

СОДЕРЖАНИЕ

Обзорные и проблемные статьи

Biophotons and visual phenomena <i>V. I. Govardovskii</i>	927
Лизосфинголипиды крови в диагностике заболеваний, ассоциированных с дисфункцией лизосом <i>Т. С. Усенко, Г. В. Байдакова, Е. Ю. Захарова, С. Н. Пчелина</i>	952

Экспериментальные статьи

Активность фактора Виллебранда у крыс после кратковременной ишемии головного мозга <i>В. Н. Шуваева, О. П. Горшкова</i>	964
Этосуксимид повышает исследовательскую мотивацию и улучшает эпизодическую память в тесте распознавания нового объекта у крыс линии WAG/Rij с генетической абсанс-эпилепсией <i>Е. А. Федосова, А. Б. Шацкова, К. Ю. Саркисова</i>	974
Взаимосвязь между гемодинамическими реакциями на холодовой стресс и изменениями уровня слюварного кортизола <i>Д. Б. Дёмин</i>	994
Роль NO и H ₂ S в регуляции тонуса церебральных сосудов при хронической болезни почек <i>Г. И. Лобов, И. Б. Соколова</i>	1002
Степень активации гемопоэза с помощью суммарной РНК зависит от способа ее парентерального введения <i>Н. В. Тишевская, Н. М. Геворкян</i>	1016
Уремический синдром вызывает нарушение деформационно-функциональных характеристик эритроцитов у пациентов хронического гемодиализа <i>Ю. А. Борисов, Ю. С. Судницына, Т. Д. Власов, Л. В. Дульнева, В. О. Аболмасов, И. В. Миндукшев, А. В. Смирнов</i>	1025
Влияние глюкагоноподобных пептидов и оксинтомодулина на экскрецию ионов натрия почками у крыс <i>Е. В. Балботкина, Т. А. Каравашкина, Т. В. Ковалева, А. В. Кутина</i>	1041

От редакции

Памяти Виктора Исаевича Говардовского	1055
---------------------------------------	------

CONTENTS

Reviews and Topical Articles

Biophotons and Visual Phenomena <i>V. I. Govardovskii</i>	927
Blood Lysosphingolipids in the Diagnosis of Diseases Associated with Lysosomal Dysfunction <i>T. S. Usenko, G. V. Baydakova, E. Y. Zakharova, and S. N. Pchelina</i>	952

Experimental Articles

The Von Willebrand Factor Activity in Rats after Short-Term Cerebral Ischemia <i>V. N. Shuvaeva and O. P. Gorshkova</i>	964
Ethosuximide Increases Investigatory Motivation and Improves Episodic Memory in the Novel Object Recognition Test in WAG/Rij Rats with Genetic Absence Epilepsy <i>E. A. Fedosova, A. B. Shatskova, and K. Yu. Sarkisova</i>	974
The Relationship Between Hemodynamic Reactions to Cold Stress and Changes of Salivary Cortisol Levels <i>D. B. Demin</i>	994
Role of NO and H ₂ S in the Regulation of the Tone of Cerebral Vessels in Chronic Kidney Disease <i>G. I. Lobov and I. B. Sokolova</i>	1002
Comparative Analysis of the Effectiveness of Various Routes of Administration of Total RNA <i>N. V. Tishevskaya and N. M. Gevorkyan</i>	1016
Uremic Syndrome Triggers Red Blood Cell Deformability Alteration in Hemodialysis Patients <i>Yu. A. Borisov, J. S. Sudnitsyna, T. D. Vlasov, L. V. Dulneva, V. O. Abolmasov, I. V. Mindukshev, and A. V. Smirnov</i>	1025
Effect of Glucagon-Like Peptides and Oxyntomodulin on Urinary Sodium Excretion in Rats <i>E. V. Balbotkina, T. A. Karavashkina, T. V. Kovaleva, and A. V. Kutina</i>	1041

Editorials

In Memory of Viktor Isaevich Govardovskii	1055
---	------

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

BIOPHOTONS AND VISUAL PHENOMENA¹

© 2020 V. I. Govardovskii*

*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology
and Biochemistry Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia*

**E-mail: michael.firsov@gmail.com*

Поступила в редакцию 13.06.2020 г.

После доработки 23.06.2020 г.

Принята к публикации 12.07.2020 г.

The review considers modern un-orthodox ideas on the origin of visual phenomena of apparently various nature (photoreceptors' dark light, negative afterimages, and various sorts of phosphenes such as electrophosphenes, magnetophosphenes, radiation phosphenes, and mechanophosphenes). The new framework provides a unifying explanation for all the phenomena that are suggested to be a perception of biophotons (ultra-weak photon emission, UPE) that are generated mostly by lipid peroxidation (LPO) during routine cellular metabolism. In the paper, the biochemical mechanism of biophotons' generation is briefly explained. It is concluded that the outer segments of retinal photoreceptors provide an excellent substrate for LPO thus being a good candidate for UPE production. Experiments show that the retina in complete darkness indeed emits an extremely low level of bioluminescence. Yet its intensity is two orders of magnitude below the dark-adapted visual threshold, and over 100 times smaller than necessary to generate the photoreceptors' dark noise. UPE also cannot be a source of afterimages because its intensity is far too low. Besides, the background light necessary to produce a negative afterimage is actually supplied by the ambient light that passes into the eye through closed lids. All other sorts of phosphenes attributed to UPE cannot be produced by biophotons since it is known for at least 200 years that the phosphenes are seen in daylight, that is, at the intensities billions of times brighter than the intensity of UPE. Thus, the new explanatory framework for all visual phenomena based on UPE should be discarded in its entirety.

Keywords: biophotons, retina, retinal dark light, afterimage, visual phosphenes

DOI: 10.31857/S0869813920080117

The biophoton saga began in 1923–1924 when a Russian biologist Alexander Gurwitsch (sometimes spelled as Gurvich) discovered a non-contact interaction between two living tissue samples that were in the active mitotic state. A damaged and repairing area of frog

¹ Виктор Исаевич Говардовский участвовал в конкурсе, объявленном РФФИ на получение гранта на написание обзорных статей для российских научных журналов ("Экспансия"). Его заявка, поддержанная редакцией РФЖ, победила на конкурсе, а сама работа над статьей была завершена в июне 2020. Виктор Исаевич послал ее в редакцию буквально в день своей госпитализации и последовавшего вскоре ухода из жизни. Публикуемой статье суждено стать последним вкладом в обширный перечень его научных трудов. Редакция журнала скорбит о потере вместе со всеми знавшими и ценившими этого замечательного физиолога и человека. Редколлегия. Viktor Isaevich Govardovskii applied for a grant for writing review articles for Russian scientific journals ("Expansion") called by the Russian Foundation for Basic Research in 2019 based on the request from the Editorial Board. His application was supported by the Foundation, and the paper was finished in June 2020. Viktor Isaevich submitted his paper from the hospital, where he soon passed away. This article is destined to be the last contribution to the extensive list of his scientific works. The editors mourn the loss along with everyone who knew and appreciated this remarkable physiologist and person. Editorial board.

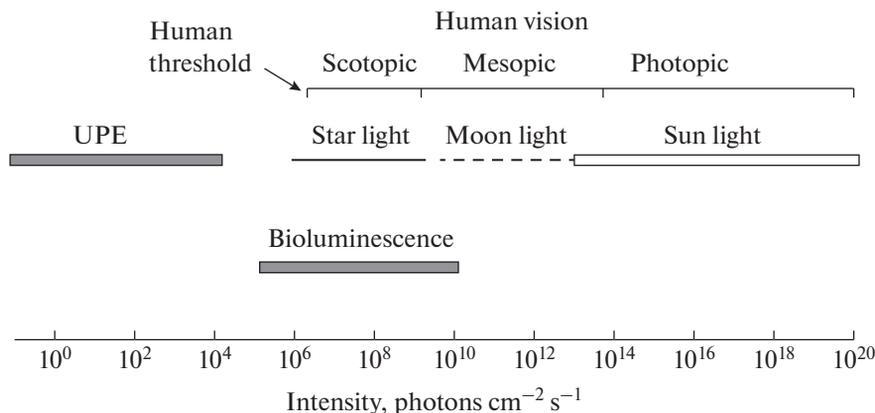


Fig. 1. Range of UPE intensity compared with natural lighting conditions and range of human vision. Photon flux density is for 555-nm wavelength, at the maximum of human diurnal sensitivity.

skin, growing onion roots, or the cells of corneal epithelium induced mitoses in spatially separated pieces of the corresponding tissue. Further, it has been shown that the interaction is mediated by a sort of electromagnetic radiation, probably in the ultraviolet (UV) part of the spectrum. Gurwitsch called the radiation “the mitogenetic rays” and connected it to his previously conceived idea of a “mitogenetic field” that controls embryonic development [1–3].

There was a burst of research activity in the field during 1920–1950s aimed at designing methods of physical detection of the newly discovered radiation, and on studying its properties. The results were often disappointing, perhaps due to the insufficient sensitivity of light detectors available at that time. The history of confusions is described in detail in a recent review [4]. Finally, the entire field was qualified by Nobel physicist Langmuir as a “pathological science” ([5], original Langmuir’s lecture of 1953 transcribed and reprinted by Hall, 1989).

However, further development of high-sensitive photomultipliers working at liquid nitrogen temperature left no doubt about the existence of spontaneous weak photon emission from essentially any biological tissue. Modern cooled CCD cameras create images of biological objects in their own light, by accumulating pixels activated by single photons [6–9]. Thus the studies of the “ultra-weak photon emission” (UPE), or biophotons, form now a respectable (albeit inhomogeneous) field of research. UPE is also used now to provide a unifying explanation of various visual phenomena not related to each other, such as retinal “dark light,” afterimages, radiation phosphenes, electrophosphenes, magnetophosphenes, and mechanophosphenes. The presented review deals specifically with this field of research.

What is UPE?

There is no strict definition of the Ultra-weak Photon Emission. The term mostly applies to any sort of light emission from living sources that is too weak to be seen with a dark-adapted human eye (Fig. 1). It is also tacitly assumed that biophotons are mostly produced as a byproduct of routine cellular oxidative metabolism. This, at least, clearly opposes the situations when biochemical machinery is specially designed to provide bright visible light that is used for orientation and signalization (e.g., various versions of luciferin-luciferase systems).

Table 1. Main ROS responsible for UPE

Electronically excited species	Emission wavelength
Triplet excited carbonyl	350–560 nm
Singlet excited pigment (melanin)	360–560 nm
Dimolar singlet oxygen	634, 703 nm
Monomolar singlet oxygen	1270 nm

However, such a definition is a bit dubious. The same biochemistry, dependent on conditions, may probably generate the emission either barely detectable by best available sensors, or quite visible with a naked eye. On the other hand, it is often implied that UPE may serve various physiological functions within organisms, from the control of embryonic development (“mitogenetic rays”) to information transmission in the nervous system, and consciousness. Then the UPE should be produced quite purportedly in a controlled way rather than being a waste byproduct of metabolism. In these hypothetical scenarios, “ultra-weakness” may be either necessary or irrelevant, or even deteriorating to supposed functions.

Therefore, one should keep in mind that the term “UPE” or “biophotons” in the literature (and within this review) may have different meanings depending on the context.

Mechanisms of UPE generation

Biophotons are generated in reactions initiated by Reactive Oxygen Species (ROS). There are various sorts of ROSs and multiple mechanisms of their production, for instance, by UV light, ionizing electromagnetic radiation (X-rays and γ -rays), high-energy particles, and chemically induced oxidative stress. At this place, however, we are interested in mechanisms of ROS production by organisms in their normal functional state. The most important of them are listed in Table 1 [10].

Among them, the triplet excited carbonyls are the most intensely emitting in the visible part of the spectrum [10–12], so they are the most appropriate to produce visual phenomena.

Primary radicals are generated in routine cellular oxidative metabolism. There are numerous reviews on the topics. Some explanation of general principles with omitting technical details is given in [10, 13, 14]. A comprehensive review [15] also provides a historical background, including a significant body of Russian works.

Three of the most relevant intracellular sources of ROS are shown in Fig. 2.

Mitochondria

At certain steps in the electron transport chain in mitochondria, approximately 1/20 of total electron flow is diverted from the ATP-forming pathway and produces superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$). The latter is further converted by mitochondrial superoxide dismutase (mSOD) to hydrogen peroxide (H_2O_2), which can exit to the cytoplasm (Fig. 2A).

5-lipoxygenase

5-lipoxygenase (5-LOX) is normally membrane-associated enzyme that is involved in the synthesis of leukotrienes from arachidonic acid (AA). It oxidizes two AA, thus forming two superoxide anions, which are then converted to H_2O_2 by cytoplasmic superoxide dismutase (cSOD) (Fig. 2B).

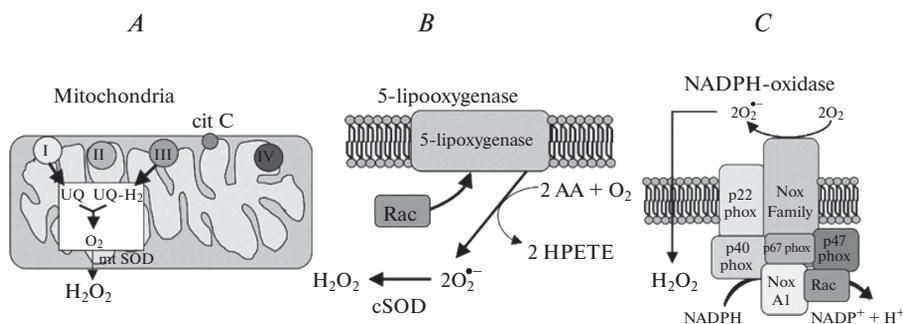


Fig. 2. Three principal sources of ROS in routine cellular metabolism (after [10]). *A.* Cit C, cytochrome C; UQ, ubiquinone; mt SOD, mitochondrial superoxide dismutase. *B.* AA, arachidonic acid; HPETE, arachidonic acid hydroperoxide, cSOD, cytoplasmic superoxide dismutase. *C.* NADPH-oxidase is a multi-subunit enzyme complex whose components are either transmembrane or cytosolic membrane-associated proteins.

NADPH oxidase

NADPH oxidase (NOX) is a transmembrane protein complex that catalyzes the production of superoxide radicals and further H_2O_2 by oxidizing NADPH with extracellular O_2 (Fig. 2C). The set of NOX subunits is different in phagocytic- and non-phagocytic cells. Fig. 2C shows the composition of NOX in non-phagocytic cells.

In all the three cases, the same ROS, superoxide $\text{O}_2^{\cdot -}$ is primarily formed. It is toxic, so within the cell, it is converted by SOD to hydrogen peroxide. H_2O_2 further yields superoxide anion OH^{\cdot} and hydroperoxyl radical HOO^{\cdot} , which play a major role in lipid peroxidation and biophoton emission.

Lipid peroxidation and chemiluminescence

The primary source of biophoton emission in living tissues is lipid peroxidation [11, 12, 15, 16]. The free-radical lipid peroxidation is a chain reaction in which one radical can initiate the oxidation of many lipid molecules, mainly phospholipids containing polyunsaturated fatty acids (PUFA) (for a review see [16]).

PUFAs contain several double bonds in their carbon chain. In many, the *cis*-double bonds are separated from each other by a methylene bridge ($-\text{CH}_2-$). The bridge contains two hydrogens that readily react with ROS, such as superoxide anion OH^{\cdot} and hydroperoxyl radical HOO^{\cdot} . As a result, water and a fatty acid radical L^{\cdot} are formed (Fig. 3). The radical initiates a branched-chain reaction in which multiple copies of the initial radical (along with other products) are generated (propagation reactions, Fig. 4). The chain reaction terminates in a series of reactions when two radicals interact to form a non-radical product. One of the intermediates is a triplet excited carbonyl in the fatty acid chain that, when returning to the singlet state, emits visible photons (Fig. 4) [10–12].

The retina contains a high concentration of PUFA, the highest of any vertebrate tissue [17]. Most of PUFAs is situated in outer segments of photoreceptor that consist of stacks of hundreds or thousands of membrane discs. Half of all acyl chains in phospholipids of the outer segments of photoreceptors belong to 22:6n-3 fatty acids, mainly docosahexaenoic acid (Fig. 3, 4) [18]. High level of oxidative metabolism in retinal rods and cones and a high content of PUFAs in their outer segments makes photoreceptors an excellent potential source of biophoton emission whose level could depend on the cells' state. Combined with possible high sensitivity of rods and cones to their UPE, it makes the recent ideas that UPE can be a source of various visual phenomena worth considering [19–21].

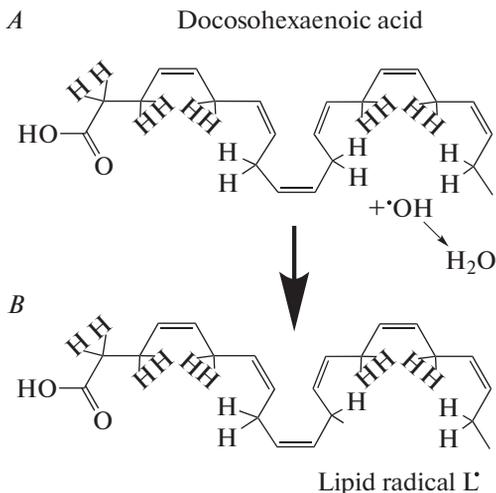


Fig. 3. Formation of lipid radicals by the interaction of a superoxide anion with a methylene bridge in PUFA.

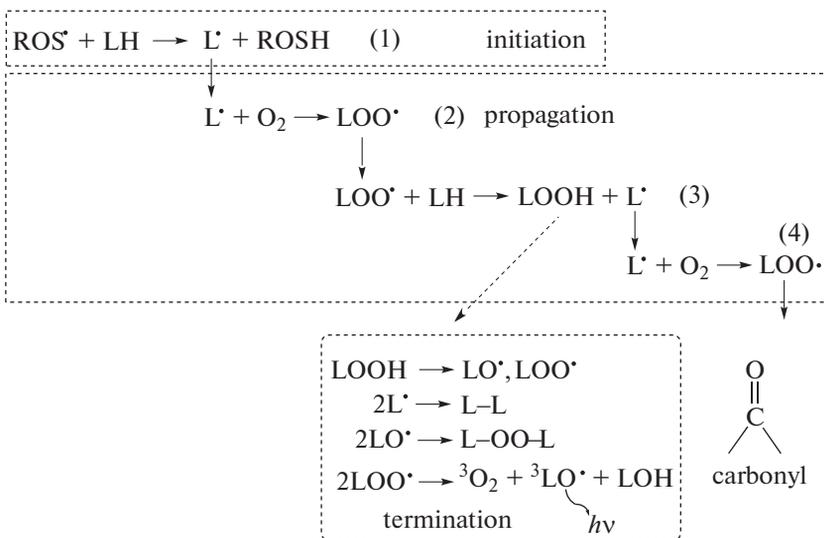


Fig. 4. Branched-chain reactions of lipid peroxidation. In the initiation reaction (1), ROS oxidizes a lipid thus forming a lipid radical L•. In propagation reaction (2), L• interacts with molecular oxygen and produces various forms of active lipids, including a copy of initial L•, thus starting a new chain of oxidation (reactions 3, 4). The multiplication of chains terminates by a series of reactions when two radicals interact to yield non-radical products and a carbonyl instead of the methylene bridge in the fatty acid chain. The carbonyl is in the triplet excited state and transits to the singlet state emitting a visible photon.

Application of UPE to research, and suggested functions of biophotons

It is believed that in most cases, the UPE is produced as a byproduct of cellular metabolism (see above). Hence, starting from the first successful attempts to quantitatively measure the UPE, it has been used to study the underlying biochemical mechanisms. The experiments were often done *in vitro* on cell cultures and other bulk biochemical prepara-

tions. This provided a large amount of the sample (hence large signal) and allowed precise control of experimental conditions. Essentially all the available knowledge on the mechanisms of UPE production is gained from this sort of research (reviewed in [8, 15, 22]).

On the other hand, UPE can serve as a sensor to study metabolic processes and their alterations in normal and pathological conditions *in vivo* on the intact organism. Alexander Gurwitsch attempted to apply “mitogenic rays” for tumor diagnostics and was awarded in 1941 the Stalin prize supposedly for establishing the method at the governmental clinics in Moscow [23]. Whatever real were the early results, presently, it is hoped that modern high-sensitive techniques of UPE registration and imaging may provide a minimum-invasive diagnostic tool for clinical use. This is a vast area actively developing now [7, 8, 24–26].

Two above examples deal with the use of UPE as a research or diagnostic tool but say nothing on the possible role of UPE as a driving factor of the physiological functions of the biophoton-producing organisms. With the present surge in the number of poorly-reviewed (or apparently not reviewed at all) online publications, there is no shortage of ideas on what biophotons could do, or supposedly are proven doing, even in well-established areas of research with rich experimental and theoretical background. In this review, I will select just a small fraction of published examples of what I would call “reckless speculations.”

Biophotons are considered means of distant communication between organisms to transmit signals of danger or stress. It is reported that a bacterial culture placed in a *light-tight* metal box and chemically stressed by adding hydrogen peroxide changed the level of its fluorescence. In turn, the second culture placed in a similar *light-tight* box 5 meters apart responded by changing its bioemission [27]. UPE in the UV-A range is implied in a bystander effect between two groups of fish, one of which was X-ray irradiated. Remarkably, the effect induced in the intact group was observed even if the irradiation of the experimental group was scheduled for the next day [28].

Biophotons are suggested as a means for signal propagation in the nervous system, along with (or even instead of) well-established mechanisms of electrical and chemical transmission. Nerve fibers are supposed to be light guides conducting biophotons from a source somewhere in the neuron body towards targets in its output structure(s) [6, 29, 30].

The idea is supported by the fact that the intensity of UPE may correlate with the level of excitation in various parts of the brain [31]. Taking into account that UPE is mostly produced in routine cellular metabolism, one well may expect that any activity-related changes in brain metabolism would be reflected in UPE production. Yet this does not mean the reverse, that is, that changes in UPE are causing changes in neural activity.

The speculations on information processing by biophotons came to logical completeness in a new theory of vision. It has been suggested that perhaps the electrical responses of retinal photoreceptors and the following neurons may not be quite relevant to the visual function. According to new ideas, phototransduction in rods and cones may change cellular metabolism that, in turn, produces biophotons sent to the brain along with the light guides in the optic nerve. Further chain of alternating metabolic changes and biophoton production eventually leads to the creation of light replicas of observed objects somewhere in central brain structures [32, 33]. So the enigma of human vision is solved. The only remaining problem is where is situated the homunculus that observes the biophoton replica. But the problem may soon be solved within the emerging framework of consciousness and intelligence made of biophotons [34, 35].

I do not see how any meaningful discussion of the unorthodox ideas mentioned above is possible. However, the most promising application of biophotons could be to explain various visual phenomena. Indeed, there is a sub-field of less global theories on the role of UPE in specific aspects of vision that can be reasonably discussed in terms of available knowledge and subjected to experimental tests. The rest of the review will critically discuss the possible contribution of biophotons to retinal dark noise and visual phosphenes of var-

ious origins, based on recent experimental data on retinal UPE, and, often, on classical knowledge of the phenomena.

Retinal dark light and UPE

The concept of the retinal “dark light” dates back to at least the 19th century [36]. Even in complete darkness, an observer does not see something absolutely black, but rather “an irregular feebly illuminated field with numerous fluctuating spots of light” [36, p. 12–13]. The phenomenon was called the intrinsic light of the retina, or *der Eigengrau* in German. The plain experimental observations were soon incorporated into a theoretical framework. The famous Weber–Fechner relation (“sensation is proportional to the logarithm of stimulation”) was derived from psychophysical experiments on sensory thresholds. In an equivalent formulation, it states that the minimum perceptible increase in the intensity of stimulation ΔB is a constant fraction of the stimulus itself (B):

$$\frac{\Delta B}{B} = \text{const.} \quad (1)$$

For vision, it essentially means the preservation of perceived contrasts in a scene independently of changes in the level of ambient illumination. Later it was found that the eq. 1 is inaccurate at low B , and a more appropriate relation is

$$\frac{\Delta B}{B + B_d} = \text{const.} \quad (2)$$

(The history of the equations is described in [36], p. 170–190).

It looks like a certain weak signal B_d is present in the visual system, even in complete darkness ($B = 0$). This “dark light” from Equation (2) was associated with (but not necessarily identical to) the intrinsic retinal light.

It was supposed in the 1940–1950s that the sense of the dark light is produced in the retina by rare spontaneous activations of molecules of the visual pigment rhodopsin, without absorbing any photon [37–39]. The authors suggested that the activation happens due to random thermal transitions in rhodopsin and comprises an irreducible source of the visual noise. The noise could be the factor that limits the ultimate sensitivity of vision. Furthermore, it has been hypothesized that the noise level must depend on the spectral sensitivity of the photoreceptor [38, 39]. Visual pigments of red-sensitive cones need low quantum energy for activation, so they have an excellent chance to acquire it from thermal motion and produce “dark light.” More short-wave sensitive rod visual pigments need higher energy for activation, so they are less “noisy.” Crude calculations had shown that the difference in the photon energy at the peak sensitivity of rods and cones could explain the difference in sensitivity between human diurnal (cone-driven) and nocturnal (rod-driven) vision. This proposition is now known as “Horace Barlow’s hypothesis.”

