 ± 7.6		39.9 ± 10.3	p < 0.05*
Замирание	H (2.25) = 5.91, p = 0.05	0.0 ± 0.0		0.2 ± 0.2		8.1 ± 4.6	p < 0.1*; p < 0.05^
Средняя продолжительность событий, с							
Нахождение в центре	H (2.25) = 8.77, p = 0.01	9.0 ± 2.2		3.9 ± 0.6	p < 0.01**	3.2 ± 0.6	p < 0.05*
Нахождение в ОР	H (2.25) = 5.6, p = 0.06	7.2 ± 4.3		11.1 ± 2.7		21.4 ± 5.6	p < 0.1*; p < 0.1^
Стойка	H (2.25) = 7.88, p = 0.02	1.0 ± 0.1		1.5 ± 0.1	p < 0.1*	1.5 ± 0.2	p < 0.05*
Замирание	H (2.25) = 5.91, p = 0.05	0.0 ± 0.0		0.2 ± 0.2		7.7 ± 4.7	p < 0.05^
Латентные периоды, с							
Вход в ЗР	H (2.25) = 7.26, p = 0.03	9.1 ± 2.8		17.9 ± 6.9		39.8 ± 9.8	p < 0.05*; p < 0.05^
Выход в ОР	H (2.25) = 14.66, p = 0.001	179.9 ± 43.8		78.0 ± 41.6	p < 0.1*	3.5 ± 0.5	p < 0.01*

Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка среднего (m ± SEM). Статистически значимые (p < 0.01, p < 0.05) или в виде статистической тенденции (p < 0.1) отличия: * – по сравнению с группой “Контроль”; ^ – по сравнению с группой ОСУНТ-1. Критерий Манна–Уитни.

ОСУНТ-1. Суммы пересечений квадратов в ЗР и пересечений всех квадратов (в ОР, ЗР и центре) по критерию Манна–Уитни, $p = 0.08$ у группы ОСУНТ-2 были меньшими, чем в группе ОСУНТ-1. Кроме того, в группе ОСУНТ-2 были большими общее и среднее время замираний, а увеличение числа замираний приблизилось к уровню тенденции ($p = 0.11$).

Таким образом, группа ОСУНТ-1 демонстрировала повышенную активность в тесте ПКЛ, что выражалось в частом посещении всех рукавов камеры и центральной зоны, в повышенной двигательной и вертикальной исследовательской активности. В противоположность этому, в группе ОСУНТ-2 наблюдалась активность, характеризующаяся уменьшением нахождения в центре, но увеличением показателей пребывания в ОР, увеличением всех показателей замираний, при этом латентный период выхода в ОР был очень мал, а первого посещения ЗР очень велик, по сравнению с контролем и группой ОСУНТ-1. То есть, животные группы ОСУНТ-2 после помещения в центр сразу же выходили в СО и долго не заходили в ТО. Совокупность показателей поведения в группе ОСУНТ-2 может свидетельствовать не только об увеличении тревожно-подобного поведения у крыс, но и о торможении их способности адекватно оценить обстановку в ПКЛ, и соответственно снижению скорости принятия решения быстро спрятаться в ТО от света, как обычно поступают животные контрольной группы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, наше предположение о нарушении поведения крыс в тестах на тревожность под действием непродолжительного интраназального введения ОСУНТ в небольших дозах подтвердилось. Однако изменения показателей поведения под влиянием ОСУНТ в дозах 1 (5.2 мкг/кг) и 2 (52 мкг/кг) были большей частью не одинаковы.

Так, в группе ОСУНТ-1, которой вводили интраназально ОСУНТ в дозе 5.2 мкг/кг, при сравнении с контролем, по показателям груминга и замираний снижалась тревожность, а по показателям стоек уменьшалась исследовательская активность в тесте “открытое поле”. В тестах “свет–темнота” и ПКЛ наблюдали также усиление исследовательской и двигательной активности, а в тесте ПКЛ еще и частые перебежки из одного отсека в другой. При этом животные больше времени, чем в контроле, проводили в светлых отсеках камер “свет–темнота” и ПКЛ, что может указывать на снижение тревожности (анксиолитический эффект) [27]. Однако хорошо известно, что анксиолитики не вызывают беспорядочную двигательную активность, которая наблюдалась в группе ОСУНТ-1, а наоборот, снижают ее, поэтому говорить об анксиолитическом действии ОСУНТ в данном случае не корректно. Вероятнее всего, в тесте ПКЛ у крыс, получавших 5.2 мкг/кг ОСУНТ в течение 4 дней и демонстрирующих увеличение двигательной и исследовательской активности, частые беспорядочные побежки в разные отсеки, длительное пребывание в светлых отсеках, мы имеем дело с ажитацией, пространственной дезориентацией и нерациональной поисковой активностью.

Для ориентации в пространстве важную роль играют несколько областей неокортекса (теменная, ретроспленальная и префронтальная), гиппокамп и некоторые другие структуры мозга. Механизмы дезориентации в пространстве активно изучаются [28]. Известно, что ажитация может сопровождаться дисбалансом основных нейромедиаторных систем и чрезмерной активацией лимбико-ретикулярных структур мозга при недостаточности контроля коры [29]. Кроме того, при ажитации у больных психозами изменяются уровни цитокинов в сыворотке крови [30], что свидетельствует о важной роли иммунной системы в ее механизмах. Согласно нашим предыдущим данным, при однократном интраназальном введении крысам

взвеси ОСУНТ в сходной малой дозе (4 мкг/кг) через сутки наблюдалось усиление экспрессии раннего гена *c-fos* в лимбических структурах – обонятельной луковицы и пириформной области неокортекса, свидетельствующее об их активации [24]. Кроме того, в той же работе было показано иммуносупрессивное влияние ОСУНТ в дозе 0.4 мкг/кг через сутки после введения на экспрессию мРНК большинства цитокинов (интерферонов α , β и γ , интерлейкинов 1 β , 2, 5, 6, 8, 13, 17, фактора некроза опухолей α) в селезенке, при этом в мозге снижалась суммарная экспрессия генов цитокинов [24]. Можно предположить, что в настоящей работе у крыс, получавших ОСУНТ в дозе 5.2 мкг/кг в течение 4 дней, также имели место активация обонятельной луковицы, пириформной коры и снижение иммунного ответа, что могло привести к ажитации некоторых поведенческих реакций у этой группы животных. Не исключено, что при этом имел место и дисбаланс нейромедиаторных систем мозга. Дальнейшие иммуногистохимические, иммунологические и биохимические исследования влияния малых доз ОСУНТ на нервную и иммунную системы помогут разобраться в правомерности этих предположений.

При интраназальном введении большей дозы ОСУНТ (52 мкг/кг) крысы из группы ОСУНТ-2, так же как из группы ОСУНТ-1, много времени проводили в светлых помещениях камер “свет–темнота” и ПКЛ. Но в группе ОСУНТ-2 были выявлены и другие изменения в структуре поведения, по сравнению с группой ОСУНТ-1. Во всех тестах у этих крыс не повышалась двигательная и исследовательская активность. Наоборот, в тесте “свет–темнота” были выражены признаки тревожного поведения, а в тестах “открытое поле” и ПКЛ – тревожного и депрессивного поведения. В тесте ПКЛ в группе ОСУНТ-2 также был очень длительный латентный период захода в закрытый рукав и увеличивались, как и в тесте “открытое поле”, показатели замираний. Это может свидетельствовать о том, что скорость оценки обстановки и принятия адекватного решения у этих животных снизилась, а тревожность усилилась. Возможно, они испытывали больший стресс в ПКЛ, чем контрольные крысы. Мы предполагаем, что интраназальное введение ОСУНТ в дозе 52 мкг/кг могло привести к нарушению целостности и функциональной активности клеток в структурах мозга, ответственных за механизмы оценки обстановки и принятия решения, например, хабенулу [31], орбитофронтальную кору [32, 33], стриатум [34]. При этом могло измениться и морфофункциональное состояние стресс-реактивных структур [35].

Следует отметить, что на некоторые сходные по природе поведенческие реакции в настоящей работе ОСУНТ оказывали разнонаправленное влияние в разных тестах. Например, в открытом поле все показатели стоек снижались на фоне обеих доз ОСУНТ, однако в тесте “свет–темнота” число стоек до первого входа в темный отсек увеличивалось на фоне ОСУНТ в дозе 5.2 мкг/кг, а в тесте ПКЛ увеличивалась средняя продолжительность стоек на фоне обеих доз ОСУНТ. Такие разнонаправленные изменения могут быть связаны с разными сроками проведения тестов и с разными дозировками введенных к этим срокам ОСУНТ. Так, тест “открытое поле” проводили через сутки после однократного введения ОСУНТ, а тесты “свет–темнота” и ПКЛ, где направленность изменений этих показателей была сходной – через сутки после трех- и четырехкратного введения ОСУНТ. Сходным образом латентный период входа в темный отсек светло-темной камеры увеличивался по сравнению с контролем, на фоне обеих доз ОСУНТ, а латентный период входа в темный рукав ПКЛ увеличивался только на фоне ОСУНТ в дозе 52 мкг/кг. То есть, направленность изменений была сходна в обоих этих тестах, проведенных с интервалом всего один день и на фоне ежедневного введения трех или четырех порций обеих доз ОСУНТ. Из литературы известно, что комплексное исследование поведения крыс в трех тестах на тревожность (“открытое поле”, “свет–темнота”, ПКЛ) по множеству показателей позволяет достаточно полно дать оценку их эмо-

циональному состоянию [25]. В этой работе все три установки были соединены между собой, и все три теста проводили в течение 15 мин, последовательно по 5 мин на каждый тест, то есть условия проведения тестов были максимально унифицированы. Возможно, использование в нашей работе такой модели позволило бы избежать в разных тестах, проведенных одновременно, разнонаправленных изменений некоторых поведенческих реакций под влиянием интраназального введения, например, четырехкратно разных доз ОСУНТ.

Нарушения поведения, полученные в данной работе, возможно, связаны с тем, что ОСУНТ могут оказывать на клетки мозга значительное воздействие. Так, обнаружено, что субстрат из ОСУНТ может поддерживать и стимулировать электрическую активность в сетях культивируемых нейронов гиппокампа, соединяясь с ними [36]. Это может быть связано со способностью ОСУНТ образовывать тесные контакты с мембранами нейронов [37]. Возможно, что и в нашей работе электропроводность клеток мозга за счет соединившихся с ними ОСУНТ тоже могла увеличиться. При этом мог нарушиться баланс возбуждения и торможения, необходимый для адекватной работы нервной системы. Не исключено, что, благодаря большой теплопроводности ОСУНТ, температура мозга в их присутствии также может увеличиваться.

Известно, что УНТ могут проникать в клетки и клеточные органеллы – лизосомы, митохондрии, ядра, механически нарушая целостность их мембран [38, 39]. В опытах на культуре клеток микроглии было показано, что МСУНТ дозозависимо нарушают пролиферацию и миграцию микроглии, препятствуют фагоцитарной активности этих клеток и вызывают их апоптоз [40]. Показано, что МСУНТ могут вызывать в мозге нейровоспаление, сопровождающееся активацией астроцитов [41].

Предполагается, что в нашей работе ОСУНТ в дозе 5.2 мкг/кг, попадая в мозг, могут увеличивать его электрическую и тепловую проводимость. Это может быть одной из причин повышенной активации поведенческих реакций в группе ОСУНТ-1. Но количества ОСУНТ в этой дозе недостаточно, чтобы повредить значительное число клеток мозга. В то же время ОСУНТ в дозе 52 мкг/кг, попадая в мозг, могли не только изменить электро- и теплопроводность ткани, но и значительно повредить клетки мозга и вызвать в нем воспалительную реакцию, отсюда выраженное тревожное поведение и снижение скорости адекватной оценки обстановки и принятия решения в группе ОСУНТ-2. Подтвердить или опровергнуть эти предположения могут помочь дальнейшие морфофункциональные исследования мозга крыс, получавших ОСУНТ в разных небольших дозах в течение разных интервалов времени.

Литературные данные свидетельствуют о том, что токсические эффекты нанотрубок зависят от многих факторов – их размеров, склонности к агрегации, химического состава поверхности, растворимости в воде, введенной дозы, способа введения и так далее [42, 43]. Например, чем лучше дисперсированы УНТ и меньше их размеры, тем менее проявляется токсичность [44, 45]. Поскольку УНТ очень перспективны для использования в медицине и биологии, наряду с работами по выявлению их токсичности ведется активный поиск способов ее уменьшения. Например, создаются функционализированные УНТ, поверхность которых покрывается биосовместимыми молекулами – белками, РНК, ДНК, углеводами. Такие УНТ обладают меньшим повреждающим действием на клетки, чем очищенные [46, 47]. Именно функционализированные УНТ с большой вероятностью будут применяться в медицинской практике, в том числе и в нейромедицине. В нашей работе были использованы карбоксилированные очищенные ОСУНТ (диаметр – 1.4–1.6 нм, длина – 0.5–1.5 мкм), поэтому, вероятно, даже небольшие их дозы при интраназальном введении привели к нарушению поведения крыс в тестах на тревожность. Возможно, что ОСУНТ, поверхность которых покрыта биосовместимыми молеку-

лами, не оказали бы сходного эффекта на поведение крыс при том же способе введения и тех же дозах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В тесте “открытое поле” крысы через сутки после однократного введения обеих доз ОСУНТ демонстрировали снижение исследовательской активности (стойки). При этом крысы, которым вводили ОСУНТ в дозе 5.2 мкг/кг меньше умывались, меньше замирали, а при введении ОСУНТ в дозе 52 мкг/кг среднее время замираний, наоборот, увеличивалось.

В тесте “свет–темнота” крысы через сутки после трехкратного введения ОСУНТ в обеих дозах, по сравнению с контролем, позже в первый раз посещали темный отсек и выглядывали из него. При этом у крыс, получавших ОСУНТ в дозе 5.2 мкг/кг, сокращалось среднее время пребывания в темном отсеке и возрастало число стоек в светлом отсеке перед первым заходом в темный отсек (исследовательская активность).

В тесте “ПКЛ” у крыс через сутки после четырехкратного введения обеих доз ОСУНТ наблюдалась активация поведения в открытом рукаве, что выражалось в более частом и длительном его посещении, чем в контроле. Под влиянием ОСУНТ в дозе 5.2 мкг/кг также увеличивалась вертикальная исследовательская активность (стойки), двигательная активность (пересечения квадратов) и частые перебежки в разные рукава, а под влиянием ОСУНТ в дозе 52 мкг/кг при увеличении длительности замираний наблюдался долгий латентный период захода в закрытый рукав, но очень быстрый латентный период выхода в открытый рукав.