It took over 20 years to experimentally prove the existence of rhodopsin-initiated dark noise in retinal photoreceptors. Suction-pipette recordings from single rods of the vertebrate retina have shown that in complete darkness, they produce random fluctuations of the flowing current (Fig. 5). The noise consisted of two components [40, 41]. The continuous noise is low-amplitude (few tenths of pA) oscillations that are symmetrical with respect to the dark level of the current. Its origin is still disputable [42–44]. The discrete noise consists of randomly occurring high-amplitude (in a few pA range) unipolar current waves. The waves are virtually identical to responses of the same rod to single photons (SPRs) [41, 43, 45] (Fig. 5B). First recorded from the rods of the toad, the SPR-like discrete noise was later detected in rods of any tested vertebrate species.

Vertebrate photoreceptors convert the absorption of a photon by a single rhodopsin molecule into an electrical response using a multistep amplification cascade. Each step involves hundreds of molecules of proteins and low molecular weight components; the inac-

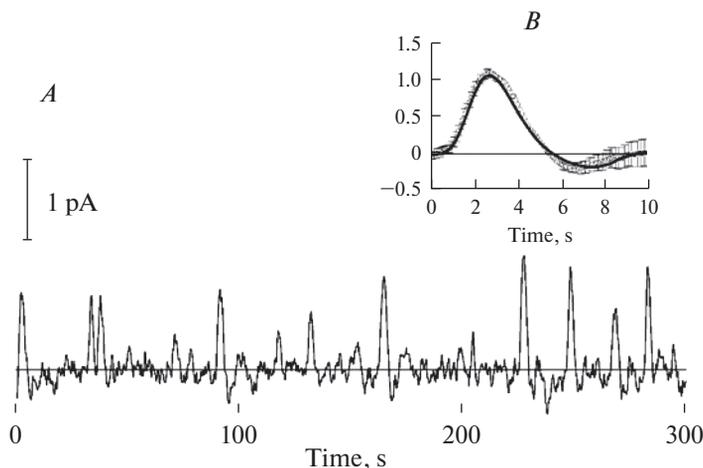


Fig. 5. Continuous and discrete dark noise in a toad rod. *A*, continuous recording of the dark current. *B*, comparing the discrete dark events with the single-photon response of the same cell. Bold smooth line is an average of 40 responses to short flashes activating on average 1 R^* . Superimposed is an average of 15 discrete dark events (mean ± 1 SEM) that were cut off from the continuous trace in *A*. Recordings by Luba Astakhova.

tivation of the cascade also needs many components (recent reviews [46–50]) (Fig. 6). It is quite improbable that such a complex chain of concerted events could be replicated by random fluctuations in the cascade unless it is initiated by a single molecule at its very beginning, that is, by activation of rhodopsin. Thus, the Barlow's idea of activation of rhodopsin by internal thermal motion was generally accepted.

Barlow's hypothesis was very fruitful because it could naturally explain important properties of vision, like different sensitivities of rods and cones, Purkinje shift, and lack of infrared vision in warm-blooded animals. It also predicted that there could be a trade-off between a spectral range of vision and thermal noise, so a sort of optimization of spectral sensitivity in accordance with the visual environment may be possible [51–54]. Yet, already, the first experimental confirmation of the existence of the dark noise revealed a serious problem. Accordingly to the hypothesis, a thermal motion was to provide enough energy to overcome the barrier between the ground and the light-excited states of rhodopsin (ΔE_L). The barrier comprises 50 to 70 kcal/mol, depending on the position of the pigment's absorbance maximum. However, the dependence of the rate of SPR-like events on temperature demonstrated far lower thermal activation energy $\Delta E_T \approx 22$ kcal/mol [41]. Also, Barlow's formula predicts a very steep increase of the thermal noise with the red shift of the visual pigment absorbance, about 6000-fold per 50 nm. Actual dependence is far less steep, about 15-fold per the same shift (Fig. 7) [51–53].

The balance between the sensitivity to ambient light and the noise level might govern the adaptation of visual pigments to specific light environments [55]. Not surprisingly, a good deal of work has been done to resolve the above contradiction, to describe possible underlying intramolecular mechanisms theoretically, and to predict their impact on visual functions [56–58].

To reconcile the thermal noise hypothesis with the experimental data, one may assume that the isomerization of the 11-*cis* to *all-trans* rhodopsin chromophore by light and heat follows different routes. There is no trouble of thinking that the transition from 11-*cis* to *all-trans* configuration may not necessarily proceed via the (photo)excited state. The dark and activated basal states of the chromophore might be separated by an energy barrier low-

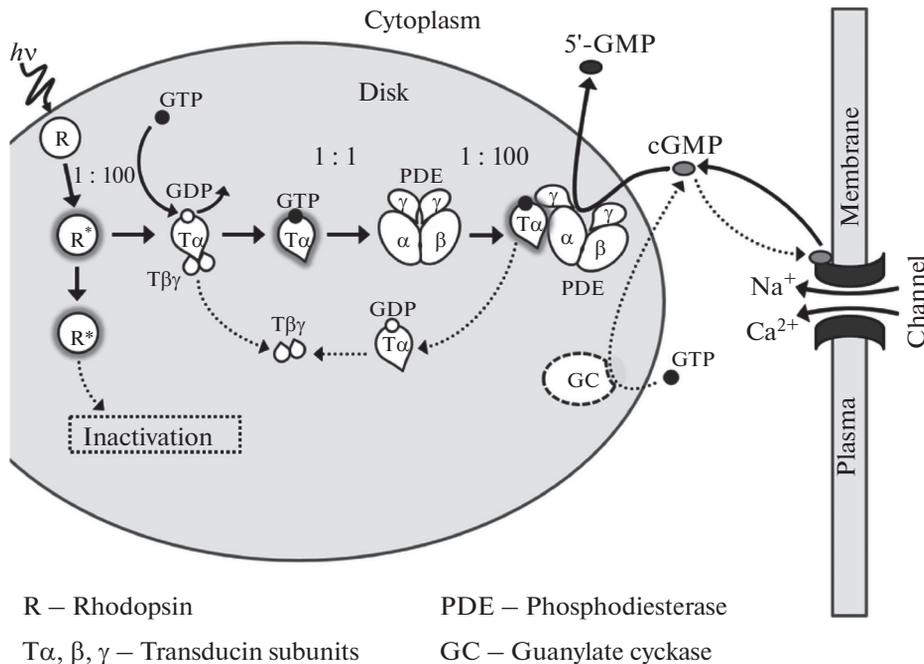


Fig. 6. A simplified scheme of the phototransduction cascade in vertebrate rods and cones. Activation reactions are only shown. De-activation processes are omitted to avoid clutter. Light-activated rhodopsin R* interacts at the rate of about 100 s^{-1} with trimeric G-protein transducin and produces active transducin $\text{T}\alpha^*\text{-GTP}$. Each $\text{T}\alpha^*\text{-GTP}$ binds in the ratio 1 : 1 to cyclic GMP phosphodiesterase (PDE) and activates it. In turn, each PDE* hydrolyzes about 100 cGMP molecules per second. Concentration of cGMP decreases, and cGMP-controlled ionic channels of the plasma membrane close producing electrical response.

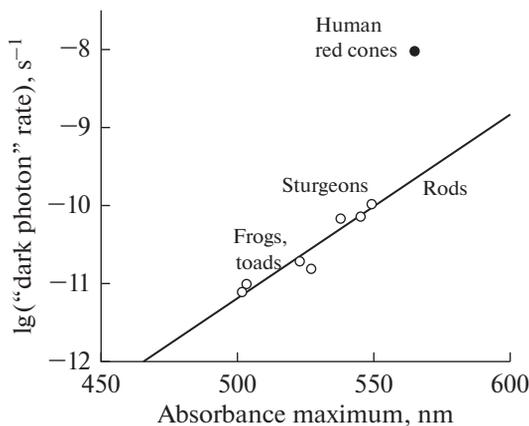


Fig. 7. Rate of dark activation of visual pigments as a function of the pigment absorbance maximum. Data for rods from [51–54]. The point for cones refers to human red cone pigment expressed in mouse rods [52].

er than ΔE_L , thus allowing smoother thermal transition. Robert Barlow with co-workers suggested that the transition follows via a de-protonated state of the chromophore that is supposed to be less stable than the protonated one [59, 60]. Under this assumption, the frequency of the SPR-like dark events should be strongly pH-dependent, increasing 10-fold per each unit of alkalization. The proposition was tested by measuring the frequency of dark events in *Limulus* photoreceptors at different pHs and indeed was supported by the data [59]. Unfortunately, a similar test on vertebrate photoreceptors showed no effect on pH on the discrete dark noise [54, 61].

Also, the function of Noise vs. Wavelength of maximum absorption is not unique. A few measurements on long-wave sensitive cone visual pigments expressed in rods yielded the noise level two orders of magnitude higher than predicted (and demonstrated) for rod pigments with the same absorbance maximum [62] (Fig. 7).

Understanding that the early model of thermal excitation based on Boltzmann statistics is an apparent oversimplification lead to the creation of more sophisticated approaches that included attempts to compute the transitions in rhodopsin *ab initio* on supercomputers. The present situation is discussed in [51]. It can be summarized as follows: crude predictions of existing simple theories are in general agreement with the experiment. Yet one should humbly admit that a good molecular theory of the thermal noise is still lacking. This does not mean, however, that the idea itself is wrong.

A radical solution to the problem was proposed a few years ago. It was suggested that rhodopsin molecules are activated not by heat but rather by real photons from UPE [63–67]. The reasoning is that the retina is one of the most metabolically active tissues in the organism, so it must be a good source of ROS. Besides, outer segments of rods and cones contain a high amount of polyunsaturated fatty acids, thus providing an excellent substrate for UPE production. There is no functional theory (actually, no theory et al.) behind the hypothesis, but it has certain experimental support. All parts of the eye (cornea, vitreous body, and retina of rat and frog) were studied with a high-sensitive cooled CCD camera and shown to emit biophotons [64, 65].

Properties of the discrete noise in rods are well known, so the source of biophoton emission (if it is responsible for the noise) can be pinpointed with confidence since the discrete noise can be recorded both from rods attached to the retina and from solitary isolated cells (for instance [41, 43], the biophotons must be produced by photoreceptors themselves. Moreover, discrete noise is also recorded from detached rod outer segments provided that necessary metabolites are supplied via the perfusion solution [42]. Hence the primary source of biophotons should be the oxidation of polyunsaturated fatty acids of the photoreceptor membranes.

It has been suggested that the biophoton hypothesis can explain the high noise level in cones since cones are supposed to have bigger ellipsoids hence more active metabolism [67]. The argument is flawed for two reasons. Firstly, tightly-packed rods and cones within the retina share the same UPE pool. Secondly, cones comprise just a small fraction of photoreceptors (e.g., one cone per 20 to 50 rods in mammalian retinas). Therefore, no significant difference in noise level between rods and cones is expected. Critical for the biophoton hypothesis, human red cone visual pigment produces high discrete dark noise when expressed in rods along with their native rhodopsin [62]. High noise in red-sensitive pigment compared to rhodopsin (Fig. 7) could be explained in favor of the biophoton hypothesis by assuming a specific spectral composition of photoreceptors' UPE. If the maximum intensity of UPE were in the long-wave (red) end of the spectrum, it would excite cones far more efficiently than rods. No real data on the spectrum of retinal UPE is available, but further experiments made this suggestion improbable (see below).

A precise quantitative test of the biophoton hypothesis is possible. The intensity of biophoton emission necessary to produce the dark noise can be calculated from physiological measurements and compared with the detected UPE level. Proper experiments were done

on rods of frog *Rana ridibunda* and fish (sterlet sturgeon *Acipenser ruthenus*) [68]. The dark noise level was measured with the suction recordings from solitary isolated rods. UPE was registered from eyecups or pieces of the isolated perfused retina by a high-sensitive, broad waveband (200 to 800 nm) photomultiplier (PMT Hamamatsu R9110). Special attention was paid to establishing the quantitative relation between the level of rhodopsin activation and the intensity of UPE reaching the PMT (if UPE were to produce the observed dark noise). To do this, the retina in the experimental chamber was illuminated with a separate light source whose intensity was calibrated *in situ* in the same chamber by measuring rhodopsin bleaching. Further, propagation of light within the measuring system was computationally traced to estimate the ratios of the lights produced, absorbed within the rod outer segment, and reaching the PMT. In these experiments, retinal samples indeed generated measurable UPE [68]. Importantly, its level was the same as detected earlier with the cooled SSD camera by Li & Dai [65]. However, the intensity of the UPE was over 100 times lower than necessary to produce discrete dark noise.

The discrepancy between necessary and available light was estimated in [68] under the assumption that the spectrum of UPE is similar to the spectrum of the LED used for intensity calibration (peak at 505 nm, close to the maximum sensitivity of rods). If the UPE were more long-wave, its efficiency to produce dark noise in rods was lower, but in cones, it was higher. Specifically, the 1000-fold difference in cone and rod noise levels can be explained by different spectral sensitivities of their visual pigments combined with the biophoton spectrum peaking in red at 640–650 nm [68]. In this case, the same red UPE would excite red cones ~ 1.000 times more efficiently than rods, in accordance with experimental observations [62]. Yet, to produce proper *absolute* noise levels in rods and cones, biophoton emission should then be ~ 1.000 times greater than the equivalent rod-activating light at 505 nm. Since spectral sensitivity of the measuring system in [68] was flat, the corresponding PMT response to the rod- and cone-activating light should be 1.000 times more potent than shown in Fig. 8 (solid line). This would bring the discrepancy between the biophoton hypothesis and experiment to nearly five orders of magnitude.

In sum, retina indeed produces reliably measurable UPE, but its intensity is over 100-fold lower than necessary to explain the photoreceptor dark noise. Thus, the biophoton hypothesis on the origin of retinal dark light must be rejected, and further experimental and theoretical work on the model of thermal activation of rhodopsin retains its importance.

Biophotons and afterimages

If one looks for a while at a bright source of light and then turns the light off or shuts eyes, a bright imprint of the source is seen for a certain time, slowly fading away. This is a positive afterimage. When the positive image fades completely, it may convert to its dark copy against a bleak retinal background. This is a negative afterimage. If the stimulus was achromatic, the afterimage is also achromatic. If the stimulus was colored, the afterimage appears in complementary colors (Cyan vs. Red, Magenta vs. Green, Yellow vs. Blue). There is a combination of three factors that are responsible for afterimages. Firstly, there is decaying signaling in retinal and central neural circuits that lasts for a while after the light was turned off. It forms a positive afterimage. The second is the loss of sensitivity in the illuminated area due to light adaptation. The third is a certain source of excitation of the entire retina that creates a light background. Then the light-adapted, low-sensitive previously illuminated area would look dark against the background. It creates a negative afterimage.

All three factors have mostly the retinal origin. If the transmission from the eye to the brain is blocked during the action of the inducing stimulus (for instance, by pressing the eyeball), the afterimage gets visible after the block is released [69]. On the other hand, specific features of the afterimage (color, duration, sharpness, dependence on visual surround, etc.) are affected by central mechanisms [70–72]. There is no shortage of the sites

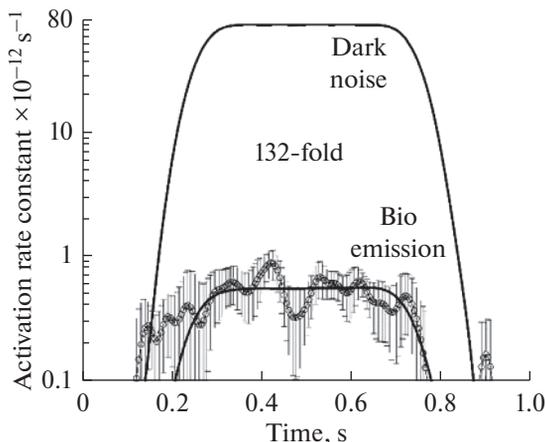


Fig. 8. Comparing biophoton emission with the rate of dark rhodopsin activation derived from electrophysiological recordings. Frog retinas. The dots with error bars are the average bioemission intensities (15 retinas, mean \pm 1 SEM). The high-amplitude black trace shows the bioemission signal that would produce the actual frequency of discrete dark waves (after [68]).

in the visual system where the signal persists, and sensitivity remains reduced after turning-off the inducing stimulus. It has recently been shown that two necessary components of afterimage, lasting signaling and post-stimulus desensitization, can be found already at the level of retinal rods at entirely physiological intensities of light [73].

The remaining problem is, what is the source of light background that is necessary to see a *negative* afterimage? As formulated by proponents of biophoton theories: “What is it, when our eyes are closed, that produces the long-lasting signal that makes static afterimages within our eyes interpreted by the brain as a visual experience?” [67, p. 111]. Their answer is, the stimulus-induced delayed secondary UPE.

It is supposed that the inducing stimulus changes photoreceptor metabolism, which, in turn, evokes secondary UPE from the retina. Thus, UPE from a formerly brightly stimulated area illuminates the entire eye from inside. This is the source of light background that is necessary to see a negative afterimage even with shut eyes [67]. The secondary UPE does exist indeed. Excised rat eye, lens, vitreous body, and retina steadily emit biophotons in complete darkness [64]. Bright illumination of the sample induces a transient increase in the intensity of the emission that lasts for a few minutes. Supposedly, this is the source of the full-field background that creates a negative afterimage.

The problem with the explanation is that, as shown in the previous section, the intensity of dark UPE from the retina is over two orders of magnitude below the visual threshold [68]. The induced surplus from delayed emission is an extra 20- to 100-times weaker (Fig. 1 in [64]). So the biophoton hypothesis of the afterimage must be rejected, too.

Curiously, there is no problem to solve at all. One needs not a light source within the eye to see negative afterimages. If the inducing stimulus is delivered in complete darkness, the only positive afterimage is seen. After it fades away, no negative afterimage appears. One can test it by first looking at the screen of one’s smartphone in a dark room, and then turning the smartphone off. If instead of turning the screen off, one simply shuts eyes, the positive afterimage will soon turn negative. Then, keeping eyes closed and covering the shining screen with one’s palm, one can repeatedly switch between positive and negative afterimages. “What is it, when our eyes are closed, that produces the long-lasting signal that makes static afterimages within our eyes interpreted by the brain as a visual experience?” It is the light that passes through our tightly shut lids. It is that simple.

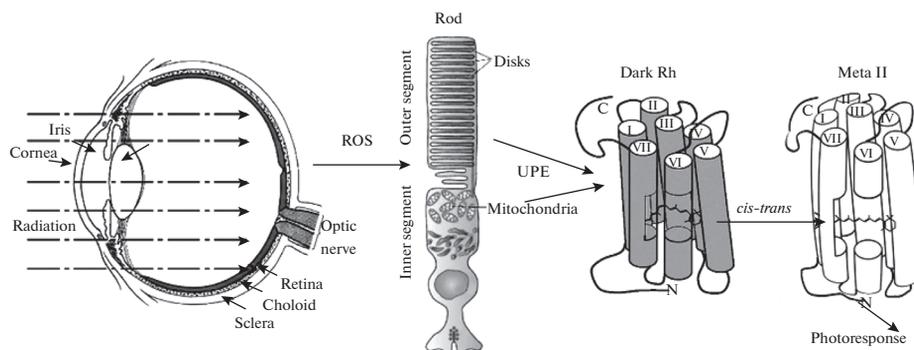


Fig. 9. A hypothetical scheme of production of phosphenes by biophotons generated by lipid peroxidation in photoreceptor outer segments. Various non-visual external stimuli (ionizing electromagnetic radiation, high-energy charged particles, electric current, oscillating magnetic field, and mechanical pressure on the eyeball) are supposed to change the photoreceptor metabolism thus changing the level of ROS generation and biophoton emission. After [63, 64, 67].

Biophotons and phosphenes

The term “phosphenes” may refer to a wide range of phenomena when an observer sees the light without any apparent light source.

Biophotons as a possible source of flashers produced by ionizing radiation

Seeing invisible light: limits of the human visible spectrum

It is commonly accepted that humans can perceive as light the electromagnetic radiation of wavelengths between 380 and 700 nm. The invisible radiation with $\lambda < 380$ nm is classified as ultraviolet (UV), and with $\lambda > 700$ nm, as infrared (IR). The limits are rather arbitrary and are set to correspond to the ends of the colorful spectral band, which is created from the sunlight by a prism or a diffraction grating. There is no sharp IR limit. Sensitivity to the long-wave radiation decreases roughly exponentially with increased wavelengths (reviewed in [74]). The IR light at 1050 nm can be seen by a dark-adapted eye if its intensity is 12.5 decimal log units above the rod visual threshold at 507 nm [75, 76]. A further shift to IR is possible with increased intensity and is only limited by the danger of vitreous and retinal heat damage.

The UV limit in humans is set by the transmittance of ocular media (cornea, lens, vitreous, and the retina itself). They are of yellow(ish) color and block the UV light from reaching photoreceptors. The yellowness grows with age soG that the UV border can be markedly different for young and elderly persons. The intrinsic sensitivity of retinal photoreceptors is substantially wider than is routinely measured in physiological experiments. It is formed by the absorbance spectrum of the corresponding visual pigment. The spectrum consists of three bands of interest (Fig. 10). The most prominent is the α -band whose peak in various pigments may lie between 350 and 630 nm (traditionally “visible” light) (reviewed in [74]).

The β -band of rhodopsin absorbance supports sensitivity to near UV between 400 and 300 nm (UVA). Quantum yield of rhodopsin activation in the β -band is equal to that in α -band. So, the sensitivity at 350 nm is about 25% of maximum at 500–550 nm, which is substantially higher than in the officially “visible” red part of the spectrum (≥ 630 nm). In many vertebrate species, the eye media are transparent down to ≈ 300 nm. Therefore, a grass frog can see UVA invisible to humans [77].

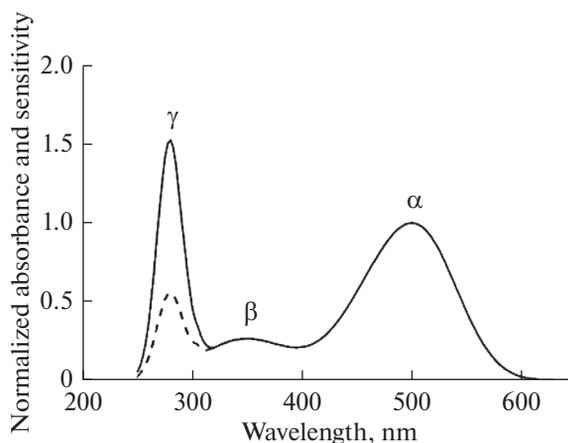


Fig. 10. Between 250 and 650 nm, rhodopsin has three absorbance bands peaking at ≈ 500 (α), 350 (β), and 280 (γ) nm (solid line). The sensitivity of a rod in visible (α) and UV-A (β) band exactly coincides with the absorbance spectrum. Sensitivity in the γ -band is just 0.45 of the absorbance due to lower efficiency of energy transfer from aromatic amino acids to the chromophore (dashed line) [77, 78].

The γ -band at 280 nm (UVB) is due to the absorption of light by aromatic amino acids (mostly by tryptophan and tyrosine) of the opsin moiety. Illumination with UVB of the rhodopsin solution in detergent bleaches it, forming the standard product all-*trans*-retinal [78]. Thus bleaching by UVB follows via the same route of 11-*cis* to all-*trans* isomerization of chromophore as initiated by α -band and β -band absorption and could start phototransduction. Frog rods show a peak of sensitivity at 280 nm, which is even higher than in the β -band [77] (dashed line in Figure 10). Quantum yield of rhodopsin bleaching and transduction activation at 280 nm is about 2.6 times lower than in the α -band and β -band [77, 78]. This reflects a relatively low efficiency of the intramolecular energy migration to the chromophore from aromatic amino acids that partly form the chromophore pocket.

The sensitivity in the γ -band cannot be of any behavioral importance, though since the intensity of UVB radiation in the natural environment is extremely low; besides, it is strongly absorbed by all proteins in the light path through the eye to photoreceptors.

Thus the vertebrate vision in the spectral band from near IR to UVB is supported by a single molecular mechanism, light-induced isomerization of the rhodopsin chromophore, with subsequent activation of the phototransduction cascade. The situation may change at an even shorter wavelength (higher photon energies) of X-rays and gamma-rays.

Visibility of X-rays

When Röntgen in 1895 discovered X-rays, he called them “invisible radiation.” However, other researchers soon found that the X-rays can produce a visual sensation in a dark-adapted observer. It was characterized as a faint greenish-bluish glow filling the eye. Rather soon, it has been shown that the sensation originates from the excitation of the retina rather than from possible X-ray-induced fluorescence of the eye media. The early studies on the properties and mechanisms of the generation of the X-ray phosphenes are summarized in [79, 80].

Apparently, the first electrophysiological study of the retinal response to X-rays was done by Lipetz [79], who registered spike responses from retinal ganglion cells of the frog eye. A parallel study of responses to light and X-ray stimulation revealed a similarity between their properties. Threshold intensities were determined, and the ability of X-rays to bleach

rhodopsin in the retina was tested. The degree of rhodopsin bleaching was estimated without any quantitative method, though, just by visual inspection of the retinas' color. It appeared that the ratio of threshold intensities for electrical responses and the intensities producing noticeable bleach was similar, of about 1×10^8 , for both stimuli. The general conclusion was that the visual effects of light and X-rays are produced by their action on rhodopsin. However, the estimate of the threshold-to-bleach range was quite crude, with a possible error of an order of magnitude. Besides, bleaching doses of X-rays resulted in the denaturation of proteins as well. So the work did not prove that the physiological response to X-rays is caused by the isomerization of the rhodopsin chromophore, as in the case of visible light.