Таким образом, даже непродолжительное интраназальное введение ОСУНТ в небольших дозах может изменить поведение крыс в тестах на тревожность, причем по ряду показателей эти изменения разные для исследованных доз. Обе дозы ОСУНТ вызывали, по сравнению с контролем, в тесте “открытое поле” снижение исследовательской активности (стойки), в тесте “свет–темнота” увеличение латентного периода захода в темный отсек, в ПКЛ активацию поведения в открытом рукаве. При этом на фоне ОСУНТ в дозе 5.2 мкг/кг у крыс в тестах “свет–темнота” и ПКЛ наблюдалась ажитация некоторых поведенческих реакций (усиление двигательной активности при частых посещениях разных отсеков камер, увеличение исследовательской активности). В то же время на фоне ОСУНТ в дозе 52 мкг/кг наблюдалось тревожное поведение (увеличение длительности замираний в тестах “открытое поле” и ПКЛ), и уменьшалась скорость оценки обстановки и принятия адекватного решения, свойственного крысам, спрятаться от света в темноту (поздний первый заход в темные рукава ПКЛ). Предполагается, что изменения в поведении крыс могли быть связаны с тем, что после интраназального введения ОСУНТ частично попадают в мозг, приводя в разных дозах к разной степени нарушения структурно-функционального состояния клеточных элементов и/или нейровоспалению в областях, ответственных за адекватное поведение в тестах на тревожность.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации на 2021–2023 годы.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Е.В.Л., М.В.М.), подготовка разных доз взвеси ОСУНТ (Л.И.Р., М.В.М), сбор поведенческих данных (Н.А.Л., Е.В.Л.), обработка данных (Н.А.Л.), написание манускрипта (Е.В.Л.), редактирование манускрипта (Н.А.Л., М.В.М.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Saito N, Haniu H, Usui Y, Aoki K, Hara K, Takanashi S, Shimizu M, Narita N, Okamoto M, Kobayashi S, Nomura H, Kato H, Nishimura N, Taruta S, Endo M* (2014) Safe clinical use of carbon nanotubes as innovative biomaterials. *Chem Rev* 114(11): 6040–6079.
<https://doi.org/10.1021/cr400341h>
2. *Rezvoval MA, Nikishau PA, Makarevich MI, Glushkova TV, Klyshnikov KY, Akentieva TN, Efimova OS, Nikitin AP, Malysheva VY, Matveeva VG, Senokosova EA, Khanova MY, Danilov VV, Rusakov DM, Ismagilov ZR, Kostjuk SV, Ovcharenko EA* (2022) Biomaterials Based on Carbon Nanotube Nanocomposites of Poly(styrene-*b*-isobutylene-*b*-styrene): The Effect of Nanotube Content on the Mechanical Properties, Biocompatibility and Hemocompatibility. *Nanomaterials* 12(5): 733.
<https://doi.org/10.3390/nano12050733>
3. *Heller D, Jin H, Martinez B. Patel D, Miller BM, Yeung T-K, Jena PV, Höbartner C, Ha T, Silverman SK, Strano MS* (2009) Multimodal optical sensing and analyte specificity using single-walled carbon nanotubes. *Nat Nanotech* 4: 114–120.
<https://doi.org/10.1038/nnano.2008.369>
4. *Teleanu DM, Chircov C, Grumezescu AM, Teleanu RI* (2019) Neuronanomedicine: An Up-to-Date Overview. *Pharmaceutics* 11(3): E101.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11030101>
5. *Vidu R, Rahman M, Mahmoudi M, Enachescu M, Poteca TD, Opris I* (2014) Nanostructures: a platform for brain repair and augmentation. *Front Syst Neurosci* 8: 91.
<https://doi.org/10.3389/fnsys.2014.00091>
6. *Bokara KK, Kim JY, Lee YI, Yun K, Webster TJ, Lee JE* (2013) Biocompatibility of carbon nanotubes with stem cells to treat CNS injuries. *Anat Cell Biol* 46(2): 85–92.
<https://doi.org/10.5115/acb.2013.46.2.85>
7. *Moon SU, Kim J, Bokara KK, Kim JY, Khang D, Webster TJ, Lee JE* (2012) Carbon nanotubes impregnated with subventricular zone neural progenitor cells promotes recovery from stroke. *Int J Nanomed* 7: 2751–2765.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S30273>
8. *Krestinin AV, Dremova NN, Knerel'man EI, Blinova LN, Zhigalina VG, Kiselev NA* (2015) Characterization of SWCNT products manufactured in Russia and the prospects for their industrial application. *Nanotechnol Russ* 10: 537–548.
<https://doi.org/10.1134/S1995078015040096>
9. *Ema M, Gamo M, Honda K* (2016) A review of toxicity studies of single-walled carbon nanotubes in laboratory animals. *Regul Toxicol Pharmacol* 74: 42–63.
<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.11.015>
10. *Honda K, Naya M, Takehara H, Kataura H, Fujita K, Ema M* (2017) A 104-week pulmonary toxicity assessment of long and short single-wall carbon nanotubes after a single intratracheal instillation in rats. *Inhal Toxicol* 29(11): 471–482.
<https://doi.org/10.1080/08958378.2017.1394930>
11. *Ema M, Gamo M, Honda K* (2016) Developmental toxicity of engineered nanomaterials in rodents. *Toxicol Appl Pharmacol* 299: 47–52.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.12.015>
12. *Zhu S, Luo F, Li J, Zhu B, Wang GX* (2018) Biocompatibility assessment of single-walled carbon nanotubes using *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism. *J Nanobiotechnol* 16: 44.
<https://doi.org/10.1186/s12951-018-0370-1>
13. *Bencsik A, Lestaavel P, Guseva Canu I* (2018) Nano- and neurotoxicology: An emerging discipline. *Prog Neurobiol* 160: 45–63.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.10.003>
14. *Teleanu DM, Chircov C, Grumezescu AM, Teleanu RI* (2019) Neurotoxicity of Nanomaterials: An Up-to-Date Overview. *Nanomaterials (Basel)* 9(1): E96.
<https://doi.org/10.3390/nano9010096>
15. *Shipelin VA, Shumakova AA, Masyutin AG, Chernov AI, Sidorova YuS, Gmoshinski IV, Khotimchenko SA* (2017) In Vivo Subacute Oral Toxicity Assessment of Multiwalled Carbon Nano-

- tubes: Characteristic of Nanomaterial and Integral Indicators. *Nanotechnol Russ* 12(9-10): 559–568.
<https://doi.org/10.1134/S199507801705010X>
16. *Sayapina NV, Batalova TA, Perel'man YM, Kuznetsov VL, Chaika VV, Sergievich AA, Golokhvast KS, Kolosov VP* (2015) Multi-walled carbon nanotubes increase anxiety levels in rats and reduce exploratory activity in the open field test. *Dokl Biol Sci* 464(1): 223–225.
<https://doi.org/10.7868/S0869565215250283>
 17. *Ivani S, Karimi I, Tabatabaei SR* (2012) Biosafety of multiwalled carbon nanotube in mice: a behavioral toxicological approach. *J Toxicol Sci* 37(6): 1191–1205.
<https://doi.org/10.2131/jts.37.1191>
 18. *Ivani S, Karimi I, Tabatabaei SR., Syedmoradi L* (2016) Effects of prenatal exposure to single-wall carbon nanotubes on reproductive performance and neurodevelopment in mice. *Toxicol Ind Health* 32 (77): 1293–1301.
<https://doi.org/10.1177/0748233714555388>
 19. *Gholamine B, Karimi I, Salimi A, Mazdarani P, Becker LA* (2017) Neurobehavioral toxicity of carbon nanotubes in mice. *Toxicol Ind Health* 33(4): 340–350.
<https://doi.org/10.1177/0748233716644381>
 20. *Antsiferova AA, Timerbulatova GA, Gabidinova GF, Nikitinc DO, Dimieve AM, Galyaltdinove ShF, Vershininf AV, Kashkarova PK, Fatkhutdinova LM* (2020) The Influence of Multiwalled Carbon Nanotubes on the Behavior of Mammals after Single Intraparyngeal or Intravenous Exposure. *Nanotechnol Russ* 15(2): 241–247.
<https://doi.org/10.1134/S1995078020020044>
 21. *Loseva E, Yuan TF, Karnup S* (2009) Neurogliogenesis in the mature olfactory system: a possible protective role against infection and toxic dust. *Brain Res Rev* 59(2): 374–387.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.10.004>
 22. *Md S, Mustafa G, Baboota S, Ali J* (2015) Nanoneurotherapeutics approach intended for direct nose to brain delivery. *Drug Dev Ind Pharm* 41(12): 1922–1934.
<https://doi.org/10.3109/03639045.2015.1052081>
 23. *Kumar A, Pandey AN, Jain SK* (2016) Nasal-nanotechnology: revolution for efficient therapeutics delivery. *Drug Deliv.* 23(3): 681–693.
<https://doi.org/10.3109/10717544.2014.920431>
 24. *Loseva EV, Mezentseva MV, Russu LI, Loginova NA, Panov NV, Shchetvin MN, Suetina IA* (2016) Suppression of cytokine synthesis in spleen and brain and small changes in c-fos expression in rat brain after intranasal administration of single-walled carbon nanotubes. *Nanotechnol Russ* 11(3–4): 237–246.
<https://doi.org/10.1134/S1995078016020129>
 25. *Ramos A, Pereira E, Martins GC, Wehrmeister TD, Izidio GS* (2008) Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial. *Behav Brain Res* 193(2): 277–288.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.06.007>
 26. *Loseva EV, Loginova NA, Sarkisova KY, Klodt PM, Narkevich VB, Kudrin VS* (2018) Behavioral Symptoms of Anxiety and Depression and Brain Monoamine Contents in Rats after Chronic Intranasal Administration of Interferon- α . *Neurosci Behav Physi* 48(8): 954–962.
<https://doi.org/10.1007/s11055-018-0655-8>
 27. *Walf AA, Frye ChA* (2007) The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* 2: 322–328.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>
 28. *Grigoryeva VN, Tikhomirov GV* (2019) Topographic Disorientation in Patients with Brain Damage. *Neurosci Behav Physi* 49: 929–936.
<https://doi.org/10.1007/s11055-019-00821-0>
 29. *Carrarini C, Russo M, Dono F, Barbone F, Rispoli MG, Ferri L, Di Pietro M, Digiovanni A, Ajdinaj P, Speranza R, Granzotto A, Frazzini V, Thomas A, Pilotto A, Padovani A, Onofrij M, Sensi SL, Bonanni L* (2021) Agitation and Dementia: Prevention and Treatment Strategies in Acute and Chronic Conditions. *Front Neurol* 12: 644317.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2021.644317>
 30. *Larsen JB, Stunes AK, Vaaler A, Reitan SK* (2019) Cytokines in agitated and non-agitated patients admitted to an acute psychiatric department: A cross-sectional study. *PLoS One* 14(9): e0222242.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222242>
 31. *Stopper CM, Floresco SB* (2014) What's better for me? Fundamental role for lateral habenula in promoting subjective decision biases. *Nat Neurosci* 17(1): 33–35.
<https://doi.org/10.1038/nn.3587>

32. *Funahashi S* (2017) Prefrontal contribution to decision-making under free-choice conditions. *Front Neurosci* 11: 431.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00431>
33. *Vertechi P, Lottem E, Dario S, Godinho B, Treves I, Quendera T, Lohuis MNO, Mainen ZF* (2020) Inference-Based Decisions in a Hidden State Foraging Task: Differential Contributions of Prefrontal Cortical Areas. *Neuron* 106(1): 166–176.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.01.017>
34. *Amemori K, Amemori S, Gibson DJ, Graybiel AM* (2018) Striatal microstimulation induces persistent and repetitive negative decision-making predicted by striatal beta-band oscillation. *Neuron* 99(4): 829–841.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.07.022>
35. *McEwen BS, Nasca C, Gray JD* (2016) Stress Effects on Neuronal Structure: Hippocampus, Amygdala, and Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology* 41(1): 3–23.
<https://doi.org/10.1038/npp.2015.171>
36. *Mazzatenta A, Giugliano M, Campidelli S, Gambazzi L, Businaro L, Markram H, Prato M, Ballerini L* (2007) Interfacing neurons with carbon nanotubes: electrical signal transfer and synaptic stimulation in cultured brain circuits. *J Neurosci* 27(26): 6931–6936.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1051-07.2007>
37. *Cellot GI, Cilia E, Cipollone S, Rancic V, Sucapane A, Giordani S, Gambazzi L, Markram H, Grandolfo M, Scaini D, Gelain F, Casalis L, Prato M, Giugliano M, Ballerini L* (2009) Carbon nanotubes might improve neuronal performance by favouring electrical shortcuts. *Nat Nanotechnol* 4(2): 126–133.
<https://doi.org/10.1038/nnano.2008.374>
38. *Yang Z, Zhang Y, Yang Y, Sun L, Han D, Li H, Wang C* (2010) Pharmacological and toxicological target organelles and safe use of single-walled carbon nanotubes as drug carriers in treating Alzheimer disease. *Nanomedicine* 6(3): 427–441.
<https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.11.007>
39. *Zhu L, Chang DW, Dai L, Hong Y* (2007) DNA Damage Induced by Multiwalled Carbon Nanotubes in Mouse Embryonic Stem Cells. *Nano Lett* 7(12): 3592–3597.
<https://doi.org/10.1021/nl071303v>
40. *Villegas JC, Álvarez-Montes L, Rodríguez-Fernández L, González J, Valiente R, Fanarraga ML* (2014) Multiwalled carbon nanotubes hinder microglia function interfering with cell migration and phagocytosis. *Adv Healthc Mater* 3(3): 424–432.
<https://doi.org/10.1002/adhm.201300178>
41. *Aragon MJ, Topper L, Tyler CR, Sanchez B, Zychowski K, Young T, Herbert G, Hall P, Erdely A, Eye T, Bishop L, Saunders SA, Muldoon PP, Ottens AK, Campen MJ* (2017) Serum-borne bioactivity caused by pulmonary multiwalled carbon nanotubes induces neuroinflammation via blood-brain barrier impairment. *Proc Natl Acad Sci USA* 114(10): E1968–E1976.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1616070114>
42. *Johnston HJ, Hutchison GR, Christensen FM, Peters S, Hankin S, Aschberger K, Stone V* (2010) A critical review of the biological mechanisms underlying the in vivo and in vitro toxicity of carbon nanotubes: The contribution of physico-chemical characteristics. *Nanotoxicology* 4(2): 207–246.
<https://doi.org/10.3109/17435390903569639>
43. *Jiang T, Amadei CA, Gou N, Lin Y, Lan J, Vecitis CD, Gu AZ* (2020) Toxicity of Single-Walled Carbon Nanotubes (SWCNTs): Effect of Lengths, Functional Groups and Electronic Structures Revealed by a Quantitative Toxicogenomics Assay. *Environ Sci Nano* 7(5): 1348–1364.
<https://doi.org/10.1039/d0en00230e>
44. *Lee S, Khang D, Kim SH* (2015) High dispersity of carbon nanotubes diminishes immunotoxicity in spleen. *Int J Nanomed* 10(1): 2697–2710.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S80836>
45. *Zhang M, Yamaguchi T, Iijima S, Yudasaka M* (2013) Size-dependent biodistribution of carbon nanohorns in vivo. *Nanomedicine* 9(5): 657–664.
<https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.11.011>
46. *Dumortier H, Lacotte S, Pastorin G* (2006) Functionalized carbon nanotubes are non-cytotoxic and preserve the functionality of primary immune cells. *Nano Letters* 6(7): 1522–1528.
<https://doi.org/10.1021/nl061160x>
47. *Lu F, Gu L, Meziani MJ, Wang X, Luo PG, Veca LM, Cao L, Sun Y-P* (2009) Advances in Bio-applications of Carbon Nanotubes. *Adv Mater* 21(2): 139–152.
<https://doi.org/10.1002/adma.200801491>

Behavior of Rats in Tests for Anxiety after a Short Intranasal Injection of Single-Walled Carbon Nanotubes in Two Small Doses

E. V. Loseva^{a, *}, N. A. Loginova^a, L. I. Russu^b, and M. V. Mezentseva^b

^a*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

^b*Ivanovskii Institute of Virology, Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia*

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

Carbon nanotubes (CNTs) are very promising for use in various areas of human activity, including medicine, but they can have a negative effect on the body, in particular on the nervous system. CNTs in large doses in animal experiments often cause anxiety and depressive disorders. The effect of low doses of CNTs on the behavior of animals has been little studied. In the present work, we studied behavioral parameters in tests for anxiety in rats, which were intranasally injected daily for 4 days with a suspension of single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) in small doses, 5.2 or 52 µg/kg. It turned out that both doses of SWCNTs unidirectionally changed the following indicators of behavior in rats: in the open field test exploratory activity (rears) decreased; in the light-dark test the latency of entering to the dark box and peeping out of the dark box are increased; in the elevated plus maze test (EPM) behavior in the open arm was activated. However, if a dose of 5.2 µg/kg induced the rat behavior with signs of agitation (increased exploratory motor activity in the light-dark and EPM tests, and motor activity with frequent visits to different boxes or arms and exploratory activity in the light-dark and EPM tests), then a dose of 52 µg/kg, on the contrary, inhibited a number of behavioral responses, which was expressed in increased anxiety (increased the freezing in the open field and EPM) and in increased the latency of entry into the closed arm of the EPM. It is assumed that SWCNTs in small doses, when injected intranasally into the brain of rats, can dose-dependently disrupt the structural and functional state of nervous tissue cells and/or cause neuroinflammation in the structures involved in the mechanisms of anxiety and related conditions, as a result, the behavior of rats in tests for anxiety also changes in a dose-dependent manner.