Later works relied on recordings of electroretinogram (ERG) and visually evoked cortical potentials. They showed that indeed the primary target for X-rays in the retina is a visual pigment, rhodopsin. At moderate intensities, ERG in response to X-rays and light were of virtually identical shapes, and their Response vs. Intensity curves were approximately congruent [80–83]. Importantly, at low intensities, ERG to both stimuli consisted of a unipolar cornea-positive *b*-wave; above a certain threshold intensity level, the *b*-wave was preceded by a brief cornea-negative *a*-wave which is known to reflect the electrical activity of photoreceptors. The electrical response of rods and cones is produced by a complex biochemical cascade started by *cis-trans* isomerization of rhodopsin chromophore (Fig. 6). Hence, the X-ray ERG was initiated by the action of X-rays on rhodopsin in photoreceptors rather than by their possible effect on secondary retinal neurons.

Also, X-rays bleached rhodopsin, both when applied to the living animals [84] and detergent extracts of the visual pigment [82, 84]. As already noticed by [80], the X-ray intensity that bleached a noticeable fraction of rhodopsin was 7 to 8 orders of magnitude higher than the dose necessary to evoke a threshold ERG. This is essentially what occurs with light stimulation, too. A threshold light ERG can be elicited by bleaching a single rhodopsin per rod, which may contain from 10^8 to 3×10^9 “dark” (unbleached) rhodopsins. The exact comparison of rhodopsin bleaching by light and X-rays is hampered by the fact that the doses of X-rays necessary for measurable bleach also damage the retina and denature proteins, including rhodopsin itself [80, 84]. Thus, the loss of Rh peak absorbance at 500 nm after high X-ray exposure partly reflects rhodopsin damage rather than its photoactivation [80, 84, 85]. Nevertheless, a substantial fraction of rhodopsin is converted to its physiologically active conformation, metarhodopsin II, which is evidenced by the appearance of meta II absorbance hump at 380 nm [85].

Cones also contribute to X-ray sensation. It is reported that the close-to-threshold bluish-green X-ray phosphenes in humans change their color to yellowish-green at high doses [79]. However, X-ray ERG was not recorded from a pure cone retina of a lizard *Phrynosoma* (horned toad) [82]. It seems that at least some cone visual pigments are less sensitive to X-rays than rod rhodopsin. Along with generally lower sensitivity of cones compared to rods, lower efficiency of excitation of cone visual pigments by X-rays may prevent the detection of cone contribution to ERG in a pure cone or mixed rod-cone retinas.

One may conclude that X-rays of commonly used energies of quanta from 50 to 100 keV excite retinal rods in the same manner as the visible light does, that is, by isomerizing the rhodopsin chromophore. Various side effects caused by protein denaturation and possible direct action on retinal neurons at high doses cannot be excluded.

Phosphenes from high-energy particles

Flashes of light seen as a wide-field glow or bright spots, and sometimes interrupted streaks were reported by astronauts during the first long-lasting space flights [86–89]; recent reviews [90, 91]. Similar phosphenes are seen by patients with ocular and brain tumors that receive treatment with high-energy particles from an accelerator [92, 93]. The practi-

cal importance of accessing space travel radiation hazard and the risk of radiation damage in medical treatment provoked a good number of works on identifying the source(s) of the phenomenon [94–97]. Volunteers were presented with very low doses of accelerated particles of various sorts (typically just a few particles per trial) and reported their sensations. It appeared that bright light streaks could be produced by high-energy neutrons, alpha-particles, protons, pions, muons, nitrogen nuclei, and carbon ions (review [98]). The light streaks were seen at particles' energies both below and above the Cerenkov radiation threshold. Diffuse flashes and glow only appeared if the energy of a (charged) particle exceeded the Cerenkov threshold.

There is a single work showing that low doses of deuterons with the energy of 15 MeV (below Cerenkov threshold) evoke ERG from the isolated retina of the frog [99]. Properties of the deuteron-induced and light-induced ERGs were similar. Particle ERG showed a distinct *a*-wave indicating activation of photoreceptors via a routine light-induced way, that is, by *cis-trans* isomerization of the chromophore. The authors also demonstrated the loss of rhodopsin peak at high irradiation levels. Remarkably, deuteron doses necessary to bleach a significant amount ($\approx 50\%$) of rhodopsin appeared about nine orders of magnitude higher than the doses that evoked a threshold ERG. High doses also denatured rhodopsin. Unfortunately, the formation of the light-activated rhodopsin state (Metarhodopsin II) by high irradiation doses has not been tested in [99]. So, it remains unclear what fraction of rhodopsin is gone by denaturation, and what fraction was used for activation of visual signaling. Similar results were obtained with irradiation by α -particles with energies up to 30 MeV [99].

The results [99] have an important implication for the biophoton hypothesis of the production of radiation phosphenes. If rhodopsin were bleached by biophotons of whatever origin, one should expect a pretty high level of visible luminescence from the rhodopsin samples during irradiation. It is easy to calculate that bleaching 50% rhodopsin by the light needs illumination with 1000 lux during about 50 s that hardly qualifies as UPE. Therefore, if rhodopsin in chemiluminescence [100] or particle irradiation experiments [99, 101] were bleached by biophotons, the sample should shine like a torch. Yet in [99], a photomultiplier was used for testing the possible retinal luminescence during particle irradiation and detected nothing. Thus, at least in case of deuteron- or α -particle-evoked phosphenes, the biophoton hypothesis can be discarded.

There is only a couple of papers on the ability of UPE-type chemiluminescence or heavy particles to produce massive rhodopsin activation detectable by standard biochemical methods [100, 101]. In the first work [100], the authors demonstrated that the chemiluminescence from a xanthine/xanthine oxidase system with lipids and polyunsaturated fatty acids could bleach rhodopsin. We know since 1876 [102] that visible light bleaches rhodopsin, so the result of [100] is hardly surprising. The same group also reported that irradiation by 200 MeV ^{12}C nuclei bleaches rhodopsin in the suspension of rod outer segments (RdOS), with the formation of Meta II-like product(s). Bleaching was supposedly caused by biophotons formed by RdOS lipid peroxidation with ROS created by ^{12}C irradiation [101]. The conclusion, however, is in no way supported by the presented data. The results of ^{12}C -bleaching experiments are illustrated by Fig. 1 in [101], which is just an exact duplicate of Fig. 3 from [100], where it demonstrates bleaching with visible light. Besides, no Meta II at all could be found in ^{12}C irradiation experiments in using [101] protocol. The mammalian Meta II vanishes in about 5 min after formation at 37°C, by decaying to all-*trans*-retinal and opsin [103–105]. In [101], the irradiated samples were heated for 45 min at 60°C prior analysis (p. 3 in [101]), so no trace of Meta II would remain even if it were formed during irradiation. Thus, the solely available candidate for experimental support for the biophoton hypothesis of the origin of radiation phosphenes fails.

It seems that no real data is supporting the idea that the radiation phosphenes of whatever origin are caused by biophotons generated by lipid peroxidation via radiation-produced ROSs. At low exposures, any sort of ionizing radiation can activate rhodopsin either by real light via the Cerenkov mechanism or by energizing the rhodopsin molecule (and possibly its surround) with the following intramolecular energy transfer to the chromophore. High exposures result in tissue damage that obscures other possible effects of radiation. A portion of ionization products may generate biophotons, as suggested in [67, 100, 101]. Yet there is no experimental proof of the idea.

The author of the review dares to suggest a quite simple experiment that can clarify the situation. As mentioned above, marked rhodopsin loss by chromophore activation and further bleaching needs a substantial amount of visible light. Therefore, if rhodopsin in chemiluminescence [100] or particle irradiation experiments [101] were bleached by biophotons, the sample should shine brightly. It would be worth repeating the experiments [100, 101] using a physical light meter. No super-sensitive device is necessary. A household-rate instrument may suffice to settle the problem. Looking with a naked eye (if possible at a particle accelerator output) would also help.

Electro- and magneto-phosphenes

The light sensation can also be produced with electric or magnetic field stimulation of the retina or visual cortex. Here, the phosphenes of the eye origin are only considered. First observations of electric phosphenes were made already in the first half of the 19th century, in the general context of studying effects on electricity on human body. Various sources of the electric current were used (e.g., discharges from a Leyden jar or first galvanic batteries). The position of stimulating electrodes (e.g., on the forehead and the forearm) usually did not allow locating the target (the eye or the brain). In a rare experiment with local stimulation, Purkinje described phosphenes with a wire electrode placed on the cornea between shut lids. The early results were summarized by Helmholtz (p. 13–17 in [36]) and they are *NOT* of only historical interest now.

Apparently, first quantitative experiments that allowed determining the stimulated structures and phosphene thresholds were done in 1955 by Brindley [106] who used active electrodes pressed to conjunctiva at various places outside cornea, and the reference electrode in the mouth. As a stimulus, the alternate 50-Hz current was applied to a dark-adapted or moderately light-adapted eye. Currents near 20 μ A were sufficient to evoke supra-threshold phosphenes.

Further works were aimed at discriminating between two probable targets for the current, optic nerve and the retina proper. Spatial distribution of phosphenes within the visual field with electrodes of various shapes and positions led to the conclusion that the phosphenes are produced in the retina when it is excited by the radial current, that is, by the current flowing perpendicular to the retinal surface. Tangential currents (flowing parallel to the retinal surface) that are supposed to activate axons of ganglion cells proved to be ineffective [106].

The modern biophoton hypothesis suggests that trans-retinal currents somehow change the metabolic processes in retinal cells, thus resulting in the production of extra UPE and phosphenes [63, 67]. For assessing the idea, important are BOTH early (19th century) and later (between 1960 and 1990) literature on the visual appearance of phosphenes themselves and their comparison with the responses to light stimulation in light- and dark-adapted states of the eye. It appeared that electrophosphenes could be evoked equally well in a dark-adapted and light-adapted state [36, 107, 108] and even against a light background that is equivalent to looking at a white surface illuminated with ≈ 7000 lux [108]. Thus, strong light adaptation does not substantially affect electrophosphenes. In turn, electrical phosphenes do not modify the adaptational state of the retina [107]. Supposed

biophoton emission that could override light stimuli of daylight brightness can hardly be called UPE. Moreover, such current-evoked emission should make the eye brightly shining. Nothing of this sort was observed [36], so the suggested biophoton mechanism of electrophosphenes must be discarded.

Magnetophosphenes

A rather strong changing magnetic field can also induce phosphenes. The magnetophosphenes are usually described as a weak flickering light, colorless or slightly blue. The threshold for the 30-Hz alternating field was near 10 mT [109] and only changed somewhat between the dark-adapted state and rather strong background illumination (130 cd/m²). It has been concluded that magnetophosphenes could actually be electrophosphenes evoked by currents in the retina, which, in turn, are induced by an alternating magnetic field.

Attwell [110] provided a detailed theoretical analysis of currents and voltages generated by an alternating electromagnetic field in biological tissues. The estimate of the electric fields in a tissue at a magnetophosphene threshold was between 10 and 60 mV/m, which translates into 1 to 10 μ V per photoreceptor length. This is close to the threshold for electrophosphenes (about 15 μ V, see below). Some data, though, do not allow us to identify with certainty the magnetophosphenes as electrophosphenes produced by eddy currents. It was possible to induce magnetophosphenes in a person totally blind due to an advanced stage of retinitis pigmentosa, whose photoreceptor cells degenerated completely, supposedly losing their electrosensory structures, rod and cone synaptic terminals. This suggests that there were other partially preserved electrosensitive cells (perhaps bipolars and ganglion cells) in this observer [109].

The visibility of magnetophosphenes against 130 cd/m² light background [109] completely excludes the contribution of biophotons to the phenomenon. This background is about seven orders of magnitude above the rod visual threshold, and hence nine orders of magnitude above the resting biophoton emission from the retina [65, 68]. If biophotons were responsible for magnetophosphenes, it would imply a billion-fold surge of ROS production in the retina under modest magnetic stimulation.

Possible electrosensitive structures in the retina responsible for the production of electro- and magnetophosphene

It would be interesting to tentatively identify electrosensitive structures in the retina that are responsible for the production of electro- and magnetophosphenes. Since the phosphenes are evoked by the radial current, the most likely targets are radially orientated retinal cells. These are photoreceptor cells, bipolar cells, and radial (Müller) fibers. Photoreceptor cells, both rods and cones, have the unique organization of their output synapses. Structurally, the photoreceptor synapses contain synaptic ribbons, specific dense double-membrane structures that are surrounded by synaptic vesicles (Fig. 11) (rev. [111]). Functionally, they are drastically different from “ordinary” neuro-muscular junctions (NMJ) or axo-dendritic synapses in the rest of the nervous system. Typically, at the NMJ in a resting state, the presynaptic membrane has a high negative potential. Therefore, the transmitter release through the membrane is slow if not absent altogether. The action potential that comes along the axon and reaches the terminal is a rather brief (a few milliseconds) but it provides a high-amplitude (a few tens millivolt) depolarization. It evokes a burst of powerful neurotransmitter release, which robustly excites the postsynaptic cell, mainly following the rule of All-Or-Nothing.

In contrast, at the ribbon synapse, the presynaptic membrane is substantially depolarized at rest. Therefore, the transmitter is continuously released from the presynaptic cell, at the rate that can be modulated either way by small changes in the membrane potential. The

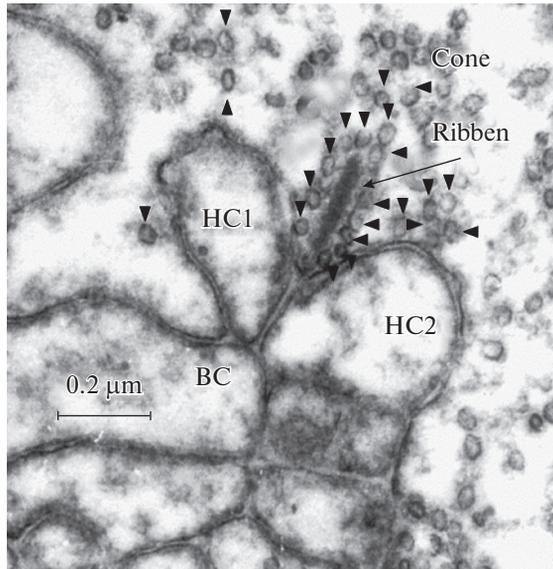


Fig. 11. Small fragment of a synaptic terminal in the chicken cone. The presynaptic cone cytoplasm with a synaptic ribbon (arrow) is in the upper right corner; numerous synaptic vesicles containing glutamate are marked by small triangles. HC1 and HC2 are input dendrites of two horizontal cells. BC is an input dendrite of a bipolar.

release smoothly decreases at hyperpolarization and increases at depolarization. Correspondingly, the membrane of a postsynaptic neuron can be gradually hyperpolarized or depolarized, thus coding the input in an analog manner.

Ribbon synapses are almost unique for sensory cells. Besides retinal photoreceptors, they are exploited by retinal bipolars, mechanoreceptors of the lateral line organs, and their evolutionary derivatives that include the organ of Corti and equilibrium receptors of the inner ear. In all cases, glutamate is used as an excitatory synaptic transmitter. Due to analog coding at the synapse, mechanosensory cells produce either hyperpolarizing or depolarizing postsynaptic response, dependent on the direction of deformation of their sensory cilia [111]. The two-way analog coding essentially means that there is no built-in sensory threshold, and the ability to detect weak stimuli is mostly limited by the ability to separate the useful signal from always present background noise. The utmost sensitivity is achieved in electroreceptors of ampules of Lorenzini in elasmobranch fish (sharks and rays). These organs consist of a small (1–2 mm) cysts supplied by long channels that run under the skin. The channels connect the cysts' interior to various distant points on the surface of the fish body. The inner wall of the cyst is covered by sensory cells that essentially are holders for ribbon synapses. A few microvolt voltage applied to the ampule is sufficient to change the frequency of spikes in the nerve fibers of the ampullary nerve [112, 113]. The sign of the spike reaction (excitatory or inhibitory) depends on the polarity of the stimulus. In behavioral experiments, a shark reacted to electric fields as small as 5 nV/cm in water [112]. This corresponds to 0.05–0.1 μV voltage across the electroreceptive epithelium.

Clearly visible electrophosphenes can be evoked by the current of about 20 μA applied to cornea [106]. Calculations show that this current would produce a voltage change of ≈15 μV at the photoreceptor presynaptic membrane. The value is at least two orders of magnitude higher than the sensory threshold of Lorenzian ampules, so it certainly allows direct action of the current on photoreceptor ribbon synapse, to make phosphenes. Yet the value

must better be compared with presynaptic responses in rods and cones at threshold light stimulation. Single-photon response (SPR) in human rods is near 1 mV [114] which is about two orders of magnitude higher than the threshold potential for the electrophosphenes. This doubts the ability of the direct electrical stimulation of the eye *in situ* to produce phosphenes via the *rod* pathway in the retina.

On the other hand, the SPR amplitude in a cone is about 15 μ V [114], that is exactly what is necessary to produce electrophosphenes. It seems that a more light-sensitive rod system in the retina cannot produce phosphenes at electrical stimulation, while the less light-sensitive cone system can readily react to electric currents. Though paradoxical, the conclusion fits well what is known about the visual appearance of electrophosphenes. Already Purkinje (see in [36]) described the electrophosphene as a mauve color sickle. Dependent on the parameters of stimulations, phosphenes could vary from mauve to yellow, green, or red, but were always colored [36, 107, 108], that is, generated in the cone pathway.

Mechanophosphenes

Deformation phosphenes or mechanophosphenes are light sensations evoked by the deformation of the eyeball. An interesting historical review of mechanophosphene studies started from ancient Greece time through Newton and until recently is given in [115]. The results that refute the modern biophoton idea were known from at least the 18th century. It was shown that the deformation phosphenes could be produced at moderate diurnal light intensities. This means that the intensity of the supposed (biophoton) light that generates the phosphenes should be pretty high, at least 7 to 8 orders of magnitude beyond the absolute visual threshold (see above, the section on electrophosphenes). In 1742, Langguth (cited in [115]), in a completely dark room, pressed his eye in front of a mirror, producing phosphenes and trying to see any light emerging from the eye. Nothing was seen. The experiment was repeated with a second observer carefully looking at the stimulated eye of the author. Again, no light leaving the stimulated eye was detected.

Nevertheless, mechanosensitive retinal cells responsible for the mechanophosphenes cannot be reliably identified yet, in contrast to the situation with electrophosphenes and magnetophosphenes. While the slightest touch with a needle tip evokes a tremendous spike response in afferent fibers of ampullae of Lorenzini, their sensitivity to a uniform pressure with a focused ultrasound beam is rather low [113]. Thus an obvious candidate, the photoreceptor or bipolar ribbon synapse, is not firmly supported.

CONCLUSION

Hypothesis on possible visual effects of UPE (biophotons) can be divided into three groups. Firstly, the UPE was considered the source of "retinal dark light" identified with the discrete dark noise of photoreceptors. The idea was tested experimentally; it appeared that the UPE from the retina and other parts of the eye does exist, but its intensity is at least two orders of magnitude lower than necessary to explain the photoreceptor dark noise [65, 68].

Secondly, UPE induced by ionizing radiation (X-rays, γ -rays, and high-energy charged particles) was supposed to be the source of phosphenes observed by astronauts during space flight and by tumor patients treated with hard radiation from particle accelerators. X-rays decidedly convert "dark" rhodopsin into its photoactivated form, Meta II, and evoke a standard electroretinogram response. However, high doses of radiation denature rhodopsin. Therefore, the separation of three possible effects, namely chromophore isomerization by intramolecular energy transfer, UPE production, and protein denaturation is not possible based on available data.

Radiation phosphenes from high-energy particles are partly produced by Cerenkov radiation within the eye. Far larger non-Cerenkov effects causing substantial rhodopsin loss are hypothetically attributed to UPE. However, reported spectroscopically measurable

rhodopsin bleaching needs high intensity of visible light, over 8 to 10 orders of magnitude brighter than the UPE from any part of the eye measured till now. No real experimental demonstration of marked rhodopsin bleaching by charged particles via a light-initiated pathway has ever been presented.

Thirdly, the idea of production of electro-, magneto- and deformation phosphenes by biophotons can be discarded based on experimental observations from the 18th–19th centuries. All phosphenes of these sorts do not need dark adaptation and are visible at diurnal illuminance levels. Therefore, the intra-eye light emission supposedly responsible for them can hardly qualify for UPE. Besides, this level of emission would make stimulated eyes shining in the dark which has never been seen by careful observers during the last 200 years.

ACKNOWLEDGMENT

The reported study was funded by RFBR, project number 19-14-50072. The author is thankful to Drs. Stepan Gambaryan, Luba Astakhova, Alexander Rotov, and Michael Firsov for important comments on the MS.

REFERENCE

1. *Gurwitsch A.G.* Die Natur des spezifischen Erregers der Zellteilung. Arch. Mikrosk. Anat. und Entw. Mech. 100: 11–40. 1923.
2. *Gurwitsch A.G.* Physicalisches über mitogenetische Strahlen. Arch. Mikrosk. Anat. und Entw. Mech. 103: 490–498. 1924.
3. *Gurwitsch L., Anikin A.* Das Cornealepithel as Detector and Sender mitogenetischer Strahlung. Wilhelm Roux Arch. Entw. Mech. Org. 113: 731–739. 1928.
4. *Volodyaev I., Belousov V.V.* Revisiting the mitogenetic effect of ultra-weak photon emission. Front. Physiol. 6: 241. 2015.
5. *Langmuir I.* On pathological science. Lecture of 1953 transcribed by R.N. Hall and published in Physics Today. 42: 36–48. 1989.
6. *Sun Y., Wang Ch., Dai J.* Biophotons as neural communication signals demonstrated by in situ biophoton autography. Photochem. Photobiol. Sci. 9: 315–322. 2010.
7. *Prasad A., Pospíšil P.* Ultra-weak photon emission induced by visible light and ultraviolet A radiation via photoactivated skin chromophores: *in vivo* charge coupled device imaging. J. Biomed. Optics. 17: 085004. 2012.
8. *Cifra M., Pospíšil P.* Ultra-weak photon emission from biological samples: Definition, mechanisms, properties, detection and applications. J. Photochem. Photobiol. B: Biology. 139: 2–10. 2014.
9. *Ortega-Ojeda F., Calcerrada M., Ferrero A., Campos J., Garcia-Ruiz C.* Measuring the human ultra-weak photon emission distribution using an electron-multiplying, charge-coupled device as a sensor. Sensors. 18: 1152. 2018.
10. *Novo E., Parola M.* Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. Fibrogenesis & Tissue Repair. 1: 5. 2008.
11. *Murphy M.E., Sies H.* Visible-range low-level chemiluminescence in biological systems. Methods in Enzymology. 186: 595–610. 1990.
12. *Albertin R., Abuja P.M.* Monitoring low-density lipoprotein oxidation by low-level chemiluminescence. Free Rad. Res. 29: 75–83. 1998.
13. *Turrens J.F.* Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J. Physiol. 552 (Pt 2): 335–344. 2003.
14. *Dickinson B.C., Chang C.J.* Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. Nature Chem. Biol. 7: 504–511. 2011.
15. *Fedorova G.F., Trofimov A.V., Vasil'ev R.F., Veprintsev T.L.* Peroxy-radical mediated chemiluminescence: mechanistic diversity and fundamentals for antioxidant assay. ARCI VOC. VIII. 163–215. 2007.
16. *Catala A.* An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. Rev. Internat. J. Biochem. & Cell Biol. 38: 1482–1495. 2006.
17. *Fliesler S.J., Anderson R.E.* Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina. Progress in Lipid Res. 22: 79–131. 1983.
18. *Daemen F.J.M.* Vertebrate rod outer segment membranes. Biochim. Biophys. Acta. 300: 255–288. 1973.