Keywords: single-walled carbon nanotubes, small doses, intranasal injection, rat behavior, open field test, light-dark test, elevated plus maze test

МЕТОДИЧЕСКАЯ СТАТЬЯ

МОДЕЛИРОВАНИЕ ГИПЕРКОРТИКОСТЕРОНЕМии У КРЫС
С ПОМОЩЬЮ ОСМОТИЧЕСКИХ НАСОСОВ

© 2022 г. М. В. Онуфриев¹, *, Ю. В. Моисеева¹, Н. В. Гуляева¹, **

¹Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

*e-mail: mikeonuf1@mail.ru

**e-mail: nata_gul@ihna.ru

Поступила в редакцию 25.09.2022 г.

После доработки 12.10.2022 г.

Принята к публикации 12.10.2022 г.

Для моделирования ситуаций, связанных с воздействием различных стрессорных факторов на мозг, часто используют введение гормона надпочечников кортикостерона посредством инъекции или подкожной имплантации форм с его дозированной высвобождением. В настоящем методическом исследовании была изучена возможность применения осмотических насосов производства Alzet емкостью 200 мкл и скоростью высвобождения 1 мкл/ч, загруженных растворами кортикостерона 25, 50 и 100 мг/мл или растворителем (диметилсульфоксид/полиэтиленгликоль-400). Целью работы явилось выявление оптимальной концентрации раствора кортикостерона, загружаемого в осмотические насосы, для создания повышенного уровня гормона в крови и областях мозга крыс. Возрастные уровни кортикостерона в крови отмечено только на 3-и сутки в группе крыс, которым имплантировали осмотические насосы с максимальной концентрацией кортикостерона — 100 мг/мл (ОН-100). Также на 3-и сутки после имплантации в группе ОН-100 существенно возросла аккумуляция кортикостерона во фронтальной коре, неокортексе и гиппокампе. Таким образом, для создания повышенного уровня кортикостерона в крови и областях мозга крыс применимы осмотические насосы с раствором кортикостерона в диметилсульфоксид/полиэтиленгликоле-400, концентрацией гормона 100 мг/мл и скоростью высвобождения 1 мкл/ч.

Ключевые слова: кортикостерон, неокортекс, фронтальная кора, гиппокамп, осмотические насосы

DOI: 10.31857/S0869813922110085

Глюкокортикоидные гормоны (кортизол у человека и кортикостерон у грызунов) секретируются надпочечниками в результате действия стрессорных факторов и с кровью достигают всех органов и тканей организма. В связи с наличием глюкокортикоидных рецепторов практически во всех клетках глюкокортикоиды взаимодействуют с ними, запуская различные сигнальные каскады. В мозге экспрессия таких рецепторов высокая, особенно в нейронах лимбической системы мозга, в т.ч. гиппокампа. Особенно высока плотность минералокортикоидных и глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе, который обеспечивает реализацию когнитивных и эмоциональных процессов, а также контролирует гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую ось. Это позволяет реализовать контроль стрессорными гормонами определенных форм поведения, обеспечивая адекватные острые и долгосрочные

адаптивные реакции [1]. Однако избыток глюкокортикоидов может приводить к дегенерации и гибели нейронов гиппокампа. Избыточная аккумуляция кортико-стерона (КС) в гиппокампе и фронтальной коре крыс была описана нами при моделировании инсульта окклюзией средней мозговой артерии [2] и моделировании черепномозговой травмы латеральным гидродинамическим ударом [3]; в обеих моделях наблюдали также провоспалительные процессы в гиппокампе. Глюкокортикоидные гормоны, регулирующие многочисленные процессы в организме, в определенных ситуациях обладают выраженными противовоспалительными свойствами, хотя понимание механизмов про- и противовоспалительных свойств глюкокортикоидов до конца неясно, как и условий реализации таких механизмов в разных ситуациях [4]. Для выяснения участия глюкокортикоидов в различных патологических процессах в мозге оптимальным является воспроизводимое моделирование гиперкортикостеронемии у животных, исследование аккумуляции в отделах мозга КС и процессов, которые он запускает. Различные варианты введения КС посредством инъекции или подкожной имплантации лекарственных форм с дозированным высвобождением часто используют для моделирования острого или хронического стрессорного воздействия.

Противовоспалительные свойства глюкокортикоидов давно используются в клинике. Глюкокортикоиды широко применяются в качестве лекарственной терапии в различных патологических ситуациях, в том числе при хронических воспалительных заболеваниях, злокачественных новообразованиях или бронхиальной астме [5, 6]. Разработка стратегий лечения на основе глюкокортикоидов или моделирование хронического стресса в экспериментальных условиях часто требуют длительного и непрерывного введения глюкокортикоидов. Тем не менее, во многих исследованиях, в которых использовали непрерывное введение кортикостероидов, эффективность соответствующих систем доставки глюкокортикоидов не была протестирована и чаще всего их уровень не определяли ни в крови, ни тем более в областях мозга [7–9].

Среди применяемых методов одним из технически наименее затратным методом является доставка глюкокортикоидов через питьевую воду [10, 11]. Однако животные не пьют воду непрерывно, что может вызвать чрезмерные колебания концентраций циркулирующих глюкокортикоидов. Другим простым подходом является повторная подкожная или внутривнутрибрюшинная инъекция растворов глюкокортикоидов [12, 13]. Тем не менее, инъекции растворов глюкокортикоидов, во-первых, вызывают резкое возникновение пика их концентрации в плазме, после которого следует быстрое снижение их циркулирующего уровня и, во-вторых, повторные инъекции приводят к значительному стрессу у животных, а неконтролируемое высвобождение эндогенных кортикостероидов может маскировать изменения уровня экзогенных глюкокортикоидов в плазме. Напротив, микроосмотические насосы и медленно рассасывающиеся таблетки для подкожной имплантации могут, как заявляют их производители, обеспечивать постоянные скорости доставки кортикостероидов и исключают недостатки их повторных инъекций [14–16].

Доступные у компаний-производителей таблетки для имплантации емкостью от 0.001 до 200 мг КС позволяют моделировать гиперкортикостеронемию у крыс и мышей в широком диапазоне концентраций экзогенного КС, но являются дорогостоящим продуктом, а для формирования контрольной группы необходимы таблетки аналогичной емкости с холестерином, который не является абсолютно индифферентным веществом [17]. Альтернативу таблеткам составляют микроосмотические насосы с дозированным высвобождением загруженных в них растворов препаратов, которые более доступны по стоимости, однако в случае КС имеют ограничения по используемым концентрациям в связи с его низкой растворимостью в воде.

Цель настоящего исследования заключалась в выявлении оптимальной для осмотических насосов концентрации раствора КС, которая вызывает повышение его уровня в крови и в отделах мозга крыс, а также в определении динамики изменения уровня КС в крови из хвостовой вены индивидуально у каждого животного.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН и утвержденным правовым актам РФ и международных организаций. Протокол эксперимента утвержден Этической комиссией Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН. Самцы крыс линии Вистар были получены из Филиала “Андреевка” Федерального Государственного бюджетного учреждения науки “Научный центр биомедицинских технологий” Федерального медико-биологического агентства (Московская обл., РФ) и размещены в клетках вивария.

Подготовка осмотических насосов. В эксперименте были использованы самцы крыс линии Вистар массой 200–250 г. Из списка осмотических насосов (Alzet, США) была выбрана модель 2001 с максимальным объемом загрузки 200 мкл и высвобождением раствора со скоростью 1 мкл/ч в течение 7 дней. Навеску кортикостерона ацетата (КС, Serva, Германия) предварительно растворяли в 100%-ном диметилсульфоксиде (ДМСО), затем смешивали с полиэтиленгликолем-400 (ПЭГ-400) в соотношении 1 : 1 для получения растворов со следующими концентрациями КС – 25 мг/мл (ОН-25), 50 мг/мл (ОН-50) и 100 мг/мл (ОН-100), что соответствовало дневной дозе КС 2.5, 5 и 10 мг/кг/24 ч. Для приготовления раствора с максимальной концентрацией КС, 100 мг/мл, было необходимым нагревать и содержать раствор при 37°C, поскольку при комнатной температуре растворимость КС снижалась. Работу с заполнением насосов и их активацией проводили в стерильных условиях. Растворы ДМСО/ПЭГ-400 или КС в объеме 220 мкл шприцом вводили во внутреннюю камеру насосов, помещали в пробирки на 50 мл со стерильным 0.9%-ным раствором NaCl и оставляли на ночь в термостате при 37°C для активации.

Имплантация осмотических насосов. Операцию по имплантации насосов осуществляли в стерильных условиях. Крыс анестезировали с помощью изофлурана, на 2 см ниже шеи на спине сбривали шерсть и делали поперечный надрез длиной 5 мм, через который подкожно имплантировали осмотический насос, и с помощью кожного степлера закрывали раневую поверхность с последующей обработкой антисептиком.

Сбор и подготовка биологического материала. Кровь из хвостовой вены собирали у наркотизированных крыс до, а также на 1-е и 3-и сутки после имплантации насосов во временной интервал с 11 до 13 ч. На 3-и сутки после последнего забора крови из хвостовой вены крысы были выведены из эксперимента, и после декапитации животных был получен следующий биологический материал: постдекапитационная кровь, фронтальная кора (ФК), неокортекс (НК), включающий теменную, височную и затылочную доли, и гиппокамп (Гип). В дальнейшем кровь центрифугировали при 1500 g в течение 15 мин при охлаждении (4°C) для получения сыворотки. Выделенные регионы мозга гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера с использованием стандартного 0.01 М фосфатно-солевого буфера (состав в мМ: 10 фосфата натрия, 1.76 фосфата калия, 2.7 KCl, pH 7.3–7.5), содержащего 0.1% нонидета Р-40 и коктейль ингибиторов протеаз (Thermo Scientific, США). Полученные гомогенаты центрифугировали при 13000 g в течение 30 мин при охлаждении (4°C) для получения растворимой фракции белков (супернатант), которую аликвотировали и хранили при –80°C до проведения биохимических исследований.

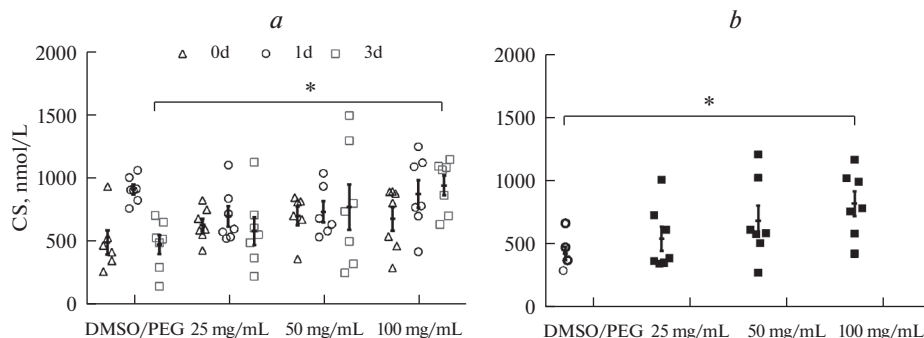


Рис. 1. Динамика изменения уровня КС в крови из хвостовой вены (а) и уровень КС в постдекапитационной крови (б) на 3-и сутки после имплантации осмотических насосов с различной концентрацией КС. * — отличия от контрольной группы (ДМСО/ПЭГ) на 3-и сутки при $p < 0.05$.

Определение уровня кортикостерона. Для определения уровня КС в сыворотке крови и супернатантах фронтальной коры, остатка коры и гиппокампа использовали наборы для иммуноферментного анализа Corticosterone ELISA (EIA-4164, DRG, Германия), с помощью которых детектировали как свободный, так и связанный с транспортными белками КС методом конкурентного иммуноферментного анализа.

Статистическая обработка результатов. Полученные данные проверяли на нормальность распределения с помощью W-критерия Shapiro–Wilk, результаты которого не отрицали нормальность распределения данных по всем исследованным показателям. Для статистической обработки данных по динамике изменения уровня КС в крови из хвостовой вены применяли дисперсионный анализ ANOVA (Repeated measures ANOVA) с последующим post-hoc анализом Tukey HSD test. Для сопоставления данных при сравнении значений показателей в экспериментальных группах с контрольной группой животных на 3-и сутки после имплантации насосов использовали One-way ANOVA с последующим Tukey HSD test. Достоверно различающимися считали группы при $p < 0.05$, а при $p < 0.1$ имеющими тенденцию к различию. Результаты представлены в виде $M \pm SEM$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исходно уровень КС в крови из хвостовой вены (рис. 1а) статистически значимо не различался в исследуемых группах. На 1-е сутки после имплантации осмотических насосов с различной концентрацией КС (ОН-25, ОН-50, ОН-100) существенных различий между группами не наблюдали, и повышение уровня КС в контрольной группе из-за разброса данных не было статистически значимым. Возрастание уровня КС происходило на 3-и сутки только в группе ОН-100, и вдвое превышало уровень гормона в контрольной группе в этой временной точке. На уровень КС оказывали статистически значимое влияние факторы “время” ($F(2.42) = 4.49$; $p = 0.01$), “группа” ($F(3.21) = 3.99$; $p = 0.02$) и с тенденцией к достоверности взаимодействие факторов “время” и “группа” ($F(6.42) = 2.02$; $p = 0.09$).

Дозозависимое повышение уровня КС на 3-и сутки в постдекапитационной крови происходило после имплантации насосов ОН-25, ОН-50, ОН-100, но статистически значимые отличия от контроля наблюдались только в группе ОН-100 (рис. 1б). На уровень КС оказывал достоверное влияние фактор “группа” ($F(3.22) = 3.26$; $p = 0.04$).