19. *Bokkon I., Vimal R.L.P.* Retinal phosphenes and discrete dark noises in rods: a new biophysical framework. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 96: 255–259. 2009.
20. *Salari V., Scholkmann F., Bokkon I., Shahbazi F., Tuszynski J.* The Physical Mechanism for Retinal Discrete Dark Noise: Thermal Activation or Cellular Ultraweak Photon Emission? *PLoS One.* 11(3): e0148336. 2016.
21. *Salari V., Scholkmann F., Vimal R.L.P., Csaszar N., Mehdi Aslani M., Bokkon I.* Phosphenes, retinal discrete dark noise, negative afterimages and retinogeniculate projections: A new explanatory framework based on endogenous ocular luminescence. *Progr. Retinal and Eye Res.* 60:101e1. 2017.
22. *Burgos R.C.R., Schoeman J.C., Winden L.J.V., Červinková K., Ramautar R., Van Wijk E.P.A., Cifra M., Berger R., Hankemeier T., Greef J.V.* Ultra-weak photon emission as a dynamic tool for monitoring oxidative stress metabolism. *Scient. Rep.* 7: 1229. 2017.
23. *Gurwitsch A.G., Gurwitsch L.D.* Mitogenetic Radiation. M.: Medgiz, 1945. (In Russ).
24. *Ives J.A., van Wijk E.P.A., Bat N., Crawford C., Jonas W.A., Jonas W.B., van Wijk R., van der Greef J.* Ultraweak Photon Emission as a Non-Invasive Health Assessment: A Systematic Review. *PLoS One.* 9(2): e87401. 2014.
25. *Murugana N.J., Rouleaub N., Karbowskic L.M., Persinger M.A.* Biophotonic markers of malignancy: Discriminating cancers using wavelength-specific biophotons. *Biochem. Biophys. Rep.* 13: 7–11. 2018.
26. *Calcerrada M., Garcia-Ruiz C.* Human Ultraweak Photon Emission: Key Analytical Aspects, Results and Future Trends – A Review. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 49: 368–381. 2019.
27. *Tessaro L.W.E., Dotta B.T., Persinger M.A.* Bacterial biophotons as non-local information carriers: Species-specific spectral characteristics of a stress response. *Microbiol. Open.* 8(6): e00761. 2018.
28. *Mothersill C., Smith R., Wang J., Rusin A., Fernandez-Palomo C., Fazzari J., Seymour C.* Biological Entanglement–Like Effect After Communication of Fish Prior to X-Ray Exposure. Dose-Response. *Internat. J. Jan. March:* 1–17. 2018.
29. *Rahnama M., Tuszynski J.A., Bokkon I., Cifra M., Sardar P., Salari V.* Emission of mitochondrial biophotons and their effect on electrical activity of membrane via microtubules. *J. Integrat. Neurosci.* 10: 65–88. 2011.
30. *Koumar S., Boone K., Tuszynski J.A., Barclay P., Simon K.* Possible existence of optical communication channels in the brain. *Scient. Rep.* 6: 36508. 2016.
31. *Tang R., Dai J.* Spatiotemporal imaging of glutamate-induced biophotonic activities and transmission in neural circuits. *PLoS One.* 9: e85643. 2014.
32. *Bokkon I., Salari V., Tuszynski J.A., Antal I.* Estimation of the number of biophotons involved in the visual perception of a single-object image: biophoton intensity can be considerably higher inside cells than outside. *J. Photochem. Photobiol. B.* 100: 160–166. 2010.
33. *Bokkon I.* Visual perception and imagery: a new molecular hypothesis. *Biosystems.* 96: 178–184. 2009.
34. *Cacha L.A., Poznanski R.R.* Genomic instantiation of consciousness in neurons through a biophoton field theory. *J. Integr. Neurosci.* 132: 253–292. 2014.
35. *Wang Z., Wang N., Lib Z., Xiao F., Dai J.* Human high intelligence is involved in spectral redshift of biophotonic activities in the brain. *PNAS.* 113: 8753–8758. 2016.
36. *Helmholtz H.* Treatise on physiological optics. Vol. II, English translation. Dover Publications. N.Y. 1962. (Handbuch der physiologischen Optik. 3 Ausgabe. 1909).
37. *Barlow H.B.* Retinal noise and absolute threshold. *J. Opt. Soc. Am.* 46: 634–639. 1956.
38. *de Vries H.* Comment to Dr. Wald's lecture. *Documenta Ophthalmol.* 3: 137. 1949.
39. *Barlow H.B.* Purkinje shift and retinal noise. *Nature.* 179: 255–256. 1957.
40. *Baylor D.A., Lamb T.D., Yau K.-W.* The membrane current of single rod outer segments. *J. Physiol.* 288: 589–611. 1979.
41. *Baylor D.A., Matthews G., Yau K.-W.* Two components of electrical dark noise in toad retinal rod outer segments. *J. Physiol.* 309: 591–621. 1980.
42. *Rieke F., Baylor D.A.* Molecular origin of continuous dark noise in rod photoreceptors. *Biophys. J.* 71: 2553–2572. 1996.
43. *Astakhova L.A., Nikolaeva D.A., Fedotkina T.V., Govardovskii V.I., Firsov M.L.* Elevated cAMP improves signal-to-noise ratio in amphibian rod photoreceptors. *J. Gen. Physiol.* 149: 689–701. 2017.
44. *Lamb T.D., Heck M., Kraft T.W.* Implications of dimeric activation of PDE6 for rod phototransduction. *Open Biol.* 8: 180076. 2018.
45. *Baylor D.A., Lamb T.D., Yau K.-W.* Responses of retinal rods to single photons. *J. Physiol.* 288: 613–634. 1979.
46. *Lamb T.D., Pugh E.N. Jr.* Phototransduction, dark adaptation, and rhodopsin regeneration. The Proctor lecture. *Investigat. Ophthalmol. Visual Sci.* 47: 5138–5152. 2006.
47. *Arshavsky V.Y., Burns M.E.* Photoreceptor signaling: supporting vision across a wide range of light intensities. *J. Biol. Chem.* 287: 1620–1626. 2012.

48. *Arshavsky V.Y., Burns M.E.* Current understanding of signal amplification in phototransduction. *Cell. Logistics*. 4: e29390. 2014.
49. *Lamb T.D., Hunt D.M.* Evolution of the vertebrate phototransduction cascade activation steps. *Dev. Biol.* 431: 77–92. 2017.
50. *Lamb T.D., Patel H.R., Chuah A., Hunt D.M.* Evolution of the shut-off steps of vertebrate phototransduction. *Open Biol.* 8: 170232. 2018.
51. *Donner K.* Spectral and Thermal Properties of Rhodopsins: Closely Related but not Tightly Coupled. *Russ. J. Physiol.* 106(4): 421–435. 2020. <https://doi.org/10.31857/S086981392004001>
52. *Firsov M. L., Govardovskii V.I.* Dark noise of visual pigments with different absorption maxima. *Sensornye Sistemy*. 4: 25–34. 1990. (In Russ).
53. *Donner K., Firsov M.L., Govardovskii V.I.* The frequency of isomerization-like “dark” events in rhodopsin and porphyropsin rods of the bull-frog retina. *J. Physiol.* 428: 673–692. 1990.
54. *Firsov M. L., Donner K., Govardovskii V.I.* pH and rate of “dark” events in toad retinal rods: test of a hypothesis on the molecular origin of photoreceptor noise. *J. Physiol.* 539(3): 837–846. 2002.
55. *Luk H.L., Bhattacharyya N., Montisci F., Morrow J.M., Melaccio F., Wada A., Sheves M., Fanelli F., Chang B.S.W., Olivucci M.* Modulation of thermal noise and spectral sensitivity in Lake Baikal cottoid fish rhodopsins. *Scient. Rep.* 6: 38425. 2016.
56. *Luo D.G., Yue W.W., Ala-Laurila P., Yau K.-W.* Activation of visual pigments by light and heat. *Science*. 332: 1307–1312. 2011.
57. *Gozem S., Schapiro I., Ferré N., Olivucci M.* On the molecular mechanism of thermal noise in rod photoreceptors. *Science*. 337: 1225–1228. 2012.
58. *Yanagawa M., Kojima K., Yamashita T., Imamoto Y., Matsuyama T., Nakanishi T., Yamano Y., Wada A., Sako Y., Shichida Y.* Origin of the low thermal isomerization rate of rhodopsin chromophore. *Scient. Rep.* 5: 11081. 2015.
59. *Barlow R.B. Jr., Birge R.R., Kaplan E., Tallent J.R.* On the molecular origin of photoreceptor noise. *Nature*. 366: 64–66. 1993.
60. *Barlow R.R., Birge R.B.* On the molecular origins of thermal noise in vertebrate and invertebrate photoreceptors. *Biophys. Chem.* 55: 115–126. 1995.
61. *Sampath A.P., Baylor D.A.* Molecular Mechanism of Spontaneous Pigment Activation in Retinal Cones. *Biophys. J.* 83: 184–193. 2002.
62. *Fu Y., Kefalov V., Luo D.-G., Xue T., Yau K.-W.* Quantal noise from human red cone pigment. *Nat. Neurosci.* 11: 565–571. 2008.
63. *Bókkon I., Vimal R.L.P.* Retinal phosphenes and discrete dark noises in rods: A new biophysical framework. *J. Photochem. Photobiol. B*. 96: 255–259. 2009.
64. *Wang C., Bókkon I., Dai J., Antal I.* Spontaneous and visible light-induced ultraweak photon emission from rat eyes. *Brain Res.* 1369: 1–9. 2011.
65. *Li Z., Dai J.* Biophotons Contribute to Retinal Dark Noise. *Neurosci. Bull.* 32: 246–252. 2016.
66. *Salari V., Scholkmann F., Bokkon I., Shahbazi F., Tuszyński J.* The physical mechanism for retinal discrete dark noise: Thermal activation or cellular ultraweak photon emission? *PLoS One*. 11: e0148336. 2016.
67. *Salari V., Scholkmann F., Vimal R.L.P., Császár N., Aslani M., Bókkon I.* Phosphenes, retinal discrete dark noise, negative afterimages and retinogeniculate projections: A new explanatory framework based on endogenous ocular luminescence. *Prog. Retin. Eye Res.* 60: 101–119. 2017.
68. *Govardovskii V.I., Astakhova L.A., Rotov A.Yu., Firsov M.L.* Rejection of the biophoton hypothesis on the origin of photoreceptor dark noise. *J. Gen. Physiol.* 151: 887–897. 2019.
69. *Craik K.J.W.* Origin of visual after-images. *Nature*. 145: 512. 1940.
70. *van Lier R., Vergeer M., Anstis S.* Filling-in afterimage colors between the lines. *Curr. Biol.* 19: R323–R324. 2009.
71. *Powell G., Bompas A., Sumner P.* Making the incredible credible: Afterimages are modulated by contextual edges more than real stimuli. *J. Vision*. 12: 1–13. 2012.
72. *Zeki S., Cheadle S., Pepper J., Mylonas D.* The constancy of colored after-images. *Front. Hum. Neurosci.* 11: 229. 2017.
73. *Rotov A.Yu., Astakhova L.A., Firsov M.L., Govardovskii V.I.* Light Adaptation of Retinal Rods, Adaptation Memory and Afterimages. *Russ. J. Physiol.* 106: 462–473. 2020. (In Russ).
74. *Govardovskii V.I., Fyhrquist N., Reuter T., Kuzmin D., Donner K.* In search of the visual pigment template. *Visual Neurosci.* 17: 509–528. 2000.
75. *Griffin D.R., Hubbard R., Wald G.* The sensitivity of the human eye to infra-red radiation. *J. Opt. Soc. Am.* 37: 546–554. 1947.
76. *Pinegin N.I.* Scotopic (rod) sensitivity of human eye in red and infrared spectrum. *Proc. Acad. Sci. USSR.* 56: 811–814. 1947. (In Russ.)

77. *Govardovskii V.I., Zueva L.V.* Spectral sensitivity of the frog eye in the ultraviolet and visible region. *Vision Res.* 14: 1317–1321. 1974.
78. *Kropf A.* Intramolecular energy transfer in rhodopsin. *Vision Res.* 7: 811–818. 1967.
79. *Lipetz L.E.* The X-ray and radium phosphenes. *Br. J. Ophthalmol.* 39: 577–598. 1955.
80. *Lipetz L.E.* Electrophysiology of the x-ray phosphene. *Radiat. Res.* 2: 306–329. 1955.
81. *Steidley K.D.* The Radiation Phosphene. *Vision Res.* 30: 1139–1143. 1990.
82. *Bachofer C.S., Wittry S.E.* Electroretinogram in response to x-ray stimulation. *Science.* 133: 642–644. 1961.
83. *Doly M., Isabelle D.B., Vincent P., Gaillard G., Meyniel G.* Mechanism of the formation of X-ray-induced phosphenes. I. Electrophysiological investigations. *Radiat. Res.* 82: 93–105. 1980.
84. *Peskin J.C.* The effects of irradiation upon visual purple. *Am. J. Ophthalmol.* 39: 849–854. 1955.
85. *Doly M., Isabelle D.B., Vincent P., Gaillard G., Meyniel G.* Mechanism of the formation of X ray-induced phosphenes. II. Photochemical investigations. *Radiat. Res.* 82: 430–440. 1980.
86. *Pinsky L.S., Osborne W.Z., Bailey J.V., Benson R.E., Thompson L.F.* Light flashes observed by astronauts on Apollo 11 through Apollo 17. *Science.* 183: 957–959. 1974.
87. *Pinsky L.S., Osborne W.Z., Hoffman R.A., Bailey J.V.* Light flashes observed by astronauts on Skylab 4. *Science.* 188: 928–930. 1975.
88. *Budinger T.F., Tobias C.A., Huesman R.H., Upham F.T., Wieskamp T.F., Hoffman R.A.* Apollo–Soyuz light-flashes observations. *Life Sci. Space Res.* 15: 141–146. 1977.
89. *Bidoli V., Casolino M., De Pascale M.P., Furano G., Morselli A., Picozza L.P., Reali E., Sparvoli R., Galper A.M., Ozerov A.V., Popov Yu.V., Vavilov N.R., Alexandrov A.P., Avdeev S.V., Barbiellini G., Bonvicini W., Vacchi A., Zampa N., Bartalucci S., Mazzenga G., Ricci M., Adriani O., Spillantini P., Boezio M., Carlson P., Fuglesang C., Castellini G., Sannita W.G.* Study of cosmic rays and light flashes on board space station MIR: the SilEye experiment. *Adv. Space Res.* 25: 2075–2079. 2000.
90. *Fuglesang C., Narici L., Picozza P., Sannita W.G.* Light flashes in low Earth orbit: survey responses from 59 astronauts. *Aviat. Space Envir. Med.* 77: 449–452. 2006.
91. *Sannita W.G., Narici L., Picozza P.* Positive visual phenomena in space: a scientific case and a safety issue in space travel. *Vision Res.* 46: 2159–2165. 2006.
92. *Schardt D., Kavatsyuk O., Krämer M., Durante M.* Light flashes in cancer patients treated with heavy ions. *Brain Stimul.* 6: 416–417. 2013.
93. *Mathis T., Vignot S., Leal C., Caujolle J.-P., Maschi C., Mauget-Faÿsse M., Kodjikian L., Baillif S., Hérault J., Thariat J.* Mechanisms of phosphenes in irradiated patients. *Oncotarget.* 8: 64579–64590. 2017.
94. *McNulty P.J., Pease V.P., Pinsky L.S., Bond V.P., Schimmerling W., Vosburgh K.G.* Visual sensations induced by relativistic nitrogen nuclei. *Science.* 178: 160–162. 1972.
95. *McNulty P.J., Pease V.P., Bond V.P.* Comparison of the light-flash phenomena observed in space and in laboratory experiments. *Life Sci. Space Res.* 15: 135–140. 1977.
96. *McNulty P.J., Pease V.P., Bond V.P.* Visual sensations induced by relativistic pions. *Radiat. Res.* 66: 519–530. 1976.
97. *McNulty P.J., Pease V.P., Bond V.P.* Muon-induced visual sensations. *J. Opt. Soc. Am.* 66: 49–55. 1976.
98. *McNulty P.J., Pease V.P., Bond V.P.* Visual Phenomena Induced by Relativistic Carbon Ions With and Without Cerenkov Radiation. *Science.* 201: 341–343. 1978.
99. *Trukhanov K.A., Brindikova T.A., Zak P.P., Lebedev B.M., Spassky A.V., Fedorovich I.B., Ostrovsky M.A.* Effects of charged heavy particles on rhodopsin and isolated retina of the eye. *Proceed. Russ. Acad. Sci.* 377: 715–717. 2001. (In Russ).
100. *Narici L., Paci M., Brunetti V., Rinaldi A., Sannita W.G., De Martino A.* Bovine rod rhodopsin. 1. Bleaching by luminescence in vitro by recombination of radicals from polyunsaturated fatty acids. *Free Radical Biol. Med.* 53: 482–487. 2012.
101. *Narici L., Paci M., Brunetti V., Rinaldi A., Sannita W.G., Carozzo S., De Martino A.* Bovine rod rhodopsin: 2. Bleaching in vitro upon ¹²C ions irradiation as source of effects as light flash for patients and for humans in space. *Internat. J. Radiat. Biol., Early Online:* 1–5. 2013.
102. *Boll F.* Zur Anatomie und Physiologie der retina. *Arch. Anat. Physiol. (Physiol. Abt).* 1877: 4–36. (Translated into English and reprinted: *Boll F.* On the anatomy and physiology of the retina.) *Vision Res.* 17: 1249–1265. 1977.
103. *DeGrip W.J., Rothschild K.J.* Structure and mechanisms of vertebrate visual pigments. In *Handbook of Biological Physics.* Vol. 3. Eds. Stavenga D.G., DeGrip W.J. & Pugh E.N. Jr. Chapt. 1: 1–54. Elsevier Science B.V. North Holland. 2000.
104. *Lewis J.W., van Kuijk F.J.G.M., Carruthers J.A., Kliger D.S.* Metarhodopsin III formation and decay kinetics: Comparison of human and bovine rhodopsin. *Vision Res.* 37: 1–8. 1997.
105. *Korenyak D.A., Govardovskii V.I.* The effect of temperature on the slow stages of photolysis of rhodopsin in intact rods of frog and rat retinas. *Sensory Systems.* 26: 141–149. 2012. (In Russ).

106. *Brindley G.S.* The site of electrical excitation of the human eye. *J. Physiol.* 127: 189–200. 1955.
107. *Carpenter R.H.* Electrical stimulation of the human eye in different adaptational states. *J. Physiol.* 221: 137–148. 1972.
108. *Wolff J.G., Delacour J., Carpenter R.H.S., Brindley G.S.* The patterns seen when alternating electric current is passed through the eye, *Quart. J. Exp. Psychol.* 20: 1–10. 1968.
109. *Lövsund P., Öberg P.Å., Nilsson S.E.G., Reuter T.* Magnetophosphenes: a quantitative analysis of thresholds. *Med. & Biol. Eng. & Comput.* 18: 326–334. 1980.
110. *Attwell D.* Interaction of low frequency electric fields with the nervous system: the retina as a model system. *Radiat. Prot. Dosimetry.* 106: 341–348. 2003.
111. *Matthews G., Fuchs P.* The diverse roles of ribbon synapses in sensory neurotransmission. *Nat. Rev. Neurosci.* 11(12): 812–22. 2010.
112. *Kalmijn A.J.* Electric and magnetic field detection in elasmobranch fishes. *Science.* 218: 916–918. 1982.
113. *Brown G.R., Ilyinsky O.B.* Physiology of electroreceptors. Nauka Publ. Leningrad. 1984. (In Russ).
114. *Schneeweis D.M., Schnapf J.L.* Photovoltage of rods and cones in the macaque retina. *Science.* 268: 1053–1056. 1995.
115. *Grüsser O.-J., Hagner M.* On the history of deformation phosphenes and the idea of internal light generated in the eye for the purpose of vision. *Documenta Ophthalmol.* 74: 57–85. 1990.

TO CITE THIS ARTICLE:

Govardovskii V.I. Biophotons and Visual Phenomena. *Russian J. Physiology.* 106(8): 927–951.
DOI: 10.31857/S0869813920080117

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

ЛИЗОСФИНГОЛИПИДЫ КРОВИ В ДИАГНОСТИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ,
АССОЦИИРОВАННЫХ С ДИСФУНКЦИЕЙ ЛИЗОСОМ

© 2020 г. Т. С. Усенко^{1, 2}, Г. В. Байдакова³, Е. Ю. Захарова³, С. Н. Пчелина^{1, 2, *}

¹*Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова
НИИ “Курчатовский институт”, Гатчина, Россия*

²*Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия*

³*Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова, Москва, Россия*

**E-mail: sopchelina@hotmail.com*

Поступила в редакцию 07.03.2020 г.

После доработки 16.04.2020 г.

Принята к публикации 30.05.2020 г.

Лизосфинголипиды представляют собой N-деацетилированную форму сфинголипидов и рассматриваются как потенциальные маркеры заболеваний, относящихся к лизосомным болезням накопления (ЛБН), таким как болезнь Гоше, Фабри, Краббе и болезнь Ниманна—Пика, а также крайне редким ЛБН, таким как GM1 и GM2 ганглиозидозов. На сегодняшний день существует разнообразие методов для оценки уровня лизосфинголипидов в плазме крови. Однако наиболее перспективным является метод жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии (ВЭЖХ/МС/МС), который позволяет проведение одновременной оценки концентрации нескольких лизосфинголипидов, таких как HexSph (смесь GlcSph и GalSph), LysoGb3, LysoGM1, LysoGM2, LysoSM и LysoSM509 в плазме, моче, сухих пятнах крови. Несмотря на то, что оценка лизосфинголипидов в плазме крови является золотым стандартом, метод проведения ВЭЖХ/МС/МС при экстракции метаболитов из сухих пятен крови является быстрым и надежным методом для оценки количественного состава лизосфинголипидов, позволяющим идентифицировать ЛБН такие как болезнь Гоше (HexSph), болезнь Фабри (LysoGb3), недостаточность просапозина (HexSph, LysoGb3), болезнь Ниманна—Пика типа A/B и C (LysoSM и LysoSM509). Диагностика ряда ЛБН с оценкой концентрации лизосфинголипидов в крови методом ВЭЖХ/МС/МС проводится в настоящее время в Медико-генетическом научном центре, Москва. Нами данный метод применен для оценки уровня лизосфинголипидов при болезни Паркинсона, ассоциированной с мутацией в гене лизосомного фермента — глюкоцереброзидазы (GBA-БП). Впервые показано повышение уровня HexSph (галактозилсфингозин — GalSph) и глюкозилсфингозина (GlcSph) в крови у пациентов с GBA-болезни Паркинсона, что позволяет сделать предположение о механизме патогенеза данного заболевания. В настоящем обзоре описаны подходы к диагностике ЛБН с использованием оценки лизосфинголипидов крови, а также обсуждается возможное участие данных метаболитов в стабилизации нейротоксичных форм альфа-синуклеина при болезни Паркинсона.

Ключевые слова: лизосфинголипиды, ВЭЖХ/МС/МС, лизосомные болезни накопления, болезнь Паркинсона

DOI: 10.31857/S0869813920080105

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ВЭЖХ/МС/МС – метод жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией
ЛБН – лизосомные болезни накопления
МС/МС – тандемная масс-спектрометрия
GalCer – галактозилцерамид
GalSph – галактозилсфингозина
GBA-БП – пациенты с болезнью Паркинсона, являющиеся носителями мутаций в гене *GBA*
GCase – глюкоцереброзидазы
GlcCer – глюкозилцерамида
GlcSph – глюкозилсфингозина
HexSph – гексозилсфингозин
LysoGb3 – глоботриазилсфингозина
LysoGM1/ LysoGM2 – лизоганглиозиды
LysoSM – лизосфингомиелин

Сфинголипидозы – это группа заболеваний, относящаяся к классу лизосомных болезней накопления, которые характеризуются снижением активности лизосомных ферментов за счет мутаций в генах, кодирующих эти ферменты, и как следствие, накоплением соответствующих субстратов в лизосоме [1]. Интересно отметить, что мутации в генах *GBA* и *SMPD1*, которые кодируют ферменты глюкоцереброзидазу и кислую сфингомиелиназу соответственно, в гомозиготном состоянии приводят к развитию ЛБН, таких как болезнь Гоше и болезнь Ниманна–Пика соответственно. Эти мутации являются также факторами высокого риска распространенного нейродегенеративного заболевания болезни Паркинсона [2–4].

Диагностика данной группы заболеваний основана, как правило, на использовании биохимических методов, в основном на определении остаточной активности ферментов в клетках крови. В ряде случаев проводятся молекулярно-генетические исследования с целью выявления мутаций, приводящих к развитию заболевания, что позволяет подтвердить диагноз на молекулярном уровне, а также делает доступным проведение пренатальной диагностики плода в семьях. Так, например, при наиболее частой из ЛБН болезни Гоше в результате гомозиготного или компаундного гетерозиготного носительства мутаций в гене *GBA*, кодирующем фермент лизосом глюкоцереброзидазу (GCase), происходит снижение активности фермента до 5–30% (в зависимости от типа мутации) и накопление метаболита глюкозилцерамида (GlcCer), а также его деацелированной формы, глюкозилсфингозина (GlcSph) [5]. Наиболее характерным признаком болезни Гоше является наличие насыщенных субстратов макрофагов, которые многократно увеличиваются в размерах, превращаясь в клетки, называемые клетками Гоше, в печени, селезенке и костном мозге [6]. Более часто болезнь протекает по I типу с поздним началом и отсутствием вовлечения нервной системы. Также описаны нейрональные типы болезни Гоше, тип II и тип III, которые классифицируются как острая и подострая нейропатические формы этого заболевания из-за вовлечения центральной нервной системы. При данных формах болезни поражаются нейроны головного мозга, что приводит к летальному исходу в раннем возрасте [7].

Следует, однако, отметить, что в последнее время активно обсуждается вопрос о том, что оценка накапливающегося субстрата или его модифицированной формы может являться более чувствительным тестом для данной группы заболеваний. Развитие современных методов сделало возможным разработку тестов, направленных на диагностику нескольких ЛБН одновременно. В данном обзоре представлены последние данные о перспективе использования метода жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ/МС/МС) для диагностики ряда ЛБН, а также обсуждается эффективность применения данных методов для

изучения молекулярных основ развития болезни Паркинсона, ассоциированной с мутациями в генах ЛБН.

В настоящем обзоре рассмотрен метод, разработанный для диагностики следующих заболеваний: болезней Гоше, Фабри, Краббе, Ниманна–Пика, а также крайне редких ЛБН, GM1 и GM2 ганглиозидозов. Метод основан на одновременной оценке метаболитов: HexSph (смесь GlcSph и галактозилсфингозина (GalSph)), глоботриазилсфингозина (LysoGb3), лизоганглиозиды (LysoGM1, LysoGM2), лизосфингомиелины (LysoSM и LysoSM509). При этом в целях диагностики болезней Гоше и Краббе оценивают концентрацию гексозилсфингозина (HexSph), который представляет собой смесь из двух лизосифголипидов – галактозилсфингозина (GalSph) и глюкозилсфингозина (GlcSph), которые в свою очередь являются продуктами метаболизма глюкоцереброзида (GlcCer) и галактозилцерамида (GalCer) соответственно, поэтому определение их концентрации также служит объективной оценкой накопления лизосфинголипидов при дисфункции GCase. Необходимо отметить, что по отношению друг к другу GlcSph и GalSph являются стереоизомерами и для хроматографического разделения GlcCer и GalCer требуется проведение дополнительного исследования с использованием специальной колонки для хроматографии гидрофильных взаимодействий [8, 9].