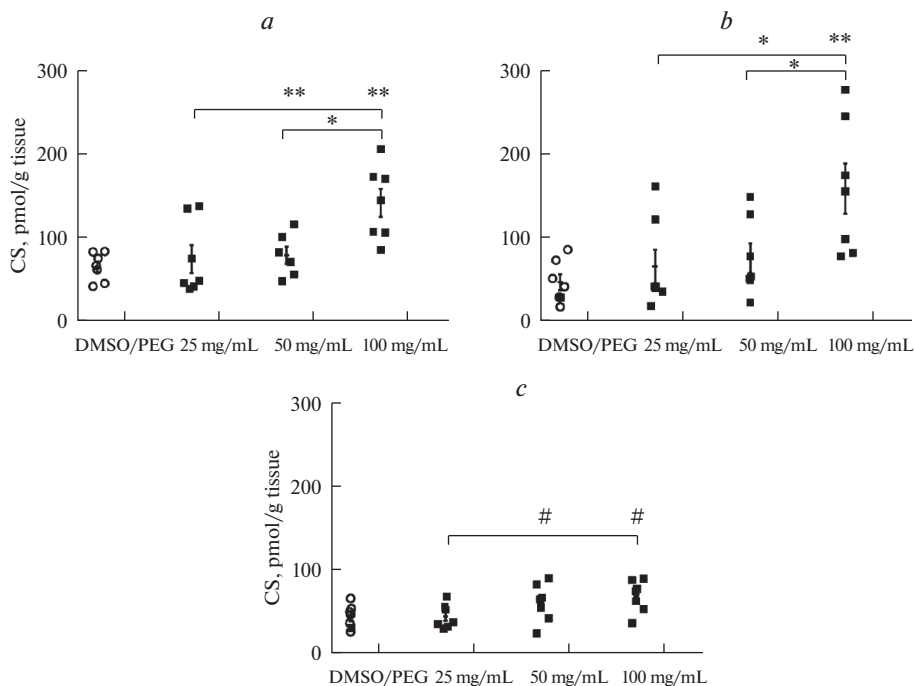


Рис. 2. Уровень КС во фронтальной коре (а), неокортексе (b) и гиппокампе (с) на 3-и сутки после имплантации осмотических насосов с различной концентрацией КС. **, *, # – различия между группами или отличие от контрольной группы (ДМСО/ПЭГ) при $p < 0.01$, $p < 0.05$ и $p < 0.1$ соответственно.

Во фронтальной коре группы ОН-100 (рис. 2а) аккумуляция КС на 3-и сутки после имплантации осмотических насосов статистически значимо превышала контрольный уровень более чем в 2 раза. Уровень КС во фронтальной коре группы ОН-100 также был достоверно выше, чем в группах ОН-25 и ОН-50, при этом в группах ОН-25 и ОН-50 данный показатель не отличался от контрольного уровня. Уровень КС во фронтальной коре статистически значимо зависел от фактора “группа” ($F(3.23) = 6.91$; $p = 0.002$). Похожая ситуация наблюдалась и в неокортексе (рис. 1b), где в группе ОН-100, ОН-25 и ОН-50 уровень КС был статистически значимо выше контроля – в 3.3, 2.4 и 2.1 раза соответственно. В неокортексе на уровень КС статистически значимо влиял фактор “группа” ($F(3.24) = 5.75$; $p = 0.004$). По сравнению с фронтальной корой и неокортексом в гиппокампе (рис. 2с) КС накапливался в меньшей степени и его уровень в группе ОН-100 превышал таковой в контроле и группе ОН-25 с тенденцией к достоверности в 1.5 раза. Фактор “группа” ($F(3.24) = 3.25$; $p = 0.04$) также оказывал достоверное влияние на уровень КС в гиппокампе.

Корреляционный анализ по Спирмену выявил возможные взаимосвязи между уровнем КС на 3-и сутки в постдекапитационной крови и в неокортексе в группах ОН-25 ($r = 0.85$, $p < 0.05$) и ОН-50 ($r = 0.86$, $p < 0.05$), однако в группе ОН-100 данная корреляция отсутствовала. В группе ОН-50 обнаружены корреляции между уровнем КС на 3-и сутки в постдекапитационной крови и в гиппокампе ($r = 0.93$, $p < 0.05$) и между уровнем КС в неокортексе и в гиппокампе ($r = 0.96$, $p < 0.05$). Тем не менее, в группе ОН-100, как и в группе ОН-50, сохранилась корреляция между

уровнем КС в неокортексе и в гиппокампе ($r = 0.89$, $p < 0.05$) и возникла корреляция между уровнем КС в неокортексе и фронтальной коре ($r = 0.93$, $p < 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В связи с очевидной научной и трансляционной значимостью исследования влияния стресса на организм применяют подходы моделирования гиперкортикоsterонемии и повышенного связывания кортикоsterона с рецепторами в тканях в условиях введения экзогенного кортикоsterона. При этом используются различные подходы, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки. В исследовании Негтманн и соавт. [18] сравнивали три метода введения экзогенного КС. Экспериментальным группам мышей осуществляли однократную подкожную инъекцию КС (10 мг/кг), подкожную имплантацию осмотических насосов (скорость высвобождения КС 0.22 мкл/ч, концентрация раствора КС 150 мг/мл, дневная доза 30 мг/кг/24 ч) и подкожную имплантацию таблеток емкостью 10 мг КС. В результате подкожной инъекции уровень КС в плазме крови мышей возрос через 1 ч, а через 4 ч не отличался от исходного уровня. Имплантация таблеток индуцировала гиперкортикоsterонемиию через 24 ч, однако в последующие 7 дней уровень КС не отличался от исходного. При этом применение осмотических насосов не вызвало существенных изменений уровня КС в плазме крови на 7- и 14-й дни после имплантации, что, по-видимому, связано с отсутствием ранних точек регистрации, например, 24 и 48 ч [18]. Тем не менее, после имплантации мышам (возраст 7 нед., масса тела 20 ± 1.5 г) осмотических насосов с раствором КС концентрацией 18 мг/мл и скоростью высвобождения 0.5 мкл/ч (10.8 мг/кг/24 ч) максимальная концентрация КС в крови самцов и самок зарегистрирована на 2-е сутки после имплантации, на 9- и 15-сутки она снижалась, но все еще превышала контрольный уровень КС. Через 2 нед. в поле СА3 гиппокампа самцов мышей выявили более выраженную атрофию нейронов, чем у самок [19].

В преобладающей части исследований, в которых применяли осмотические насосы с раствором КС, использовали различные линии мышей, и только в единичных работах осмотические насосы с КС имплантировали крысам, что, по-видимому, отчасти связано с большей вариабельностью в выборе концентрации малорастворимого КС в пересчете на массу животного с меньшей массой тела. К тому же не во всех найденных публикациях, где использовали крыс, детектировали уровень КС в крови [20]. В одной из них максимальная концентрация раствора КС в осмотических насосах, имплантированных 15-дневным крысятам, составляла 50 мг/мл в растворе ПЭГ-400. В результате применения данных насосов (скорость высвобождения КС 1 мкл/ч и время экспозиции 3 дня) уровень КС в крови через 24 ч после операции возрос почти в два раза, что, как справедливо считают авторы, укладывается в физиологический диапазон колебаний концентрации циркулирующего КС. В дальнейшем на 28-й день у крысят после введения КС регистрировали ухудшение гиппокамп-зависимого обучения. С учетом средней массы тела крысят, составлявшей 72.2 ± 2.8 г, дневная доза КС была 16.6 мг/кг/24 ч [21].

В нашем исследовании на взрослых крысах в группах ОН-25 (2.7 мг КС/кг/24 ч) и ОН-50 (5.4 мг КС/кг/24 ч) уровень КС хотя и повышался в крови из хвостовой вены и постдекапитационной крови на 1-е и 3-и сутки, но эти изменения не были статистически значимыми. Только в группе ОН-100 (10.8 мг КС/кг/24 ч) содержание КС почти в два раза возросло в крови из хвостовой вены и постдекапитационной крови через 3 дня после имплантации, и с учетом циркадианных колебаний концентрации циркулирующего КС выявленное его повышение укладывается в физиологический диапазон. Очевидно, что степень влияния экзогенного КС на регуляцию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы неодинакова у

молодых и взрослых крыс, и нарушение механизма этой регуляции по отрицательной обратной связи более выражено у молодых крыс, чем у взрослых.

В доступной научной литературе не найдены работы, где после имплантации осмотических насосов или таблеток с КС кроме оценки уровня циркулирующего КС определяли его содержание в областях мозга. В нашем исследовании впервые зарегистрирована аккумуляция КС во фронтальной коре, неокортексе и гиппокампе на 3-и сутки после имплантации ОН-100, что совпадало с его повышенным уровнем в крови.

Таким образом, для создания повышенного уровня КС в крови и областях мозга крыс применимы осмотические насосы с раствором КС в ДМСО/ПЭГ-400, с концентрацией КС 100 мг/мл и скоростью высвобождения 1 мкл/ч.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 20-65-47029).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ.