ЛИЗОСФИНГОЛИПИДЫ И ИХ ФУНКЦИИ

Сфинголипиды представляют собой амфифильные соединения, происходящие из сфингоидной основы с длинной цепью (главным образом сфингозина и сфинганина), которые могут быть N-ацилированы различными жирными кислотами с образованием церамидов. Гидрофильная группа связана с гидроксильной группой сфингоидного основания через фосфодиэфирную (фосфосфинголипидную) или гликозидную (гликосфинголипидную) связь [10]. Сфинголипиды являются необходимыми компонентами цитоплазматических мембран эукариотических клеток и важными биологически активными молекулами, которые участвуют в регуляции пролиферации, дифференцировки и апоптоза клеток, а также в других биологических процессах, в том числе, могут обладать свойствами вторичных мессенджеров или внеклеточных медиаторов [11]. Основным компонентом молекулы сфинголипида является сфингоидное (сфингозиновое) основание, представляющее собой аминоксирит с длинной алифатической цепью, как правило, сфингозин — (28,3K,4E)-2-амино-4-октадецен-1,3-диол. В группе сфинголипидов можно выделить сфинголипиды со свободной аминогруппой у сфингоидного основания. Эти сфинголипиды называются лизосфинголипидами. Лизосфинголипиды были обнаружены более 30 лет назад, однако, механизм их действия при патологических состояниях изучается до настоящего времени. Лизосфинголипиды рассматривались как “токсичные метаболиты”, участвующие в патогенезе нескольких сфинголипидозов [12, 13], и было показано, что они вовлечены в различные патофизиологические механизмы [14, 15].

Таким образом, эти молекулы принимают участие в многочисленных клеточных биохимических процессах [16] и, как предполагается, непосредственно участвуют в патофизиологических механизмах нейродегенерации [17]. В последние годы благодаря развитию тандемной масс-спектрометрии точность их оценки в биологических жидкостях существенно повысилась, и почти каждый лизосфинголипид стал биомаркером сфинголипидоза [18–20]. Исключением является лизосульфатид, который не выявляется ни в плазме пациентов с метахроматической лейкодиетрофией, ни в плазме здоровых индивидуумов [21].

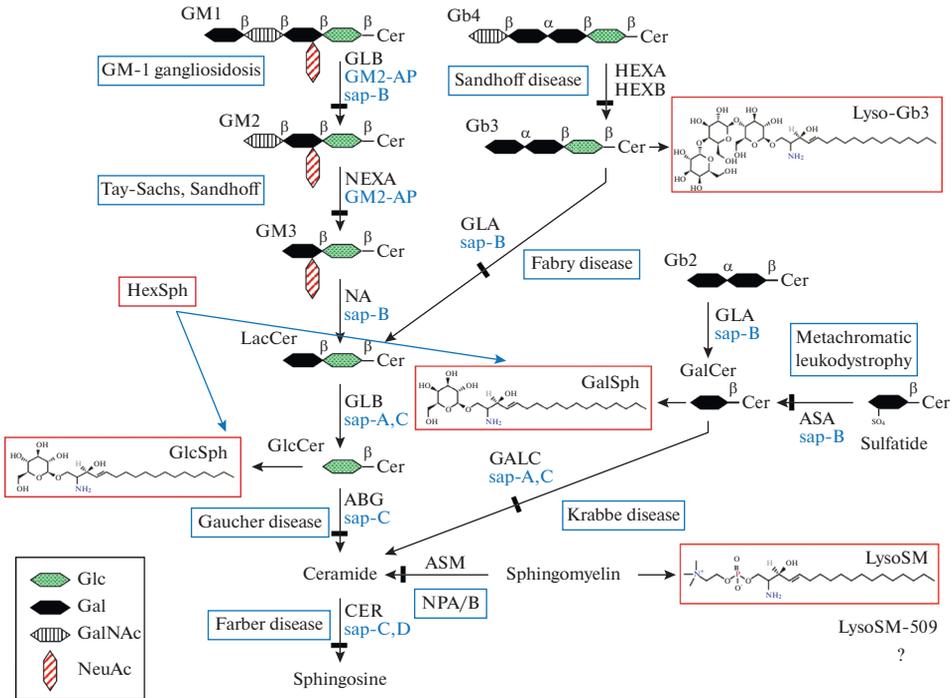


Рис. 1. Метаболические пути деградации сфинголипидов и связанные с ними сфинголипидозы (по Polo et al. [47] с модификациями).

Fig. 1. Sphingolipids degradation pathways and related sphingolipidoses (Polo et al., 2017 [47] with modifications).

СФИНГОЛИПИДОЗЫ И МЕТОД ВЭЖХ/МС/МС ДЛЯ ИХ ДИАГНОСТИКИ

Нарушение деградации сфинголипидов, характеризующейся недостаточностью лизосомных ферментов, приводит к развитию наследственных заболеваний, относящихся к классу ЛБН, называемых сфинголипидозами (рис. 1) [22]. К сфинголипидозам относятся следующие группы болезней: первичные сфинголипидозы, вызванные мутацией в гене, кодирующем лизосомный фермент (например, болезнь Гоше, болезнь Фабри, болезнь Краббе), первичные сфинголипидозы, связанные с нарушениями белков-активаторов, вовлеченных в процесс деградации сфинголипидов (дефекты сапозинов) и вторичные сфинголипидозы, которые характеризуются нарушением транспорта и слипания в эндочитарной системе. Ко вторичным сфинголипидозам относят болезнь Ниманна–Пика типа С, которая характеризуется нарушением внутриклеточного распределения холестерина [1]. Все эти нарушения передаются по аутосомно-рецессивному типу наследования, за исключением X-сцепленной болезни Фабри. Клинические проявления сфинголипидозов могут проявляться в младенчестве и детстве или позже в подростковом/взрослом возрасте (поздние формы), но могут также присутствовать в антенатальном периоде как неиммунная водянка плода [23].

Многие сфинголипидозы имеют сходные фенотипические проявления, это затрудняет диагностику и, как следствие, постановку точного диагноза, что отражается на выборе стратегии терапии. При некоторых ЛБН длительная диагностика может негативно сказываться на эффективности терапии, например, транспланта-

ция гемопоэтических стволовых клеток должна проводиться как можно раньше — до развития необратимого поражения нервной системы при лейкодистрофиях.

Для большинства из ЛБН оценка активности фермента в белых клетках крови (лейкоцитах и лимфоцитах) считается золотым стандартом для диагностики [9]. Однако в последние годы ряд исследований указывает на то, что определение концентрации лизосфинголипидов крови может быть более точным как диагностическим маркером развития ЛБН, так и чувствительным маркером ответа на применяемую терапию, в частности, ферментно-заместительную терапию [9]. В 2001 г. Chamoles и соавт. впервые показали возможность использования сухих пятен крови для определения активности нескольких ферментов с применением флуоресцентно меченного субстрата (4-метилумбеллиферон) [24], нарушение активности этих ферментов приводит к развитию ЛБН.

Оценка активности ферментов, экстрагированных из сухих пятен крови, рассматривается в качестве альтернативы для быстрой диагностики ЛБН, так как у сухих пятен крови существуют особые преимущества по сравнению с использованием обычных биологических образцов: простота взятия, небольшой объем крови, условия хранения и транспортировки (комнатная температура) [25]. Ферментативная активность в сухих пятнах крови сегодня оценивается с помощью tandemной масс-спектрометрии с использованием искусственно синтезированных субстратов, наиболее приближенных к натуральным, и внутренних стандартов, представляющих собой продукты ферментативной реакции, отличающиеся от целевых по молекулярной массе на одну или несколько CH_2 -групп [26–28]. Универсальность tandemной масс-спектрометрии позволила применять этот метод не только для определения ферментов, но и для обнаружения биомаркеров ЛБН [29]. До настоящего времени диагностика ЛБН заключалась в оценке одного метаболита в различных биологических жидкостях (плазма, моча, сухие пятна крови) методом жидкостной хроматографии в сочетании с tandemной масс-спектрометрией (ВЭЖХ/МС/МС) для диагностики одного конкретного заболевания [16, 30]. Метод ВЭЖХ/МС/МС является высокоселективным и чувствительным. Основным преимуществом данного метода является возможность идентификации различных классов соединений в биологических образцах. ВЭЖХ/МС/МС, в частности, применяется для выявления оксистеролов, что является отличным примером для диагностики болезни Ниманна–Пика типа С [9]. Методом ВЭЖХ/МС/МС было показано, что гликофинголипиды повышены при сфинголипидозах, однако, эти соединения обладали низкой чувствительностью и специфичностью, таким образом, использование их в качестве маркера было нецелесообразным [31]. В последние годы рядом исследователей было показано, что оценка накопления не прямого субстрата лизосфинголипидов, а его модифицированной формы, является наиболее чувствительным маркером ЛБН. Так, лизосфинголипиды (LysoSL), N-деацетилированные лизоформы гликофинголипидов, заметно увеличиваются у пациентов со сфинголипидозами, это указывает на то, что они потенциально могут быть полезными биомаркерами как для диагностики, так и для мониторинга лечебных эффектов при разработке терапии [32]. На рис. 1 схематически изображены метаболические пути лизосфинголипидов и их ассоциация со сфинголипидозами. Повышенный уровень глоботриазилсфингозина (LysoGb3) в плазме крови и моче наблюдался у мужчин, страдающими болезнью Фабри [30, 33] и женщин, являющихся носителями мутаций в гене *GLA*, приводящих к развитию этого заболевания [34]. Изначально повышенный уровень галактозилсфингозина (психозина) (GalSph) был ранее выявлен в мозге пациентов с болезнью Краббе [35]. В последующих исследованиях было показано увеличение уровня двух изомеров: GalSph у пациентов с болезнью Краббе [36, 37] и глюкозилсфингозина (GlcSph) у пациентов с болезнью Гоше [38]. Для диагностики и мониторинга ответа на терапию при болезни Гоше наиболее чув-

ствительным тестом сегодня является оценка GlcSph [39–41]. Значительное повышение уровня деацетилизованной формы сфингомиелина, лизосфингомиелина (LysoSM), было выявлено в плазме пациентов с болезнью Ниманна–Пика типа А/В и С [20, 41]. Недавно был выявлен новый биомаркер, лизосфингомиелин-509 (LysoSM-509) для первичной диагностики болезни Ниманна–Пика типа С [42]. Более того, соотношение этих метаболитов в плазме крови позволило провести различия между двумя заболеваниями [43, 44]. Chuang с соавт. показали, что у пациентов с болезнью Ниманна–Пика типа А/В LysoSM в сухих пятнах крови повышен приблизительно в пять раз относительно контроля, что делает его потенциальным биомаркером для данного заболевания [20]. Следует отметить, что в более ранних исследованиях предполагалось, что анализы LysoSM и LysoSM509 в образцах сухих пятен крови уступают измерениям в плазме крови и должны проводиться только в тех случаях, когда сухие пятна крови являются единственным доступным материалом [43]. В недавнем исследовании было показано, что для диагностики болезни Ниманна–Пика определение концентрации LysoSM в плазме крови является более чувствительным методом по сравнению с исследованием сухих пятен крови [9]. С другой стороны, лизоганглиозиды LysoGM1 и LysoGM2 могут быть маркерами двух очень редких ЛБН, ганглиозидозов GM1 и GM2. Чувствительность этих маркеров в плазме, как сообщается, является низкой и критической для более поздних форм [20, 44]. Polo и соавт. проанализировали эти биомаркеры у небольшой группы пациентов с ганглиозидозами (GM1 $n = 1$; GM2 $n = 2$). Было выявлено, что уровень LysoGM2 в плазме и сухих пятнах крови не отличается от уровня пациентов с поздней формой ганглиозидоза GM2, называемой болезнью Сандхоффа. Инфантильные формы ганглиозидозов GM1 и GM2 были правильно диагностированы в сухих пятнах крови [9].

Недавнее исследование на животных также показало, что оценка профиля лизосфинголипидов более эффективна в диагностических целях, чем анализ одного лизосфинголипида [45]. В настоящее время показана эффективность использования метода ВЭЖХ/МС/МС для одновременного количественного определения нескольких лизосфинголипидов в плазме крови: гексозилсфингозина (HexSph), а также LysoGb3 и LysoSM, включая новый биомаркер LysoSM-509, который является карбоксилированным аналогом LysoSM. В ходе исследования был выявлен диапазон концентрации лизосфинголипидов у здоровых детей и взрослых, который необходим для мониторинга пациентов с ЛБН при лечении. Был подтвержден диагностический потенциал HexSph, LysoGb3, LysoSM и LysoSM-509 для определения концентрации данных лизосфинголипидов у пациентов с ЛБН и тех, у кого подозревается ЛБН [9, 46].

В Медико-генетическом научном центре одновременное определение концентрации лизосфинголипидов (HexSph, LysoGb3, LysoSM и LysoSM-509) методом ВЭЖХ/МС/МС проводится с 2017 г. с целью выявления пациентов с болезнями Гоше, Краббе, Фабри и болезнью Ниманна–Пика типа С.

Таким образом, наличие единого теста на множественные недиагностированные лизосомные заболевания позволит максимально повысить рентабельность теста и эффективность лабораторного рабочего процесса.

РОЛЬ ЛИЗОСФИНГОЛИПИДОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Болезнь Паркинсона – одно из самых распространенных нейродегенеративных заболеваний, частота встречаемости которого среди лиц старше 65 лет составляет 2–3% населения в мире. В основе патогенеза этого заболевания лежит накопление и агрегация токсичных форм альфа-синуклеина в черной субстанции головного

мозга, приводящее к гибели нейронов в данной области [47]. В основном болезнь Паркинсона носит спорадический характер с отсутствием семейного анамнеза, однако, до 10% от всех пациентов сообщают о случаях этого заболевания в семьях. Из всех выявленных генетических факторов риска развития болезни Паркинсона наиболее распространенным являются мутации в гене *GBA*, который кодирует лизосомный фермент глюкоцереброзидазу. Риск развития болезни Паркинсона среди носителей мутаций в гене *GBA* увеличивает в 7–8 раз в различных популяциях в мире [3, 4]. Впервые предположение о связи мутаций в гене *GBA* и болезнью Паркинсона было сделано в 2004 г. на основании выявления симптомов паркинсонизма у пациентов с болезнью Гоше и гетерозиготных носителей мутаций в гене *GBA* [48]. В основе патогенеза болезни Гоше лежит нарушение катаболизма GlcCer, который является сфинголипидом, до церамида и глюкозы из-за снижения активности лизосомного фермента глюкоцереброзидазы (GCase, EC.3.2.1.45) по причине генетических дефектов в гене *GBA* в гомозиготном или компаунд-гетерозиготном состоянии. После трансляции синтезированный белок GCase подвергается N-гликозированию и фолдингу в эндоплазматическом ретикулуме. В эндоплазматическом ретикулуме также происходит взаимодействие GCase с лизосомальным интегральным мембранным белком типа-2 (LIMP-2), откуда дальше в виде комплекса они транспортируются в аппарат Гольджи для упаковки в везикулы с последующей транспортировкой в лизосому [49]. На сегодняшний день у пациентов с болезнью Гоше в гене *GBA* описано более 400 мутаций [50]. К наиболее распространенным мутациям относят N370S, 84GG, L444P и IVS2+1, которые встречаются в более, чем 90% мутантных аллелей [51]. Описаны как “мягкие” мутации (N370S, V394L и R463C), где остаточная ферментативная активность GCase составляет 20–35% от нормального уровня, так и “тяжелые”, при которых остаточная активность составляет 5–10% (мутации L444P, T323I) или отсутствует (84GG, T138N, F216Y, P289L, D409H, D409V, P415R, A456P, N462Q, N462D). Считается, что к 80-ти годам у 9.1% пациентов с болезнью Гоше развивается болезнь Паркинсона [52]. Молекулярный механизм развития болезни Паркинсона, ассоциированной с мутациями в гене *GBA*, остается неизвестным, однако, предполагается, что дисфункция лизосом может нарушать катаболизм альфа-синуклеина в клетках. В настоящее время выявлено накопление олигомерных форм альфа-синуклеина в головном мозге пациентов с болезнью Гоше [53]. Необходимо отметить, что альфа-синуклеин деградирует в клетке двумя путями: за счет связывания с убиквитином и последующим гидролизом в протеосомах или посредством шаперон-зависимой аутофагии [54]. Таким образом, дисфункция лизосом, наблюдаемая при болезни Гоше, может приводить к накоплению альфа-синуклеина в цитоплазме клетки, способствуя его накоплению и последующей агрегации. Последние данные позволяют выдвинуть гипотезу, согласно которой повышение и образование олигомеров альфа-синуклеина может ингибировать транспорт GCase в лизосомы, что приводит к накоплению GlcCer, дисфункции лизосомы и, как следствие, увеличению образования олигомеров альфа-синуклеина. У пациентов с *GBA*-болезни Паркинсона в цитоплазме нейронов выявляют тельца Леви, содержащие альфа-синуклеин. Исследование аутопсийного материала у данной группы пациентов показало колокализацию альфа-синуклеина и глюкоцереброзидазы в тельцах Леви [55]. Нами и другими авторами показано, что носители мутации L444P, D408H, RecTL значительно снижающих активность GCase, имеют более высокий риск и более раннее начало болезни Паркинсона по сравнению с носителями “мягких” мутаций (N370S и R496H), уменьшающих активность GCase в меньшей степени [56, 57].

Нужно отметить, что для начала патологического механизма накопления альфа-синуклеина и гибели нейронов при *GBA*-болезни Паркинсона, по-видимому, недостаточно лишь уменьшение активности глюкоцереброзидазы, поскольку не у

всех носителей мутации в гене *GBA* развивается болезнь Паркинсона в течение жизни [58]. Недавнее ассоциативное исследование выявило кумулятивный вклад генов, мутации в которых приводят к ЛБН, в риск развития болезни Паркинсона. Носители мутаций в двух генах ЛБН характеризовались более высоким риском появления этого заболевания по сравнению с носителями всего одной мутации в генах ЛБН. Носители трех мутаций в генах ЛБН встречались только в группе пациентов с болезнью Паркинсона, то есть не были выявлены в контроле [59].

За последние годы нами и другими авторами впервые была проведена оценка активности глюкоцереброзидазы и концентрации нескольких лизосфинголипидов в крови пациентов с болезнью Паркинсона, являющимися носителями мутаций в гене *GBA* (GBA-БП), методом ВЭЖХ-МС/МС. В группе пациентов с GBA-болезни Паркинсона было выявлено снижение ферментативной активности глюкоцереброзидазы и увеличение концентрации HexSph (смесь GlcSph и GalSph) как по сравнению с неврологически здоровыми индивидуумами, так и с пациентами с болезнью Паркинсона с отсутствием семейного анамнеза [8, 55, 60–62]. Интересно отметить, что снижение активности фермента глюкоцереброзидазы и увеличение концентрации HexSph в сухих пятнах крови нами также наблюдалось и в группе бессимптомных носителей мутаций в гене *GBA* (неопубликованные данные). Уровень GlcSph не был проанализирован отдельно от GalSph в нашем исследовании по техническим причинам. Нами также показано повышение концентрации олигомерных форм альфа-синуклеина в плазме крови у пациентов с болезнью Гоше [63, 64] и также в плазме крови пациентов с GBA-болезни Паркинсона [65]. В исследовании зарубежных коллег показано влияние на олигомеризацию альфа-синуклеина GlcSph, а не непосредственного субстрата глюкоцереброзидазы – GlcCer [58]. Было выявлено увеличение уровня моногексозилцерамида, церамида и сфингомиелина. Нами также было показано незначительное увеличение LysoSM, который является специфическим маркером болезни Ниманна–Пика типа А/В [8]. Интересно отметить, что мутации в гене, вызывающем данное заболевание (*SMPD1*), также являются фактором высокого риска развития болезни Паркинсона [2].

Полученные результаты подтверждают патогенетическую взаимосвязь между дисфункцией глюкоцереброзидазы, накоплением лизосфинголипидов и олигомеризацией альфа-синуклеина. Показана связь между тяжестью мутации и снижением активности глюкоцереброзидазы. Наши данные показывают, что высокий риск развития болезни Паркинсона у носителей мутации в гене *GBA* может быть связан со снижением активности глюкоцереброзидазы и повышением нейротоксичных олигомерных форм белка альфа-синуклеина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время показана эффективность анализа ВЭЖХ/МС/МС в сухих пятнах крови для количественной оценки лизосфинголипидов. Сухие пятна крови являются эффективной матрицей для скрининга нескольких сфинголипидозов (болезней Краббе, Гоше, Фабри и дефицит просапозина) с аналитическими показателями, которые сопоставимы с показателями в плазме крови. Показано, что данный метод является наиболее чувствительным в отношении диагностики и терапевтического мониторинга при лечении пациентов с ЛБН. Высокая чувствительность данного метода позволила продемонстрировать повышение лизосфинголипидов у пациентов с болезнью Паркинсона, являющихся носителями мутаций в гене *GBA* в гетерозиготном состоянии. Полученные данные предполагают возможность использования стратегий, направленных на восстановление активности GCase при болезни Гоше, а также для лечения GBA-болезни Паркинсона.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование поддержано грантом РФФ № 19-15-00315.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vanier M.T.* Complex lipid trafficking in Niemann-Pick disease type C. *J. Inherit. Metab. Dis.* 38: 187–199. 2014.
2. *Gan-Or Z., Ozelius L.J., Bar-Shira A., Saunders-Pullman R., Mirelman A., Kornreich R., Gana-Weisz M., Raymond D., Rozenkrantz L., Deik A., Gurevich T., Gross S.J., Schreiber-Agus N., Giladi N., Bressman S.B., Orr-Urtreger A.* The p.L302P mutation in the lysosomal enzyme gene SMPD1 is a risk factor for Parkinson disease. *Neurology.* 80: 1606–1610. 2013.
3. *Velayati A., Yu W.H., Sidransky E.* The role of glucocerebrosidase mutations in Parkinson disease and Lewy body disorders. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 10(3): 190–198. 2010.
4. *Emelyanov A.K., Usenko T.S., Tesson C., Senkevich K.A., Nikolaev M.A., Miliukhina I.V., Kopytova A.E., Timofeeva A.A., Yakimovsky A.F., Lesage S., Brice A., Pchelina S.N.* Mutation analysis of Parkinson's disease genes in a Russian data set. *Neurobiol. Aging.* 71: 267.e7–267.e10. 2018.
5. *Gegg M.E., Sweet L., Wang B.H., Shihabuddin L.S., Sardi S.P., Schapira A.H.* No evidence for substrate accumulation in Parkinson brains with *GBA* mutations. *Mov. Disord.* 30(8): 1085–1089. 2015.
6. *Beutler E., Kuhl W.* The diagnosis of the adult type of Gaucher's disease and its carrier state by demonstration of deficiency of b-glucosidase activity in peripheral blood leukocytes. *J. Clin. Lab. Med.* V (76): 747–755. 1970.
7. *Pastores G.* Neuropathic Gaucher disease. *Wiener Medizinische Wochenschrift.* 160 (23-24): 605–608. 2010.
8. *Pchelina S., Baydakova G., Nikolaev M., Senkevich K., Emelyanov A., Kopytova A., Miliukhina I., Yakimovskii A., Timofeeva A., Berkovich O., Fedotova E., Illarionovskii S., Zakharova E.* Blood lysosphingolipids accumulation in patients with parkinson's disease with glucocerebrosidase 1 mutations. *Mov. Disord.* 33(8): 1325–1330. 2018.
9. *Polo G., Burlina A.P., Ranieri E., Colucci F., Rubert L., Pascarella A., Duro G., Tummolo A., Padoan A., Plebani M., Burlina A.B.* Plasma and dried blood spot lysosphingolipids for the diagnosis of different sphingolipidoses: a comparative study. *Clin. Chem. Lab. Med.* 57(12): 1863–1874. 2019.
10. *Fahy E., Subramaniam S., Brown H.A., Glass C.K., Merrill A.H. Jr, Murphy R.C., Raetz C.R., Russell D.W., Seyama Y., Shaw W., Shimizu T., Spener F., van Meer G., VanNieuwenhze M.S., White S.H., Witztum J.L., Dennis E.A.* A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* 46: 839–861. 2005.
11. *Malagarie-Cazenave S., Andrieu-Abadie N., Sügüi B., Gouazü V., Tardy C., Cu villier O., Levade T.* Sphingolipid signalling: molecular basis and role in TNF-alpha-induced cell death. *Expert. Rev. Mol. Med.* 20: 1–15. 2002.
12. *Farfel-Becker T., Vitner E.B., Kelly S.L., Bame J.R., Duan J., Shinder V., Merrill A.H. Jr, Dobrenis K., Futerman A.H.* Neuronal accumulation of glucosylceramide in a mouse model of neuronopathic Gaucher disease leads to neurodegeneration. *Hum. Mol. Genet.* 15: 843–854. 2014.
13. *Choi L., Vernon J., Kopach O., Minett M.S., Mills K., Clayton P.T., Meert T., Wood J.N.* The Fabry disease-associated lipid Lyso-Gb3 enhances voltage-gated calcium currents in sensory neurons and causes pain. *Neurosci. Lett.* 594: 163–168. 2015.
14. *Lloyd-Evans E., Pelled D., Riebeling C., Futerman A.H.* Lyso-glycosphingolipids mobilize calcium from brain microsomes via multiple mechanisms. *Biochem. J.* 375: 561–565. 2003.
15. *Igisu H., Hamasaki N., Ito A., Ou W.* Inhibition of cytochrome c oxidase and hemolysis caused by lysosphingolipids. *Lipids.* 23: 345–348. 1988.
16. *Auray-Blais C., Blais C.-M., Ramaswami U., Boutin M., Germain D.P., Dyack S., Bodamer O., Pintos-Morell G., Clarke J.T., Bichet D.G., Warnock D.G., Echevarria L., West M.L., Lavoie P.* Urinary biomarker investigation in children with Fabry disease using tandem mass spectrometry. *Clin. Chim. Acta.* 438: 195–204. 2015.
17. *Platt F.M.* Sphingolipid lysosomal storage disorders. *Nature.* 510: 68–75. 2014.
18. *Rolfes A., Giese A.K., Grittner U., Mascher D., Elstein D., Zimran A., Buttcher T., Lukas J., Hübner R., Gulniz U., Rühle A., Dudsek A., Meyer W., Wittstock M., Masher H.* Glucosylsphingosine is a highly sensitive and specific biomarker for primary diagnostic and follow-up monitoring in Gaucher disease in a non-Jewish, Caucasian cohort of Gaucher disease patients. *PLoS One.* 8: e79732. 2013.
19. *Turgeon C.T., Orsini J.J., Sanders K.A., Magera M.J., Langan T.J., Escolar M.L., Duffner P., Oglesbee D., Gavrilo D., Tortorelli S., Rinaldo P., Raymond K., Matern D.* Measurement of psychosine in dried blood spots—a possible improvement to newborn screening programs for Krabbe disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* 38: 923–929. 2015.
20. *Chuang W.L., Pacheco J., Cooper S., McGovern M.M., Cox G.F., Keutzer J., Zhang X.K.* Lyso-sphingomyelin is elevated in dried blood spots of Niemann–Pick B patients. *Mol. Genet. Metab.* 111: 209–211. 2014.

21. *Mirzaian M., Kramer G., Poorthuis B.J.* Quantification of sulfatides and lysosulfatides in tissues and body fluids by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Lipid Res.* 56: 936–943. 2015.
22. *Schulze H., Sandhoff K.* Sphingolipids and lysosomal pathologies. *Biochim. Biophys. Acta.* 1841: 799–810. 2014.
23. *Vianey-Saban C., Acquaviva C., Cheillan D., Collardeau-Frachon S., Guibaud L., Pagan C., Pettazzoni M., Piraud M., Lamaziere A., Froissart R.* Antenatal manifestations of inborn errors of metabolism: biological diagnosis. *J. Inherit. Metab. Dis.* 39: 611–624. 2016.
24. *Pettazzoni M., Froissart R., Pagan C., Vanier M.T., Ruet S., Latour P., Guffon N., Fouilhoux A., Germain D.P., Levade T., Vianey-Saban C., Piraud M., Cheillan D.* LC-MS/MS multiplex analysis of lysosphingolipids in plasma and amniotic fluid: A novel tool for the screening of sphingolipidoses and Niemann–Pick type C disease. *PLoS One.* 12(7): e0181700. 2017.
25. *Chamoles N.A., Blanco M., Gaggioli D.* Diagnosis of alpha-L- iduronidase deficiency in dried blood spots on filter paper: the possibility of newborn diagnosis. *Clin. Chem.* 47:780 LP–1. 2001.
26. *Reuser A.J., Verheijen F.W., Bali D., van Diggelen O.P., Germain D.P., Hwu W.L., Lukacs Z., МьһА., Olivova P., Piraud M., Wuys B., Zhang K., Keutzer J.* The use of dried blood spot samples in the diagnosis of lysosomal storage disorders – current status and perspectives. *Mol. Genet. Metab.* (Elsevier Inc). 104: 144–148. 2011.
27. *Li Y., Scott C.R., Chamoles N.A., Ghavami A., Pinto B.M., Turecek F., Gelb M.H.* Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening. *Clin. Chem.* 50: 1785–1796. 2004.
28. *Spacil Z., Tatipaka H., Barcenas M., Scott C.R., Turecek F., Gelb M.H.* High-throughput assay of 9 lysosomal enzymes for newborn screening. *Clin. Chem.* 59: 502–511. 2013.
29. *Piraud M., Pettazzoni M., Lavoie P., Ruet S., Pagan C., Cheillan D., Latour P., Vianey-Saban C., Auray-Blais C., Froissart R.* Contribution of tandem mass spectrometry to the diagnosis of lysosomal storage disorders. *J. Inherit. Metab. Dis.* 41: 457–477. 2018.
30. *Polo G., Burlina A., Furlan F., Kolamunnage T., Cananzi M., Giordano L., Zaninotto M., Plebani M., Burlina A.* High level of oxysterols in neonatal cholestasis: a pitfall in analysis of biochemical markers for Niemann–Pick type C disease. *Clin. Chem. Lab. Med.* 54: 1221–1229. 2016.
31. *Boutin M., Gagnon R., Lavoie P., Auray-Blais C.* LC-MS/MS analysis of plasma lyso-Gb3 in Fabry disease. *Clin. Chim. Acta.* 414: 273–280. 2012.
32. *Dekker N., van Dussen L., Hollak C.E., Overkleeft H., Scheij S., Ghauharali K., van Breemen M.J., Ferraz M.J., Groener J.E., Maas M., Wijburg F.A., Speijer D., Tylki-Szymanska A., Mistry P.K., Boot R.G., Aerts J.M.* Elevated plasma glucosylsphingosine in Gaucher disease: relation to phenotype, storage cell markers, and therapeutic response. *Blood.* 118: e118–127. 2011.
33. *Ferraz M.J., Kallemijn W.W., Mirzaian M., Herrera Moro D., Marques A., Wisse P., Willems L.J., Overkleeft H.S., Aerts J.M.* Gaucher disease and Fabry disease: New markers and insights in pathophysiology for two distinct glycosphingolipidoses. *Biochim. Biophys. Acta.* 1841: 811–825. 2014.
34. *Aerts J.M., Groener J.E., Kuiper S., Donker-Koopman W.E., Strijland A., Ottenhoff R., van Roomen C., Mirzaian M., Wijburg F.A., Linthorst G.E., Vedder A.C., Rombach S.M., Cox-Brinkman J., Somerharju P., Boot R.G., Hollak C.E., Brady R.O., Poorthuis B.J.* Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 2812–2817. 2008.
35. *Gold H., Mirzaian M., Dekker N., Joao Ferraz M., Lugtenburg J., Cod e J.D., Marel G.A., Overkleeft H.S., Linthorst G.E., Groener J.E., Aerts J.M., Poorthuis B.J.* Quantification of globotriaosylsphingosine in plasma and urine of fabry patients by stable isotope ultraperformance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.* 59: 547–556. 2013.
36. *Miyatake T., Suzuki K.* Globoid cell leukodystrophy: additional deficiency of psychosinegalactosidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48: 538–543. 1977.
37. *Igisu H., Suzuki K.* Analysis of galactosylsphingosine (psycho-sine) in the brain. *J. Lipid Res.* 25: 1000–1006. 1984.
38. *Chuang W-L., Pacheco J., Zhang X.K., Martin M.M., Biski C.K., Keutzer J.M., Wenger D.A., Caggana M., Orsini J.J.* Determination of psychosine concentration in dried blood spots from newborns that were identified via new-born screening to be at risk for Krabbe disease. *Clin. Chim. Acta.* 419: 73–76. 2013.
39. *Murugesan V., Chuang W.L., Liu J., Lischuk A., Kacena K., Lin H., Pastores G.M., Yang R., Keutzer J., Zhang K., Mistry P.K.* Glucosylsphingosine is a key biomarker of Gaucher disease. *Am. J. Hematol.* 91(11): 1082–1089. 2016.
40. *Elstein D., Mellgard B., Dinh Q., Lan L., Qiu Y., Cozma C., Eichler S., Buttcher T., Zimran A.* Reductions in glucosylsphingosine (lyso-Gb1) in treatment-naive and previously treated patients receiving velaglucerase alfa for type 1 Gaucher disease: Data from phase 3 clinical trials. *Mol. Genet. Metab.* 122(1–2): 113–120. 2017.
41. *Tylki-Szymanska A., Szymanska-Ro ek P., Hasiński P., Ługowska A.* Plasma chitotriosidase activity versus plasma glucosylsphingosine in wide spectrum of Gaucher disease phenotypes – A statistical insight. *Mol. Genet. Metab.* 123(4): 495–500. 2018.
42. *Welford R.W., Garzotti M., Marques Lourenzo C., Mengel E., Marquardt T., Reunert J., Amraoui Y., Kolb S.A., Morand O., Groenen P.* Plasma lysosphingomyelin demonstrates great potential as a diag-

- nostic biomarker for Niemann–Pick disease type C in a retrospective study. PLoS One. 9: e114669. 2014.
43. *Giесе А.-К., Mascher H., Grittner U., Eichler S., Kramp G., Lukas J., te Vruchte D., Al Eisa N., Cortina-Borja M., Porter F.D., Platt F.M., Rolfs A.* A novel, highly sensitive and specific biomarker for Niemann–Pick type C1 disease. *Orphanet. J. Rare Dis.* 10: 78. 2015.
 44. *Kuchar L., Sikora J., Gulinello M.E., Poupetova H., Lugowska A., Malinova V., Jahnova H., Asfaw B., Ledvinova J.* Quantitation of plasmatic lysosphingomyelin and lysosphingomyelin-509 for differential screening of Niemann–Pick A/B and C diseases. *Anal. Biochem.* 525: 73–77. 2017.
 45. *Piraud M., Pettazzoni M., Lavoie P., Ruet S., Pagan C., Cheillan D., Latour P., Vianey-Saban C., Auray-Blais C., Froissart R.* Contribution of tandem mass spectrometry to the diagnosis of lysosomal storage disorders. *J. Inherit. Metab. Dis.* 41: 457–477. 2018.
 46. *Ferraz M.J., Marques A.R., Gaspar P., Mirzaian M., van Roomen C., Ottenhoff R., Alfonso P., Irgon P., Giraldo P., Wisse P., S6 Miranda C., Overkleeft H.S., Aerts J.M.* Lysoglycosphingolipid abnormalities in different murine models of lysosomal storage disorders. *Mol. Genet. Metab.* 117: 186–193. 2016.
 47. *Polo G., Burlina A.P., Kolamunnage T.B., Zampieri M., Dionisi-Vici C., Strisciuglio P., Zaninotto M., Plebani M., Burlina A.B.* Diagnosis of sphingolipidoses: a new simultaneous measurement of lysosphingolipids by LC-MS/MS. *Clin. Chem. Lab. Med.* 55(3): 403–414. 2017.
 48. *Poewe W., Seppi K., Tanner C. M., Halliday G. M., Brundin P., Volkman J., Schrag A. E., Lang A.E.* Parkinson disease. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 3: 17013. 2017.
 49. *Velayati A., Yu W.H., Sidransky E.* The role of glucocerebrosidase mutations in Parkinson disease and Lewy body disorders. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 10(3): 190–198. 2010.
 50. *Blanz J., Groth J., Zachos C., Wehling C., Saftig P., Schwake M.* Disease-causing mutations within the lysosomal integral membrane protein type 2 (LIMP-2) reveal the nature of binding to its ligand beta-glucocerebrosidase. *Hum. Mol. Genet.* 19(4): 563–572. 2010.
 51. *Zampieri S., Cattarossi S., Bembi B., Dardis A.* GBA Analysis in Next Generation Era: Pitfalls, Challenges, and Possible Solutions. *J. Mol. Diagn.* 19(5): 733–741. 2017.
 52. *Dandana A., Ben Khelifa S., Chahed H., Miled A., Ferchichi S.* Gaucher Disease: Clinical, Biological and Therapeutic Aspects. *Pathobiology.* 83: 13–23. 2016.
 53. *Alcalay R.N., Dinur T., Quinn T.* Comparison of Parkinson risk in Ashkenazi Jewish patients with Gaucher disease and GBA heterozygotes. *JAMA Neurol.* 71: 752–757. 2014.
 54. *Lwin A., Orvisky E., Goker-Alpan O., LaMarca M.E., Sidransky E.* Glucocerebrosidase mutations in subjects with parkinsonism. *Mol. Genet. Metab.* 81: 70–73. 2004.
 55. *Cuervo A.M., Stefanis L., Fredenburg R.* Impaired degradation of mutant asynuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science.* 305: 1292–1295. 2004.
 56. *Alcalay R.N., Levy O.A., Waters C.C., Fahn S., Ford B., Kuo S.H., Mazzoni P., Pauciuolo M.W., Nichols W.C., Gan-Or Z., Rouleau G.A., Chung W.K., Wolf P., Oliva P., Keutzer J., Marder K., Zhang X.* Glucocerebrosidase activity in Parkinson’s disease with and without GBA mutations. *Brain J. Neurol.* 138(9): 2648–2658. 2015.
 57. *Gan-Or Z., Amshalom I., Kilarski L.L., Bar-Shira A., Gana-Weisz M., Mirelman A., Marder K., Bressman S., Giladi N., Orr-Urtreger A.* Differential effects of severe vs mild GBA mutations on Parkinson disease. *Neurology.* 84(9): 880–887. 2015.
 58. *Anheim M., Elbaz A., Lesage S., Durr A., Condroyer C., Viallet F., Pollak P., Bonanti B., Bonanti-Pellii C., Brice A., French Parkinson Disease Genetic Group.* Penetrance of Parkinson disease in glucocerebrosidase gene mutation carriers. *Neurology.* 78(6): 417–420. 2012.
 59. *Robak L.A., Jansen I.E., van Rooij J., Uitterlinden A.G., Kraaij R., Jankovic J., International Parkinson’s Disease Genomics Consortium (IPDGC), Heutink P., Shulman J.M.* Excessive burden of lysosomal storage disorder gene variants in Parkinson’s disease. *Brain.* 140: 3193–3203. 2017.
 60. *Pchelina S., Emelyanov A., Baydakova G., Andoskin P., Senkevich K., Nikolaev M., Miliukhina I., Yakimovskii A., Timofeeva A., Fedotova E., Abramycheva N., Usenko T., Kulabukhova D., Lavrinova A., Kopytova A., Garaeva L., Nuzhnyi E., Illarioshkin S., Zakharova E.* Oligomeric α -synuclein and glucocerebrosidase activity levels in GBA-associated Parkinson’s disease. *Neurosci. Lett.* 636: 70–76. 2017.
 61. *Pchelina S., Baydakova G., Nikolaev M., Senkevich K., Emelyanov A., Kopytova A., Miliukhina I., Yakimovskii A., Timofeeva A., Berkovich O., Fedotova E., Illarioshkin S., Zakharova E.* Blood lysosphingolipids accumulation in patients with parkinson’s disease with glucocerebrosidase 1 mutations. *Mov. Disord.* 33(8): 1325–1330. 2018.
 62. *Guedes L.C., Chan R.B., Gomes M.A., Conceição V.A., Machado R.B., Soares T., Xu Y., Gaspar P., Carrizo J.A., Alcalay R.N., Ferreira J.J., Outeiro T.F., Miltenberger- Miltenyi G.* Serum lipid alterations in GBA-associated Parkinson’s disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* pii: S1353-8020(17)30322. 2017.
 63. *Nuzhnyi E., Emelyanov A., Boukina T., Usenko T., Yakimovskii A., Zakharova E., Pchelina S.* Plasma oligomeric alpha-synuclein is associated with glucocerebrosidase activity in Gaucher disease. *Mov. Disord.* 30(7): 989–991. 2015.
 64. *Pchelina S.N., Nuzhnyi E.P., Emelyanov A.K., Boukina T.M., Usenko T.S., Nikolaev M.A., Sa-logub G.N., Yakimovskii A.F., Zakharova E.Y.* Increased plasma oligomeric alpha-synuclein in patients with lysosomal storage diseases. *Neurosci. Lett.* 583: 188–193. 2014.

65. Taguchi Y.V., Liu J., Ruan J., Pacheco J., Zhang X., Abbasi J., Keutzer J., Mistry P.K., Chandra P.K. Glucosylsphingosine Promotes α -Synuclein Pathology in Mutant GBA-Associated Parkinson's Disease. *J. Neurosci.* 37(40): 9617–9631. 2017.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1525-17.2017>

Blood Lysosphingolipids in the Diagnosis of Diseases Associated with Lysosomal Dysfunction

T. S. Usenko^{a, b}, G. V. Baydakova^c, E. Y. Zakharova^c, and S. N. Pchelina^{a, b, *}

^a*Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre "Kurchatov Institute", Gatchina, Russia*

^b*Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia*

^c*Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia*

**e-mail: sopchelina@hotmail.com*

Lysosphingolipids are an N-deacetylated form of sphingolipids. Lysosphingolipids are considered as potential biomarkers of lysosomal storage disorders (LSD) such as Gaucher disease (GD), Fabry disease (FD), Krabbe disease (KD), and Nimann–Peak disease (NPD) as well as extremely rare LSD as GM1 and GM2 gangliosidoses. To date, there are various methods for assessing lysosphingolipid levels in blood plasma. However, one of the most promising is liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) that allows simultaneous assessment of the concentration of several lysosphingolipids (HexSph, LysoGb3, LysoGM1, LysoGM2, LysoSM and LysoSM509) in plasma, urine, dried blood spots. Despite the fact that the assessment of lysosphingolipids in blood plasma is the gold standard, the LC/MS/MS method in dried blood spots is a fast and reliable method for evaluation of lysosphingolipid profile in patients as a consequence identifying LSDs such as GD (HexSph), FD (LysoGb3), prosaposin deficiency (HexSph, LysoGb3), NPD type A/B and C (LysoSM and LysoSM509). Diagnostics of a number of LSDs by measuring of the lysosphingolipid concentrations in blood by LC/MS/MS is currently being carried out at the Research Center for Medical Genetic in Moscow. We used this method to assess the lysosphingolipid levels in Parkinson's disease associated with a mutations in the gene encoding lysosomal enzyme called glucocerebrosidase (GBA-PD). For the first time, increased level of HexSph (galactosylsphingosine (GalSph) and glucosylsphingosine (GlcSph) in blood of GBA-PD patients was shown that proposes us to make an assumption about the mechanism of GBA-PD pathogenesis. The possible involvement of these metabolites in the stabilization of neurotoxic forms of alpha synuclein in PD is discussed.

Keywords: lysosphingolipids, LC/MC/MS, lysosomal storage disorders, Parkinson's disease

ЦИТИРОВАТЬ:

Усенко Т.С., Байдакова Г.В., Захарова Е.Ю., Пчелина С.Н. Лизосфинголипиды крови в диагностике заболеваний, ассоциированных с дисфункцией лизосом. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 106(8): 952–963.

DOI: 10.31857/S0869813920080105

TO CITE THIS ARTICLE:

Usenko T.S., Baydakova G.V., Zakharova E.Y., Pchelina S.N. Blood Lysosphingolipids in the Diagnosis of Diseases Associated with Lysosomal Dysfunction. *Russian Journal of Physiology.* 106(8): 952–963.

DOI: 10.31857/S0869813920080105

**АКТИВНОСТЬ ФАКТОРА ВИЛЛЕБРАНДА У КРЫС
ПОСЛЕ КРАТКОВРЕМЕННОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА**

© 2020 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 20.12.2019 г.

После доработки 23.03.2020 г.

Принята к публикации 30.05.2020 г.

Одним из ведущих факторов риска повторных нарушений мозгового кровообращения после перенесенной ишемии головного мозга является дисфункция сосудистого эндотелия. Фактор Виллебранда (vWF) — общепризнанный маркер эндотелиальной дисфункции, связанной с дисбалансом выработки эндотелием веществ с прокоагулянтной активностью. Исследовались активность vWF и показатель гематокрита у крыс Вистар после ишемии головного мозга, вызванной 12-минутной окклюзией обеих сонных артерий с одновременной гипотензией (45 ± 2 мм рт. ст.). Постишемические изменения оценивали в 5-ти группах крыс: через 1 ч и на 3-й, 7-й, 14-й и 21-й день после ишемии/реинфузии (И/Р). Контролем служили крысы линии Вистар, перенесшие такое же оперативное вмешательство, но без пережатия сонных артерий и гипотензии. Увеличение активности vWF проявлялось уже через 1 ч после И/Р. К 3-му дню постишемического периода концентрация vWF в плазме крови уменьшалась в результате гемодилюции, о чем свидетельствовало снижение гематокрита. Через 7 дней после ишемии отмечено резкое увеличение активности маркера. В дальнейшем активность vWF снижалась и к 21-му дню после И/Р значения активности маркера достигали значений у контрольных крыс. Полученные данные свидетельствуют о том, что однократная 12-минутная И/Р головного мозга приводит к развитию сосудистой эндотелиальной дисфункции, связанной с дисбалансом выработки эндотелием веществ с прокоагулянтной активностью, сохраняющейся на протяжении 14 дней после ишемии.

Ключевые слова: ишемия головного мозга, фактор Виллебранда, эндотелиальная дисфункция

DOI: 10.31857/S0869813920080087

Согласно современным представлениям одной из главных причин острого нарушения мозгового кровообращения является атеросклеротическое поражение экстра- и интракраниальных артерий [1], приводящее к стенозу (окклюзии) магистральных артерий головы или артерий мозга, тромбозу или эмболии церебральных артерий и снижению кровоснабжения головного мозга [2], вследствие чего нарушается его метаболизм, в результате образуется очаг инфаркта. Проблема последствий острых ишемических нарушений мозгового кровообращения была и остается актуальной. Большинство работ, посвященных изучению этой проблемы, связаны с исследованием изменений в сосудистой системе головного мозга в момент ишемии и в течение нескольких часов острого постишемического периода [3, 4]. Но процессы, происходящие в более поздний постишемический период, изучены недостаточно

полно, хотя они играют значительную роль в возникновении повторных ишемических поражений головного мозга [1].

В связи с этим представляется перспективным исследование особенностей функционирования мозгового сосудистого русла в течение достаточно длительного периода после перенесенной ишемии для уточнения физиологических механизмов, лежащих в основе повторных ишемических поражений головного мозга. Большое значение в развитии постишемических цереброваскулярных нарушений имеет изменение функциональных свойств сосудистой стенки. Сосудистый эндотелий участвует в поддержании физиологического состояния сосудистой стенки, вырабатывая различные биологически активные вещества и проявляя про- и антикоагулянтную активность [5, 6]. В нормальном состоянии эндотелий, поддерживая кровоток, препятствует коагуляции и агрегации клеток крови [7]. Нарушение кровоснабжения мозга при ишемии сопровождается развитием эндотелиальной дисфункции, в основе которой может лежать изменение прокоагулянтной активности сосудистого эндотелия [5, 8, 9].

В настоящее время одним из общепризнанных маркеров нарушений функции эндотелия, связанных с увеличением выработки эндотелием веществ с прокоагулянтной активностью, является фактор Виллебранда (vWF) [10–13], при повреждении эндотелия он секретируется в субэндотелий и плазму крови [14]. Связь повышения концентрации vWF в крови со степенью повреждения сосудистого эндотелия была доказана в модельных экспериментах на крысах при эндотоксинемии и механическом повреждении эндотелия еще в 1989 г. Reldy и соавт. [15]. При состояниях, сопровождающихся острым или хроническим повреждением эндотелия, уровень vWF в крови значительно повышается. При этом наибольший вклад в дисфункцию эндотелия вносит плазменный, синтезируемый эндотелиоцитами vWF, в отличие от синтезируемого тромбоцитами [4]. Основная часть исследований, связанных с фактором Виллебранда, посвящена изучению механизмов его повреждающего действия и способов ингибирования последнего и выполнена на модели фокальной ишемии с использованием окклюзии средней мозговой артерии; при этом очаг инфаркта остается локальным, а наблюдения выполнены в период, как правило, не превышающий 24 ч после ишемии/реперфузии [2–4].

Целью настоящей работы было определение активности фактора Виллебранда как показателя функционального состояния сосудистого эндотелия (эндотелиальной дисфункции) в отдаленном постишемическом периоде в течение трех недель после перенесенной крысами кратковременной транзиторной глобальной ишемии головного мозга, вызванной билатеральной окклюзией сонных артерий на фоне гипотензии.

Такая модель ишемии, известная в англоязычной литературе как “2-vessel occlusion + hypotention model” [16], адекватна для исследования мозговых нарушений, реактивности мозговых сосудов и нарушений функции эндотелия, тогда как простое пережатие сонных артерий у крыс не приводит к существенному снижению кровоснабжения мозга. В этом случае кровоснабжение может осуществляться по вертебральным и базилярной артериям и многочисленным коллатералам. К тому же ауторегуляция мозгового кровотока позволяет сохранять относительно неизменной объемную скорость мозгового кровотока при изменении разницы между системным артериальным и внутричерепным давлением в широких пределах посредством изменения тонуса резистивных пиальных микрососудов [17].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на половозрелых крысах-самцах линии Вистар массой 250–280 г в соответствии с принципами Базельской декларации, Правилами

проведения работ с использованием экспериментальных животных, принятых Европейской конвенцией 19.07.2014 и требованиями Комиссии по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Животные содержались по 6 особей в клетках Т4 на стандартной лабораторной диете в условиях искусственного освещения с циклом 12 ч свет/12 ч темнота.

Бедренные артерии катетеризировали на обеих лапах для мониторинга артериального давления (АД) и забора/реинфузии крови при воспроизведении ишемии. Среднее системное АД измеряли с помощью устройства для инвазивного измерения АД у крыс (Россия). У наркотизированных (хлоралгидрат, внутривенно, 43 мг/100 г массы тела) крыс оно составляло 98.9 ± 2.6 мм рт. ст.

У наркотизированных крыс ишемию воспроизводили посредством 12-минутной окклюзии обеих сонных артерий с одновременной управляемой гипотензией: АД снижали и поддерживали строго на уровне 45 ± 2 мм рт.ст. путем забора/реинфузии крови в гепаринизированный шприц [9, 18]. Для минимизации влияния гепарина на кровь использовали его малые дозы: количество гепарина в шприце не превышало 20 МЕ/100 г массы тела. Этого достаточно для предотвращения коагуляции вблизи катетера [9].