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Н.В.Г., М.В.О.), сбор и обработка данных (Ю.В.М.), написание и редактирование манускрипта (М.В.О., Н.В.Г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gulyaeva NV* (2019) Biochemical Mechanisms and Translational Relevance of Hippocampal Vulnerability to Distant Focal Brain Injury: The Price of Stress Response. *Biochemistry (Mosc)* 84: 1306–1328.
<https://doi.org/10.1134/S0006297919110087>
2. *Onufriev MV, Moiseeva YV, Zhanina MY, Lazareva NA, Gulyaeva NV* (2021) A Comparative Study of Koizumi and Longa Methods of Intraluminal Filament Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats: Early Corticosterone and Inflammatory Response in the Hippocampus and Frontal Cortex. *Int J Mol Sci* 22: 13544.
<https://doi.org/10.3390/ijms222413544>
3. *Komoltsev IG, Tretyakova LV, Frankevich SO, Shirobokova NI, Volkova AA, Butuzov AV, Novikova MR, Kvichansky AA, Moiseeva YV, Onufriev MV, Bolshakov AP, Gulyaeva NV* (2022) Neuroinflammatory Cytokine Response, Neuronal Death, and Microglial Proliferation in the Hippocampus of Rats During the Early Period After Lateral Fluid Percussion-Induced Traumatic Injury of the Neocortex. *Mol Neurobiol* 59: 1151–1167.
<https://doi.org/10.1007/s12035-021-02668-4>
4. *Bolshakov AP, Tretyakova LV, Kvichansky AA, Gulyaeva NV* (2021) Glucocorticoids: Dr. Jekyll and Mr. Hyde of Hippocampal Neuroinflammation. *Biochemistry (Mosc)* 86: 156–167.
<https://doi.org/10.1134/S0006297921020048>
5. *Buttgereit F, Burmester GR, Lipworth BJ* (2005) Optimised glucocorticoid therapy: the sharpening of an old spear. *Lancet* 365: 801–803.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)17989-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17989-6)
6. *Strehl C, Buttgereit F* (2013) Optimized glucocorticoid therapy: teaching old drugs new tricks. *Mol Cell Endocrinol* 380: 32–40.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.01.026>
7. *Holmes MC, French KL, Seckl JR* (1997) Dysregulation of diurnal rhythms of serotonin 5-HT_{2C} and corticosteroid receptor gene expression in the hippocampus with food restriction and glucocorticoids. *J Neurosci* 17: 4056–4065.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-11-04056.1997>
8. *Bush VL, Middlemiss DN, Marsden CA, Fone KC* (2003) Implantation of a slow release corticosterone pellet induces long-term alterations in serotonergic neurochemistry in the rat brain. *J Neuroendocrinol* 15: 607–613.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2003.01034.x>

9. *Mueller AD, Pollock MS, Lieblich SE, Epp JR, Galea LA, Mistlberger RE* (2008) Sleep deprivation can inhibit adult hippocampal neurogenesis independent of adrenal stress hormones. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R1693–R1703.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00858.2007>
10. *Coll AP, Challis BG, Lopez M, Piper S, Yeo GS, O'Rahilly S* (2005) Proopiomelanocortin deficient mice are hypersensitive to the adverse metabolic effects of glucocorticoids. *Diabetes* 54: 2269–2276.
<https://doi.org/10.2337/diabetes.54.8.2269>
11. *Stone EA, Lin Y* (2007) An anti-immobility effect of exogenous corticosterone in mice. *Eur J Pharmacol* 580: 135–142.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.10.045>
12. *Man MS, Young AH, Ister-Williams RH* (2002) Corticosterone modulation of somatodendritic 5-HT_{1A} receptor function in mice. *J Psychopharmacol* 16: 245–252.
<https://doi.org/10.1177/026988110201600310>
13. *Yau SY, Li A, Zhang ED, Christie BR, Xu A, Lee TM, So KF* (2014) Sustained running in rats administered corticosterone prevents the development of depressive behaviors and enhances hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity without increasing neurotrophic factor levels. *Cell Transplant* 23: 481–492.
<https://doi.org/10.3727/096368914X678490>
14. *Nuber UA, Kriacucionis S, Roloff TC, Guy J, Selfridge J, Steinhoff C* (2005) Up-regulation of glucocorticoid-regulated genes in a mouse model of Rett syndrome. *Hum Mol Genet* 14: 2247–2256.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddi229>
15. *Herrmann M, Henneicke H, Street J, Modzelewski J, Kalak R, Buttgerit F, Dunstan CR, Zhou H, Seibel MJ* (2009) The challenge of continuous exogenous glucocorticoid administration in mice. *Steroids* 74: 245–249.
<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2008.11.009>
16. *Claflin DI, Schmidt KD, Vallandingham ZD, Kraszpulski M, Hennessy MB* (2017) Influence of postnatal glucocorticoids on hippocampal-dependent learning varies with elevation patterns and administration methods. *Neurobiol Learn Mem* 143: 77–87.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2017.05.010>
17. *Leal-Galicia P, Sánchez-Torres M, Meraz-Ríos M* (2019) Cholesterol or Fat Rich Diets Accelerate Natural Age-Decline on Adult Hippocampal Neurogenesis and Have an Impact in Memory and Like-Anxiety Behavior. *Advanc Biosci Biotechnol* 10: 331–345.
<https://doi.org/10.4236/abb.2019.1010026>
18. *Herrmann M, Henneicke H, Street J, Modzelewski J, Kalak R, Buttgerit F, Dunstan CR, Zhou H, Seibel MJ* (2009) The challenge of continuous exogenous glucocorticoid administration in mice. *Steroids* 74: 245–249.
<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2008.11.009>
19. *Liu HH, Payne HR, Wang B, Brady ST* (2006) Gender differences in response of hippocampus to chronic glucocorticoid stress: role of glutamate receptors. *J Neurosci Res* 83: 775–786.
<https://doi.org/10.1002/jnr.20782>
20. *Callaghan BL, Richardson R* (2014) Early emergence of adult-like fear renewal in the developing rat after chronic corticosterone treatment of the dam or the pups. *Behav Neurosci* 128: 594–602.
<https://doi.org/10.1037/bne0000009>
21. *Claflin DI, Greenfield LR, Hennessy MB* (2014) Modest elevation of corticosterone in preweanling rats impairs subsequent trace eyeblink conditioning during the juvenile period. *Behav Brain Res* 258: 19–26.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.10.008>

Modeling Hypercorticotestosterone in Rats Using Osmotic Pumps

M. V. Onufriev^{a, *}, Yu. V. Moiseeva^a, and N. V. Gulyaeva^{a, **}

^a*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

*e-mail: mikeonuf1@mail.ru

**e-mail: nata_gul@ihna.ru

Administration of the adrenal hormone corticosterone by injection or subcutaneous implantation of dosed release forms is often used to model situations involving the effects of various stressors on the brain. This methodological study investigated the possibility of using osmotic pumps (OP) manufactured by Alzet with a capacity of 200 μ L and a release rate of 1 μ L/h loaded with corticosterone solutions of 25, 50 and 100 mg/mL or a

solvent (dimethyl sulfoxide/polyethylene glycol-400). The purpose of the work was to determine the optimal concentration of corticosterone solution loaded into osmotic pumps to create an increased level of hormone in the blood and brain regions of rats. An increase in blood corticosterone levels was observed only on day 3 in the group of rats implanted with osmotic pumps with a maximum corticosterone concentration of 100 mg/mL (OP-100). Corticosterone accumulation in the frontal cortex, neocortex and hippocampus increased significantly by day 3 after implantation in the OP-100 group. Thus, osmotic pumps with a corticosterone solution in DMSO/PEG-400, at hormone concentration of 100 mg/mL and release rate of 1 μ L/h can be used to create an elevated corticosterone level in the blood and brain regions of rats.

Keywords: corticosterone, neocortex, frontal cortex, hippocampus, osmotic pumps