Исследование проводилось на 82 крысах, которые случайным образом были разделены на 11 групп: 5 групп – опыт ($n = 32$), 5 групп – контроль, ложнооперированные крысы ($n = 30$) и 1 группа крыс (интактные) для определения референсных значений vWF ($n = 20$). Постишемические изменения активности vWF и показателя гематокрита (Ht) исследовали в следующих отдельных группах крыс: через 1 ч ($n = 6$), на 3-й ($n = 7$), 7-й ($n = 6$), 14-й ($n = 7$) и 21-й ($n = 6$) день после ишемии. Контролем к каждой группе экспериментальных крыс служили ложнооперированные крысы (5 групп): по 6 крыс в каждой группе, которые подвергались такому же операционному вмешательству, как и экспериментальные, но без пережатия сонных артерий и снижения АД. Операции и тесты проводили в одни и те же сроки у опытных и контрольных крыс параллельно. Для проведения тестов кровь из сонной артерии животных через канюлю отбирали в пластиковые пробирки с 3.8%-ным раствором цитрата натрия в отношении 9 : 1. Дополнительно в пробирку вносили 0.05 мл 1%-ного раствора протамина сульфата для связывания гепарина. Кровь центрифугировали в течение 15 мин при 1500 g и тотчас отделяли плазму. Показатель Ht определяли в градуированных капиллярах после центрифугирования крови в течение 15 мин при 3000 оборотов/мин. Схема эксперимента приведена на рис. 1.

Активность фактора Виллебранда определяли в бедной тромбоцитами цитратной плазме агглютинационным методом (РЕНАМ, Россия), основанном на способности vWF вызывать агглютинацию тромбоцитов в присутствии антибиотика ристомицина. Фиксировали время от момента добавления Виллебранд-реагента (смесь фиксированных тромбоцитов с ристомицином) к плазме до появления агглютинатов. Согласно рекомендации производителя реагента (РЕНАМ) по калибровочному графику рассчитывали активность vWF. Для построения калибровочного графика использовали серию разведений плазмы-калибратора с активностью от 50 до 200%, откладывая по логарифмической шкале на оси ординат время образования агглютинатов в секундах, а по оси абсцисс – активность vWF в %. Референсные значения для активности vWF были определены у наркотизированных хлоралгидратом (внутрибрюшинно, 43 мг/100 г массы тела) крыс ($n = 20$) массой 250–280 г, у которых производился только забор крови. Среднюю активность vWF в каждой группе крыс рассчитывали, используя ее среднее значение из 3-х измерений у отдельных особей.

Для уточнения вопроса о повышении прокоагулянтной активности эндотелия в ответ на операционное вмешательство дополнительно к vWF определяли уровень

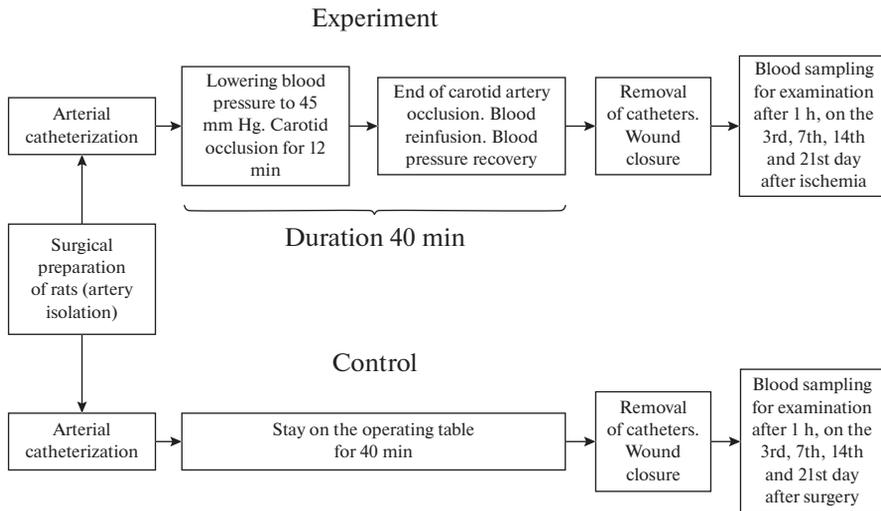


Рис. 1. Схема эксперимента.

Fig. 1. The scheme of the experiment.

фибриногена в цитратной плазме коагулометрическим методом по Клаусу (коагулометр CoaDATA 4001, Великобритания) у интактных ($n = 5$) и у ложнооперированных крыс ($n = 5$) через 1 ч после катетеризации бедренных артерий.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel 2003 и программы InStat 3.02 (GraphPad Software Inc., США) с применением парного непараметрического критерия Манна–Уитни. Данные представляли в виде среднего арифметического значения и его средней ошибки. Достоверным уровнем отличий считали вероятность не менее 95% ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определенные нами референсные значения активности vWF для интактных (не подвергнутых операционному вмешательству) крыс составили 55–130%. Через 1 ч после ишемии активность vWF составила $209.8 \pm 4.8\%$ (рис. 2). Эти значения были достоверно выше ($p = 0.0427$, $U = 0.5000$), чем у ложнооперированных крыс через 1 ч после операции ($192.0 \pm 9.6\%$), хотя и сопоставимы. Повышение активности vWF относительно референсных значений у ложнооперированных и ишемизированных животных через 1 ч после операционного вмешательства либо ишемического воздействия, вероятно, связано с активацией эндотелия в результате повреждения сосудов при катетеризации, вследствие чего vWF, наряду с другими прокоагулянтами, секретируется в субэндотелий и поступает в плазму крови [14]. Поскольку vWF участвует в тромбоцитарном и коагуляционном звене гемостаза, в частности транспортирует фактор VIII к месту повреждения, стабилизирует его и защищает от инактивации [19, 20], то повышение vWF свидетельствует об активации прокоагулянтной активности эндотелия в ответ на повреждение сосуда [9]. По нашим данным уровень фибриногена в плазме крови у ложнооперированных крыс через 1 ч после операции составил 1.50 ± 0.07 г/л, а у интактных крыс – 1.08 ± 0.11 г/л ($p = 0.0106$, $U = 24.0$), что указывает на повышенный уровень фибриногена у крыс с катетеризацией сосудов. Авторы работы [21] также продемонстрировали, что эндо-

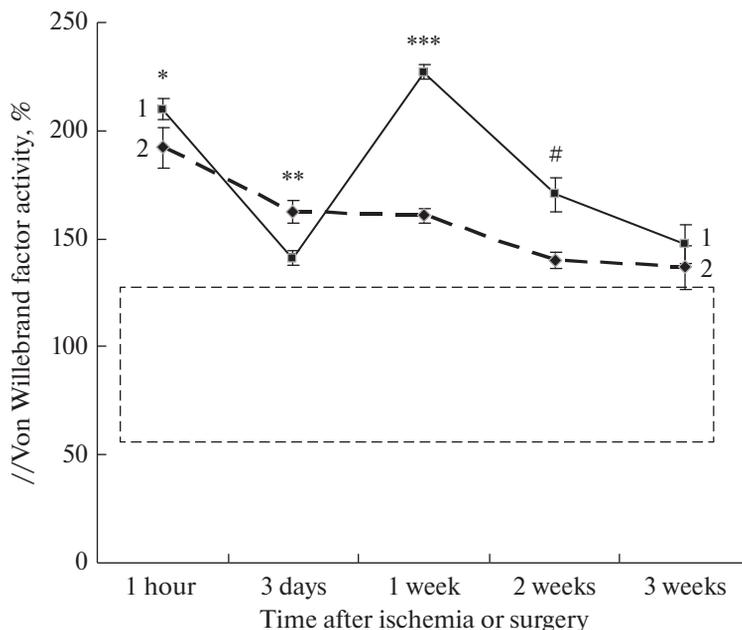


Рис. 2. Активность фактора Виллебранда у крыс. 1 – ишемия, 2 – контроль. Пунктир – область референсных значений (55–130%). * $p = 0.0427$, $U = 0.5$, ** $p = 0.008$, $U = 1.0$, *** $p = 0.0001$, $U = 0.0001$, # $p = 0.0182$, $U = 42.0$, критерий Манна–Уитни, относительно контроля.

Fig. 2. Activity of von Willebrand factor in rats. 1 – ischemia, 2 – control. The dotted line is the range of reference values (55–130%). * $p = 0.0427$, $U = 0.5$, ** $p = 0.008$, $U = 1.0$, *** $p = 0.0001$, $U = 0.0001$, # $p = 0.0182$, $U = 42.0$, Mann–Whitney test, relative to control.

васкулярные вмешательства вызывали увеличение уровней vWF и фибриногена в крови пациентов, что приводило к дисфункции эндотелия и гиперкоагуляции крови.

Ранее мы показали [22], что через 1 ч после ишемии/реинфузии головного мозга наблюдается увеличение перфузии, связанное с возникновением постишемической гиперемии [23, 24]. Гиперемия способствует усилению кровотока и, следовательно, увеличению напряжения сдвига на внутренних стенках сосудов. Напряжение сдвига стимулирует выработку здоровым эндотелием вазодилаторов, прежде всего оксида азота (NO); при нарушенной функции эндотелия наблюдается дефицит NO, приводящий к изменению свойств сосудистой стенки [7], что может служить причиной высвобождения vWF и повышения его активности у крыс в первые часы после ишемии относительно значений у ложнооперированных животных [7, 19].

Через 3 дня после операции у ложнооперированных крыс активность vWF достоверно снижалась примерно на 16% до $162.3 \pm 5.1\%$ ($p = 0.3030$, $U = 3.0$) по сравнению со значениями через 1 ч после ишемии ($192.0 \pm 9.6\%$). Изменения, вероятно, связаны с относительным дефицитом vWF по сравнению с его массивным выбросом в первые часы после операционного воздействия. В дальнейшем на протяжении 21 дня у ложнооперированных крыс наблюдалось стойкое и постепенное снижение активности vWF, что может указывать на постепенное уменьшение степени дисфункции эндотелия у этих животных (рис. 2). У крыс, перенесших ишемию, через 3 дня после ишемии активность vWF также снижалась почти на

Таблица 1. Показатель гематокрита на протяжении 21 дня после кратковременной транзиторной ишемии головного мозга у крыс

Table 1. Hematocrit for 21 days after short-term transient cerebral ischemia in rats

Сроки после операции/ишемии Terms after surgery/ischemia	Через 1 ч After 1 hour	На 3-й день On the 3rd day	На 7-й день On the 7rd day	На 14-й день On the 14 day	На 21-й день On the 21 day
Контроль Control	0.411 ± 0.009	0.417 ± 0.012	0.400 ± 0.015	0.408 ± 0.004	0.407 ± 0.018
После ишемии (опыт) After ischemia (experiment)	0.415 ± 0.012	0.373 ± 0.009*	0.389 ± 0.008	0.439 ± 0.005***	0.403 ± 0.011

В каждой серии использовано по 6 животных.

* $p \leq 0,05$, t -критерий Стьюдента; *** $p = 0.0009$, $U = 2.0$, Критерий Манна–Уитни относительно значений в контроле.

* $p \leq 0.05$, t - Student test; *** $p = 0.0009$, $U = 2.0$, Mann–Whitney test regarding the values in the control.

33% с 209.8 ± 4.8 (через 1 ч после ишемии) до $141.0 \pm 3.2\%$ ($p < 0.0001$, $U = 0.0001$), но это снижение было более сильным, чем у ложнооперированных животных ($с 209.8 \pm 4.8$ до $141.0 \pm 3.2\%$ и со 192.0 ± 9.6 до $162.3 \pm 5.1\%$ соответственно, $p = 0.008$, $U = 1.0$), как показано на рис. 2. Уменьшение активности vWF может быть связано с разбавлением крови за счет увеличения проницаемости сосудов для интерстициальной жидкости, приводящим к снижению концентрации vWF, а, следовательно, и его активности [5, 19]. Об этом свидетельствует обнаруженное нами у крыс, перенесших ишемию, снижение Ht на 3-й день постишемического периода (с 0.415 ± 0.012 через 1 ч после ишемии до 0.373 ± 0.009 , $p < 0.05$), тогда как у ложнооперированных крыс в период от 1 ч до 3 дней после операции этот показатель не изменялся (0.411 ± 0.009 и 0.417 ± 0.012 соответственно) (табл. 1). Причиной уменьшения количества эритроцитов в плазме может быть поступление в сосуды интерстициальной жидкости вследствие повреждения эндотелия (ишемия/реинфузия, оксидативный стресс, постишемическое воспаление) и увеличения его проницаемости [19, 25]. Эндотелиальная гиперпроницаемость возникает вследствие повышенной полимеризации актинового цитоскелета и, как следствие, образования зазора, вызванного разрушением β -катенина и VE-кадгерина в межэндотелиальных соединениях [26, 27].

На 7-й день постишемического периода активность vWF существенно превышала значение у ложнооперированных крыс (227.0 ± 3.5 и $160.7 \pm 3.2\%$ соответственно, $p = 0.0001$, $U = 0.0001$) и была достоверно выше, чем через 1 ч после ишемии (227.0 ± 3.5 и $209.8 \pm 4.8\%$ соответственно, $p = 0.459$, $U = 37.0$) (рис. 2), что может указывать на повреждение эндотелия. Известно, что увеличение концентрации vWF в плазме крови может возникать не только при стимуляции эндотелия, но и при его повреждении [28]. В предыдущих наших исследованиях были получены данные о том, что через 7 дней после ишемии/реинфузии у крыс в периферической крови в среднем в 2 раза увеличивается количество десквамированных эндотелиальных клеток [29]. Следовательно, резкое увеличение активности vWF у крыс, перенесших ишемию, может свидетельствовать о прогрессирующем нарастании тяжести эндотелиальной дисфункции, приводящей к структурному повреждению эндотелия. Дисфункция эндотелия начинается с дисбаланса синтеза вазодилаторов и констрикторов, прокоагуляционных и антикоагуляционных факторов, про- и противовоспалительных медиаторов, и если стимуляция эндотелия становится чрезмерной, например, провоспалительными цитокинами и другими факторами, то возникают структурные нарушения [7, 30]. Так, авторами работы [31] в экспериментах на мышцах были зафиксированы повышенные уровни vWF на модели геморрагического инсульта, а инъекция vWF мышам вызывала повышенную экспрессию провоспалительных медиаторов.

К 14-му дню постишемического периода активность vWF у крыс, перенесших ишемию, относительно значений у ложнооперированных животных оставалась повышенной (170.4 ± 8.1 и $139.7 \pm 3.8\%$ соответственно, $p = 0.0182$, $U = 42.0$), что указывает на сохраняющуюся дисфункцию эндотелия (рис. 2). Наряду с этим отмечено повышение Ht (0.439 ± 0.005 по сравнению с 0.408 ± 0.004 в контроле, $p = 0.0009$, $U = 2.0$), Сосудистая стенка играет важную роль в обеспечении гемостатических реакций [32]. Увеличение Ht может отражать обнаруженное нами ранее в этот отрезок постишемического периода усиление гемокоагуляционных процессов [9]. Гиперкоагуляция является следствием функциональной несостоятельности эндотелия в результате возникновения дисбаланса синтезируемых протромбогенных и антитромбогенных сосудистых факторов [7].

К 21-му дню постишемического периода активность vWF составляла $147.1 \pm 9.0\%$ и достоверно не отличалась от значений у ложнооперированных крыс ($136.9 \pm 10.1\%$), хотя и превышала референсные значения (рис. 2). Эти данные подтверждаются работой [33], в которой указывается, что после острой стадии цереброваскулярных заболеваний значения vWF постепенно уменьшались к 3-й неделе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, анализ изменения активности vWF как одного из общепризнанных маркеров эндотелиальной дисфункции, связанной с дисбалансом выработки эндотелием веществ с анти- и прокоагулянтной активностью, показал, что однократная 12-минутная ишемия/реинфузия головного мозга на фоне гипотензии приводит к развитию сосудистой эндотелиальной дисфункции, сохраняющейся на протяжении 14 дней после ишемии.

Увеличение активности маркера проявляется уже через 1 ч после перенесенной ишемии/реинфузии. К 3-му дню постишемического периода концентрация vWF в плазме крови уменьшается, как мы полагаем, в результате разбавления крови за счет поступления в кровеносное русло интерстициальной жидкости, о чем свидетельствует снижение Ht. Через 7 дней после ишемии отмечается резкое увеличение активности vWF, указывающее на нарастание тяжести эндотелиальной дисфункции. В дальнейшем активность vWF постепенно снижается, в результате чего к 21-му дню постишемического периода значения активности vWF достигают контрольных, что может указывать на снижение степени эндотелиальной дисфункции. Таким образом, vWF можно использовать в эксперименте в качестве теста для быстрого определения функциональных нарушений эндотелия.

Работа выполнена на животных из ЦКП Биокolleкция ИФ РАН.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 18-015-00077 и при частичной финансовой поддержке Программы “Фундаментальные научные исследования для долгосрочного развития и обеспечения конкурентоспособности общества и государства” (47_110_ДРиОК).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гончар И.А., Степанова Ю.И., Прудывус И.С. Биохимические предикторы и маркеры инфаркта головного мозга. Под ред. В.С. Камышников. Минск. БелМАПО. 2013. [Gontschar I.A., Stepanova J.I., Prudyvus I.S. Biochemical Predictors and Markers of Ischemic Stroke. Ed. V.S. Kamyschnikov. Minsk. Belarus. Med. Acad. Postgraduate Education. 2013. (In Russ)].
2. Denorme F., De Meyer S.F. The VWF-GPIb axis in ischaemic stroke: lessons from animal models. J. Thromb. Haemost. 116(04): 597–604. 2016. <https://doi.org/10.1160/TH16-01-0036>

3. Khan M.M., Motto D.G., Lentz S.R., Chauhan A.K. ADAMTS13 reduces VWF-mediated acute inflammation following focal cerebral ischemia in mice. *J. Thromb. Haemost.* 10(8): 1665–1671. 2012.
<https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2012.04822.x>
4. Dhanesha N., Prakash Pr., Doddapattar P., Khanna I., Pollpeter M.J., Nayak M.K., Staber J.M., Chauhan A.K. Endothelial cell-derived von Willebrand factor is the major determinant that mediates von Willebrand factor-dependent acute ischemic stroke by promoting postischemic thrombo-inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 36(9): 1829–1837. 2016.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307660>
5. Суслина З.А., Танащян М.М., Домашенко М.А., Ионова В.Г., Чечёткин А.О. Дисфункция эндотелия при ишемических нарушениях мозгового кровообращения. *Анналы клинич. и эксперимент. неврологии.* 2(1): 4–11. 2008. [Suslina Z.A., Tanashyan M.M., Domashenko M.A., Ionova V.G., Chechetkin A.O. Endothelial dysfunction in patients with ischemic stroke. *Ann. Clin. Exper. Neurology.* 2(1): 4–11. 2008. (In Russ)].
6. Esper R.J., Nordaby R.A., Vilarico J.O., Paragano A, Cacharryn J.L, Machado R.A. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc. Diabetol.* 5: 4–21. 2006. PMID: PMC1434727
<https://doi.org/10.1186/1475-2840-5-416504104>
7. Полонецкий О.Л., Полонецкий Л.З. Дисфункция эндотелия и атеросклероз. *Мед. новости.* 6: 6–11. 2012. [Polonetskiy O.L., Polonetskiy L.Z. Endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Med. News.* 6: 6–11. 2012. (In Russ)].
8. Воронков А.В., Поздняков Д.И., Мамлеев А.В. Изучение вазодилатирующей и антитромботической функции эндотелия сосудов головного мозга крыс на различных моделях его ишемического повреждения. *Соврем. проблемы науки и образования.* 5. 2015. [Voronkov A.V., Pozdnyakov D.I., Mamleev A.V. Study of vasodilating and antithrombotic functions of rat brain vessels endothelium on various models of its ischemic damage. *Modern Problems Science and Education.* 5. 2015. (In Russ)]. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=22406>
9. Шуваева В.Н., Горшкова О.П., Дворецкий Д.П. Коагуляционный гемостаз у крыс линии Вистар после кратковременной транзиторной ишемии головного мозга. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 105(9): 1189–1196. 2019. [Shuvaeva V.N., Gorshkova O.P., Dvoretzky D.P. Coagulation hemostasis of the Wistar line after short-term transitor ischemia of the brain. *Russ. J. Physiol.* 105 (9): 1189–1196. 2019. (In Russ)].
10. Arba F., Giannini A., Piccardi B., Biagini S., Palumbo V., Giusti B., Nencini P., Maria Gori A., Nesi M., Pracucci G., Bono G., Bovi P., Fainardi E., Consoli D., Nucera A., Massaro F., Orlandi G., Perini F., Tassi R., Sessa M., Toni D., Abbate R., Inzitari D. Small vessel disease and biomarkers of endothelial dysfunction after ischaemic stroke. *Eur. Stroke J.* 4(2): 119–126. 2019.
<https://doi.org/10.1177/2396987318805905>
11. Poggesi A., Marco P., Francesca P., Pantoni L., Inzitari D. Circulating biologic markers of endothelial dysfunction in cerebral small vessel disease: a review. *J. Cerebr. Blood Flow Metab.* 36(1): 72–94. 2016.
<https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.116>
12. Повзун С.А. Важнейшие синдромы: патогенез и патологическая анатомия. СПб. ООО ИПК КОСТА. 2009. [Povzun S.A. The most important syndromes: pathogenesis and pathological anatomy. SPb. LLC IPK COSTA. 2009. (In Russ)].
13. Horvth B., Hegedys D., Szapóry L., Mórton Z., Alexy T., Koltai K., Gyevnör Z., Juricskay I., Tyth K., Küsmörky G. Investigation of von Willebrand-factor as a marker of endothelial dysfunction in atherosclerotic patients. *Orv. Hetil.* 144(50): 2471–2476. 2003.
14. Бабичев А.В. Роль эндотелия в механизмах гемостаза. *Педиатр.* IV(1): 122–127. 2013. [Babichev A.V. The role of endothelium in the mechanisms of hemostasis. *Pediatrician.* IV(1): 122–127. 2013. (In Russ)].
15. Reldy M.A., Chopek M., Chao S., McDonald T., Schwartz S.M. Injury induces increase of von Willebrand factor in rat endothelial cells. *Am. J. Pathol.* 134(4): 857–864. 1989.
16. Smith M.L., Bendek G., Dahlgren N., Rosen I., Wieloch T., Siesjo B.K. Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat: 2. A 2-vessel occlusion model. *Acta Neurol. Scand.* 69: 385–401. 1984.
17. Кособян Е.П., Ярек-Мартынова И.Р., Ясаманова А.Н., Колесникова Т.И., Мартынов М.Ю. Роль эндотелиальной дисфункции в развитии цереброваскулярного поражения у пациентов с сахарным диабетом. *Сахарный диабет.* 1: 42–48. 2012. [Kosobyan E.P., Yarek-Martynova I.R., Yasmanova A.N., Kolesnikova T.I., Martynov M.Yu. The role of endothelial dysfunction in the development of cerebrovascular disease in patients with diabetes mellitus. *Diabetes.* 1: 42–48. 2012. (In Russ)].
18. Горшкова О.П., Ленцман М.В., Артемьева А.И., Дворецкий Д.П. Динамика изменения реактивности пиальных сосудов после кратковременной ишемии головного мозга. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 14(1): 74–78. 2015. [Gorshkova O.P., Lentsman M.V., Artem'eva A.I., Dvoretzky D.P. Dynamic of pial vessels reactivity after brief cerebral ischemia. *Regional Hemodynamics and Microcirculation.* 14(1): 74–78. 2015. (In Russ)].

19. Чубуков Ж.А. Фактор Виллебранта и дисфункция эндотелия при стрессе. Проблемы здоровья и экологии. 2(32): 40–45. 2012. [*Chubukov Zh.A.* Willebrant factor and endothelial dysfunction under stress. Health and Ecology Problems. 2(32): 40–45. 2012. (In Russ)].
20. Дмитриев В.В. Практические вопросы клинической коагулологии. Минск. Белорусская наука. 2017. ISBN: 978-985-08-2158-4 [*Dmitriev V.V.* Practical Issues in Clinical Coagulology. Minsk. Belarusian Science. 2017. ISBN: 978-985-08-2158-4 (In Russ)].
21. Yao H.Q., Wang F.J., Kang Z. Effects of Endovascular Interventions on vWF and Fb Levels in Type 2 Diabetic Patients with Peripheral Artery Disease. Ann. Vasc. Surg. 33: 159–66. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.avsg.2015.11.018>
22. Горшкова О.П., Шуваева В.Н. Динамика постишемических изменений микроциркуляции в коре головного мозга крыс. Рос. физиол. журн. им И.М. Сеченова. 103(8): 866–872. 2017. [*Gorshkova O.P., Shuvaeva V.N.* Dynamics of post-ischemic microcirculation changes in the cerebral cortex rats. Russ. J. Physiol. 103(8): 866–872. 2017. (In Russ)].
23. Onetti Y., Dantas A.P., Pérez B., Cugota R., Chamorro A., Planas A.M., Vila E., Jiménez-Altayo F. Middle cerebral artery remodeling following transient brain ischemia is linked to early postischemic hyperemia: a target of uric acid treatment. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 308(8): H862–H874. 2015. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.0000.2015>
24. Скворцова В.И. Ишемический инсульт: патогенез ишемии, терапевтические подходы. Невролог. журн. 6(3): 4–9. 2001. [*Skvortsova V.I.* Ischemic stroke: pathogenesis of ischemia, therapeutic approaches. Neurolog. J. 6(3): 4–9. 2001. (In Russ)].
25. Ceulemans A., Zgavc T., Kooijman R., Hachimi-Idrissi S., Sarre S., Michotte Y. The dual role of the neuroinflammatory response after ischemic stroke: modulatory effects of hypothermia. J. Neuroinflammation. 7: 74. 2010. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-74>
26. Skaria T., Bachli E., Schoedon G. RSP03 impairs barrier function of human vascular endothelial monolayers and synergizes with pro-inflammatory IL-1. Mol. Med. 24(1): 45-51. 2018. <https://doi.org/10.1186/s10020-018-0048-z>
27. Claesson-Welsh L. Vascular permeability – the essentials. Ups. J. Med. Sci. 120(3): 135–143. 2015. <https://doi.org/10.3109/03009734.2015.1064501>
28. Юдакова Т.Н., Гирш А.О., Максимишин С.В., Мальков О.А. Сопряженность показателей сердечно-сосудистой системы и эндотелиальной дисфункции у больных с геморрагическим шоком. Анестезиология и реаниматология. 6: 11–13. 2013. [*Yudakova T.N., Hirsch A.O., Maksimishin S.V., Mal'kov O.A.* The correlation of indicators of the cardiovascular system and endothelial dysfunction in patients with hemorrhagic shock. Anesthesiology and resuscitation. 6: 11–13. 2013. (In Russ)].
29. Горшкова О.П., Шуваева В.Н., Лениман М.В., Артемьева А.И. Постишемические изменения вазомоторной функции эндотелия. Современные проблемы науки и образования. 5. 2016. [*Gorshkova O.P., Shuvaeva V.N., Lensman M.V., Artem'eva A.I.* Postischemic changes in the vasomotor function of the endothelium. Modern problems of science and education. 5. 2016. (In Russ)]. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25270>
30. Boos C.J., Balakrishnan B., Blann A.D., Lip G.Y. The relationship of circulating endothelial cells to plasma indices of endothelial damage/dysfunction and apoptosis in acute coronary syndromes: implications for prognosis. J. Thromb. Haemost. 6(11): 1841–1850. 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03148.x>
31. Zhu X., Cao Y., Wei L., Cai P., Xu H., Luo H., Bai X., Lu L., Liu J.R., Fan W., Zhao B.Q. Von Willebrand factor contributes to poor outcome in a mouse model of intracerebral haemorrhage. Sci. Rep. 6: 35901–35911. 2016. <https://doi.org/10.1038/srep35901>
32. Flaumenhaft R. Protein disulfide isomerase as an antithrombotic target. Trends Cardiovasc. Med. 23: 264–268. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2013.03.001>
33. Wang Y. A study of plasma von Willebrand factor concentration in patients with cerebrovascular disease. Zhonghua Shen Jing Jing Shen Ke Za Zhi. 25(2): 106–108. 1992.

The Von Willebrand Factor Activity in Rats after Short-Term Cerebral Ischemia

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 von Willebrand factor (vWF) is a recognized marker of endothelial dysfunction associated with an imbalance in endothelial production of substances with procoagulant activity. vWF activity and hematocrit index in Wistar rats after 12 min occlusion of both

carotid arteries with simultaneous controlled hypotension to 45 ± 3 mm Hg, was investigated. Post-ischemic changes were evaluated in 5 groups of rats: 1 hour and 3, 7, 14 and 21 days after ischemia. An increase in the activity of vWF was manifested as early as 1 hour after ischemia. By the 3rd day of the post-ischemic time, the concentration of vWF in the blood plasma decreased as a result of hemodilution, as evidenced by hematocrit decrease. After 7 days there was a sharp increase in the activity of the marker. In the future, the activity of vWF decreased and by 21 days after ischemia, the values of the vWF activity reached values in control rats. It was established that cerebral ischemia led to the development of vascular endothelial dysfunction associated with an imbalance of endothelial production of substances with procoagulant activity, which persists for 14 days after ischemia.

Keywords: cerebral ischemia, von Willebrand factor, endothelial dysfunction

ЦИТИРОВАТЬ:

Шуваева В.Н., Горшкова О.П. Активность фактора Виллебранда у крыс после кратковременной ишемии головного мозга. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(8): 964—973.

DOI: 10.31857/S0869813920080087

TO CITE THIS ARTICLE:

Shuvaeva V.N., Gorshkova O.P. The Von Willebrand Factor Activity in Rats after Short-Term Cerebral Ischemia. Russian Journal of Physiology. 106(8): 964—973.

DOI: 10.31857/S0869813920080087

ЭТОСУКСИМИД ПОВЫШАЕТ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКУЮ МОТИВАЦИЮ И УЛУЧШАЕТ ЭПИЗОДИЧЕСКУЮ ПАМЯТЬ В ТЕСТЕ РАСПОЗНАВАНИЯ НОВОГО ОБЪЕКТА У КРЫС ЛИНИИ WAG/RIJ С ГЕНЕТИЧЕСКОЙ АБСАНС-ЭПИЛЕПСИЕЙ

© 2020 г. Е. А. Федосова¹, *, А. Б. Шацкова¹, К. Ю. Саркисова¹

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

**E-mail: ekaterina5fedosova@rambler.ru*

Поступила в редакцию 03.02.2020 г.

После доработки 24.03.2020 г.

Принята к публикации 30.05.2020 г.

В настоящей работе у крыс линий WAG/Rij и Wistar в возрасте 2 и 6 мес. исследовали эпизодическую память в тесте распознавания нового объекта. С целью подавления симптомов абсанс-эпилепсии и коморбидной депрессии крысам линии WAG/Rij в возрасте 6 мес. вводили этосуксимид (300 мг/кг, 14 дней, в/б). Тест распознавания нового объекта состоял из следующих фаз: фазы адаптации, фазы ознакомления (два одинаковых объекта), тестовой фазы 1 (знакомый и незнакомый объект 1) и тестовой фазы 2 (знакомый и незнакомый объект 2). Во время адаптационной фазы регистрировали исследовательскую активность (число стоек и выходов в центр поля). Тестирование эпизодической памяти проводили через 1 ч (тестовая фаза 1) и через 24 ч (тестовая фаза 2) после фазы ознакомления. Эпизодическую память оценивали по индексу распознавания нового объекта. Установлено, что у крыс линии WAG/Rij в возрасте 2 мес. индекс распознавания нового объекта значимо не отличался, а в возрасте 6 мес. был значимо меньше аналогичного показателя у крыс Wistar. Крысы линии WAG/Rij проявляли пониженную исследовательскую мотивацию по сравнению с крысами Wistar только в возрасте 6 месяцев. Обнаружена положительная корреляция между индексом распознавания нового объекта и показателями исследовательской мотивации (числом стоек без опоры и числом выходов в центр поля). Этосуксимид подавлял пик-волновую активность, повышал исследовательскую мотивацию и улучшал эпизодическую память у крыс линии WAG/Rij. Результаты свидетельствуют о том, что нарушения эпизодической памяти в тесте распознавания нового объекта у крыс линии WAG/Rij могут быть следствием пониженной исследовательской мотивации как одного из симптомов депрессии, коморбидной абсанс-эпилепсии.

Ключевые слова: абсанс-эпилепсия, коморбидная депрессия, исследовательская мотивация, распознавание нового объекта, эпизодическая память, крысы линии WAG/Rij

DOI: 10.31857/S0869813920080051

Одной из актуальных проблем эпилептологии является исследование коморбидных психических расстройств. Ангедония, тревога, проблемы со сном и изменения аппетита отмечались у 71% пациентов с эпилепсией [1]. Самое распространенное коморбидное психиатрическое заболевание при конвульсивной эпилепсии — депрессия [1], которая снижает качество жизни пациентов в большей степени, чем сама эпилепсия [2, 3].

Для исследований различных форм конвульсивной и неконвульсивной эпилепсии широко используются экспериментальные модели эпилепсии, большинство из которых демонстрирует поведенческие нарушения, характерные для пациентов с эпилепсией [4]. Так, на моделях височной эпилепсии, воспроизводимых с помощью амигдаллярного киндлинга и пилокарпина [5, 6], было показано, что формирование хронических конвульсивных судорожных припадков сопровождается возникновением коморбидных депрессивно-подобных поведенческих нарушений.

Абсанс-эпилепсию – неконвульсивную форму эпилепсии долгое время считали лишенной коморбидных расстройств [7]. Однако впоследствии было обнаружено, что у крыс линии WAG/Rij, генетической модели абсанс-эпилепсии, наблюдается хроническая умеренно выраженная депрессия (дистимия), коморбидная абсанс-эпилепсии [8–10]. Поведенческие симптомы коморбидной депрессии обнаружены также у другой генетической модели абсанс-эпилепсии – у крыс линии GAERS [11].

Первые одиночные пик-волновые разряды (ПВП) у крыс линии WAG/Rij появляются примерно в возрасте 2–3 мес., а к 5–6-месячному возрасту число и длительность ПВП увеличиваются [12, 13]. По мере усиления пик-волновой активности у этих животных формируется ярко выраженное депрессивно-подобное поведение [14, 15], о котором свидетельствуют такие особенности поведения, как пониженное предпочтение сахарозы в тесте потребления сахарозы (ангедония) и повышенный уровень иммобильности в тесте вынужденного плавания (поведенческое отчаяние). Различий между крысами линий WAG/Rij и Wistar в уровне тревожности не обнаружено в тестах свето-темнового выбора, социального взаимодействия и приподнятого крестообразного лабиринта [8]. Повышенный по сравнению с крысами Wistar уровень тревожности в тестах свето-темнового выбора и приподнятого крестообразного лабиринта проявляли только крысы линии WAG/Rij, чувствительные к аудиогенной стимуляции [16].

Во всем многообразии психических патологий, сопутствующих конвульсивным формам эпилепсии, наиболее распространены жалобы пациентов на нарушение когнитивных функций [17]: обучение и память, внимание, исполнительные функции, перцептивно-моторные функции и социальное узнавание [18]. Клинические данные свидетельствуют о том, что у пациентов с детской абсанс-эпилепсией также наблюдаются когнитивные нарушения, в том числе, нарушения зрительного внимания и исполнительных функций по сравнению со здоровыми детьми [19].

Вопрос о том, имеются ли нарушения когнитивных функций у экспериментальных моделей данной патологии, остается неясным. Имеются единичные работы, посвященные исследованию когнитивных функций на экспериментальных моделях. У 5–6-месячных крыс линии WAG/Rij обнаружены нарушения воспроизведения следа памяти после выработки условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) [20]. Показано, что у крыс линии WAG/Rij значительно быстрее вырабатывается условный рефлекс активного избегания по сравнению с крысами Wistar, однако, сохранность выработанного рефлекса у них хуже по сравнению с крысами Wistar [21]. Рабочая память при обучении с использованием радиального 8-лучевого лабиринта у крыс линии WAG/Rij не отличается от таковой у трех неэпилептических инбредных линий крыс (BN/Cpb, ACI, и G/Cpb) [22]. В тесте на долгосрочную память в установке платформа с отверстиями наибольшее число ошибок обнаружено у крыс линий WAG/Rij и G/Cpb, у которых наблюдаются ПВП на ЭЭГ [22]. Вместе с тем имеются данные, указывающие на отсутствие нарушений обучения и памяти в тесте УРПИ у крыс линии WAG/Rij 6-месячного возраста [23]. Таким образом, данные о том, имеются ли когнитивные нарушения у крыс линии WAG/Rij, противоречивы и освещают только один аспект когнитивной сферы – обучение и память, оставляя за рамками исследовательскую мотивацию, без высокого уровня которой невозможна успешная реализация когнитивных функций.

Исследовательская мотивация у животных проявляется в виде исследовательской активности, показателями которой могут служить число стоек без опоры и число выходов в центр открытого поля. Показано, что в тесте открытое поле у крыс линии WAG/Rij по сравнению с крысами Wistar меньше число обоих показателей исследовательской активности, что указывает на низкий уровень исследовательской мотивации, стимулируемой новизной (novelty-driven exploratory motivation). Пониженный уровень исследовательской мотивации проявляется также в виде быстрой потери интереса к исследованию новой обстановки (потеря интереса/агедония – симптомы депрессивного расстройства) [8]. Подавление ПВР с помощью этосуксимида уменьшало проявление поведенческих симптомов депрессии, таких как повышенная иммобильность в тесте вынужденного плавания, пониженное предпочтение сахарозы и пониженная исследовательская активность в тесте открытого поля у крыс линии WAG/Rij, указывая на причинно-следственную связь между ПВР и депрессивно-подобными поведенческими нарушениями. Поведение крыс линии WAG/Rij, которым вводили этосуксимид, значимо не отличалось от поведения крыс Wistar [24, 25].

В нашей предыдущей работе [26] у крыс линии WAG/Rij по сравнению с крысами Wistar были показаны нарушения эпизодической памяти в тестах распознавания нового объекта (РНО) и социального распознавания. Тест РНО основан на естественном для грызунов предпочтении новизны: животные предпочитают обследовать незнакомый объект по сравнению со знакомым [27, 28]. Установлено, что в возрасте 6 и 12 мес. у крыс линии WAG/Rij индекс распознавания нового объекта значимо меньше по сравнению с аналогичными показателями у крыс Wistar того же возраста. Введение антиабсансного препарата этосуксимида крысам линии WAG/Rij улучшало эпизодическую память у животных этой линии в обоих возрастах, вследствие чего различия индекса распознавания между крысами линии WAG/Rij и Wistar становились незначимыми. Существенно, что значимых различий индекса распознавания между крысами Wistar, которым вводили этосуксимид и крысам этой линии, которым вводили физиологический раствор, не обнаружено. Это свидетельствует о том, что этосуксимид не оказывает непосредственного влияния на эпизодическую память, а его эффект опосредован влиянием на пик-волновую активность [26].

Цель настоящей работы – проверка предположения о том, что нарушение эпизодической памяти у крыс линии WAG/Rij в тесте РНО может быть следствием пониженной исследовательской мотивации как одного из поведенческих проявлений депрессии, коморбидной абсанс-эпилепсии. Для этого в тесте РНО была проведена оценка эпизодической памяти и исследовательской активности у крыс линии WAG/Rij по сравнению с крысами Wistar в возрасте 2 мес., когда пик-волновая активность и депрессивно-подобная симптоматика еще отчетливо не проявляются, и в возрасте 6 мес., когда ПВР и симптомы депрессии хорошо выражены. С целью подавления симптомов абсанс-эпилепсии и коморбидной депрессии использовали этосуксимид. Предполагалось, что подавление ПВР, вызываемое этосуксимидом, повысит исследовательскую мотивацию и приведет к улучшению эпизодической памяти у крыс линии WAG/Rij.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные. Работа выполнена на крысах-самцах линий WAG/Rij и Wistar. Крысы содержались в стандартных условиях вивария по 4–5 особей в клетке (70 × 40 × 40 см) при свободном доступе к воде и пище в условиях естественного цикла день–ночь (день около 10 ч).

Данное исследование проведено в соответствии с международными правилами содержания и обращения с животными (Директива Европейского сообщества от

22 сентября 2010 г. — Directive 2010/63/EU) и принципами, изложенными в положениях Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН о работе с экспериментальными животными.

Тестирование поведения. Эпизодическую память и показатели исследовательской активности оценивали в тесте РНО в течение 5 дней у 5 групп крыс: 2-месячные крысы Wistar ($n = 7$) и крысы линии WAG/Rij ($n = 8$), 6-месячные крысы Wistar ($n = 6$), крысы линии WAG/Rij ($n = 8$) и крысы линии WAG/Rij ($n = 11$), которым для подавления симптомов абсанс-эпилепсии и коморбидной депрессии вводили этосуксимид.

Этосуксимид. (Suxilep, JENAPHARM, GmbH&Co, KG, Jena, Германия) — антиабсансный препарат первого выбора. При длительном хроническом (4.5 мес.) и раннем (с 21-дневного до 5-месячного возраста) потреблении с питьевой водой он подавляет ПВП у крыс линии WAG/Rij более чем на 3 мес. после отмены [25]. При кратковременном хроническом (17 дней) потреблении этосуксимида с водой также наблюдали подавление абсанс-эпилепсии с коморбидной депрессией, но в меньшей степени, чем при длительном хроническом потреблении [24]. В настоящей работе этосуксимид вводили 6-месячным крысам линии WAG/Rij внутрибрюшинно в течение 14 дней в дозе 300 мг/кг/день. В указанной дозе этосуксимид эффективно блокирует ПВП и купирует симптомы коморбидной депрессии, не вызывая при этом нежелательных побочных эффектов (летаргия, атаксия, снижение потребления пищи), наблюдающихся при использовании более высоких доз препарата [25, 29]. Контрольным животным вводили физиологический раствор в том же объеме. В настоящем исследовании не показаны данные, полученные в тесте РНО у крыс Wistar, которым вводили этосуксимид, поскольку они были представлены в наших предыдущих работах. Было установлено, что на неэпилептических крысах Wistar этосуксимид не оказывает значимого влияния: не изменяет индекс распознавания нового объекта в тесте РНО [26], а также не влияет на показатели тревожности и исследовательской мотивации — число реакций грумिंगа, стоек и выходов в центр открытого поля [24, 25]. В настоящей статье представлены только результаты влияния этосуксимида на показатели, характеризующие внимание, у крыс Wistar, так как эти данные ранее нами не рассматривались.

Регистрация ЭЭГ. Так как тест РНО проводился в течение 5 дней после прекращения введения этосуксимида, необходимо было выяснить, в течение какого времени после отмены препарата будет подавлена пик-волновая активность. Поэтому в данной работе была проведена регистрация ЭЭГ у 6-месячных крыс линии WAG/Rij, которым вводили этосуксимид ($n = 11$) и физиологический раствор ($n = 8$) через 3 и 7 дней после отмены введения препарата. Электрофизиологические эксперименты были проведены на бодрствующих свободноподвижных животных в соответствии с описанным ранее методом [12]. Регистрацию ЭЭГ осуществляли с помощью хронически вживленных эпидуральных электродов (миниатюрные винтики из нержавеющей стали). Они были вживлены под наркозом (хлоралгидрат, 400 мг/кг, внутрибрюшинно). Два электрода вживляли в симметричные точки черепа над фронтальными отделами коры (AP — +2.0, L — 2.5) и два электрода над затылочными отделами коры (AP — -6.0, L — 4.0). Индифферентный электрод располагался над мозжечком. Восстановительный послеоперационный период составлял как минимум 7 дней. На время регистрации ЭЭГ крысу помещали в прозрачную камеру из плексигласа размером 15 × 30 × 27 см. Для записи ЭЭГ использовали: 8-канальный беспроводной усилитель, многоканальный АЦП с USB-интерфейсом, а также компьютер с установленным программным обеспечением, необходимым для регистрации поступающего сигнала и хранения данных (формат данных — bdf). Интерфейс связи с ПК — беспроводной (Bluetooth). Длительность каждой записи составляла 3 ч. Регистрацию ЭЭГ проводили в одно и то же время: с 16.00 до 19.00, когда

максимально проявляется пик-волновая активность. Анализ записей ЭЭГ проводили off-line. Подсчитывали общее число, длительность и индекс ПВР.

Тест РНО. Исследование проводили в квадратной арене (80 × 80 см). Объекты находились на одинаковом (20 см) расстоянии как от боковых стенок арены, так и друг от друга. Тест состоял из трехдневной фазы адаптации (A1, A2, A3), фазы ознакомления (T1) и тестовой фазы 1 (T2) и 2 (T3). В фазу адаптации крысу сажали в центр арены (без объектов) и в течение 5 мин регистрировали следующие показатели поведения: число стоек с опорой и без опоры, число выходов в центр, латентный период выхода в центр (с), число реакций груминга (короткие и длинные), число почесываний и величину полного пройденного пути (см). Данные показатели регистрировали и анализировали в программе RealTimer (Open Science, Россия) параллельно с регистрацией времени обследования каждого из объектов, визуализации треков и их последующего анализа с помощью программы EthoVision (версия 3.1). Видеорегистрация (видеокамера DCR-DVD7E, Sony Corporation) позволяла анализировать траекторию движения каждого животного в каждом опыте, а также дифференцировать реакции груминга на короткие (длительностью менее 3 с) и длинные (длительностью более 3 с), которые представляли собой неполные (незавершенные реакции или отдельные фрагменты) и полные (содержащие все последовательные компоненты) реакции груминга.

В фазу ознакомления животным предъявляли два одинаковых объекта (два куба). Через 1 ч проводили тестовую фазу 1, в которой оценивали кратковременную память [26]: один из знакомых объектов (ЗО) меняли на незнакомый объект (НО1 – пирамида). Через 24 ч после тестовой фазы 1 проводили тестовую фазу 2, в которой оценивалась долговременная память [26]: НО1 меняли на НО2 – цилиндр. В течение 5 мин регистрировали время исследования крысой каждого объекта. Перед каждым тестом арену и деревянные фигуры протирали 70%-ным этиловым спиртом. Исследованием объекта считали обнюхивание, когда нос животного находился на расстоянии не более 2 см от объекта. Степень предпочтения незнакомого объекта характеризует индекс распознавания (ИР), который рассчитывают по формуле: $ИР = (\text{время обследования НО} - \text{время обследования ЗО}) / (\text{время обследования НО} + \text{время обследования ЗО})$ [26, 27].

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета программ STATISTICA 6.0. Для оценки фактора возраст и фактора линия крыс использовали двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA). Обработку тех показателей, которые фиксировали многократно во время всех фаз эксперимента (стойки с опорой, латентный период выхода в центр, число коротких и длинных реакций груминга, число почесываний) осуществляли с помощью трехфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями (three-way ANOVA one factor with repeated measures). Для оценки влияния этосуксида на повторно регистрируемые показатели у 6-месячных крыс линии WAG/Rij использовали дисперсионный анализ с повторными измерениями (ANOVA with repeated measures). Определение различий между средними значениями показателей проводили по post-hoc критерию Ньюмена–Кеулса (Newman–Keuls test). Существование связи между индексом распознавания в тестовую фазу 1 (ИР1) и показателями исследовательской активности – числом стоек без опоры и числом выходов в центр в фазу адаптации, определяли по коэффициенту корреляции Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Двухфакторный дисперсионный анализ показал, что в фазе ознакомления факторы линия крыс ($F(1,25) = 2.30, p > 0.05$) и возраст ($F(1,25) = 0.90, p > 0.05$) не оказывали статистически значимого влияния на длительность исследования правого и

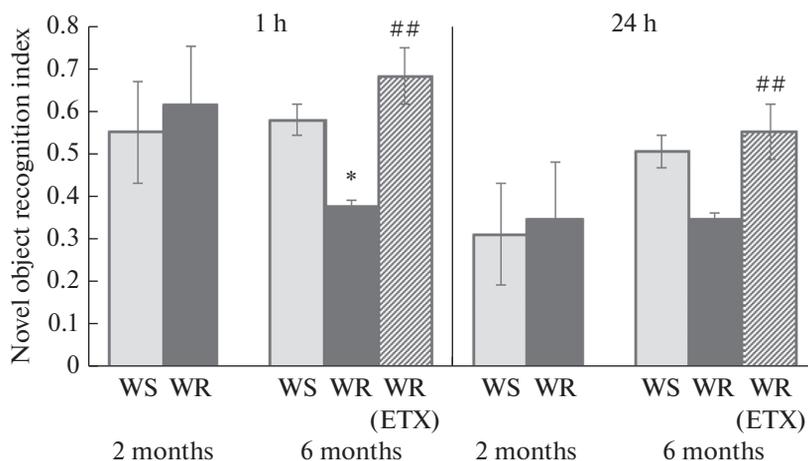


Рис. 1. Индекс распознавания нового объекта через 1 и 24 ч после предъявления двух одинаковых объектов. WS – крысы Wistar, WR – крысы линии WAG/Rij, которым вводили физиологический раствор (контрольная группа), WR(ETX) – крысы линии WAG/Rij, которым вводили этосуксимид (опытная группа). * $p < 0.05$ у 6-месячных WR по сравнению с WS того же возраста. ## $p < 0.01$ у опытной группы WR по сравнению с контрольной.

Fig. 1. Novel object recognition index 1 h and 24 h after presentation of two identical objects. WS – Wistar rats, WR – WAG/Rij rats subjected to saline treatment (control group), WR(ETX) – WAG/Rij rats subjected to ethosuximide treatment (experimental group). * $p < 0.05$ in 6-month-old WR compared with age-matched WS. ## $p < 0.01$ in the experimental group of WR compared with controls.

левого куба. У всех исследованных групп крыс не наблюдали статистически значимых различий между временем исследования правого и левого объектов. Однофакторный дисперсионный анализ также показал, что группа крыс линии WAG/Rij, которой вводили этосуксимид, не отличалась от животных данной линии, которым вводили физиологический раствор, ни по времени исследования правого ($F(1,17) = 4.38$, $p = 0.08$), ни по времени исследования левого куба ($F(1,17) = 2.04$, $p = 0.19$). Это говорит о том, что исходное предпочтение правой или левой фигуры отсутствовало.

Для ИР1 двухфакторный дисперсионный анализ показал значимость фактора линия крыс ($F(1,25) = 3.43$, $p < 0.05$) и возраст ($F(1,25) = 5.76$, $p < 0.05$). В возрасте 2 мес. у крыс линии WAG/Rij данный показатель статистически значимо не отличался от такового у крыс Wistar ($F(1,13) = 0.83$, $p > 0.05$) (рис. 1). Однако в возрасте 6 мес. ИР1 был меньше у крыс линии WAG/Rij по сравнению с крысами Wistar аналогичного возраста ($F(1,12) = 8.32$, $p = 0.01$), а также по сравнению с 2-месячными крысами линии WAG/Rij ($F(1,14) = 9.83$, $p < 0.01$) (рис. 1).

В отличие от ИР1 для индекса распознавания в тестовой фазе 2 (ИР2) двухфакторный дисперсионный анализ показал отсутствие значимости факторов линия крыс ($F(1,25) = 0.59$, $p > 0.05$) и возраст ($F(1,25) = 1.09$, $p > 0.05$) (рис. 1). Статистически значимых отличий данного показателя не было установлено у 6-месячных крыс линии WAG/Rij по сравнению с 2-месячными ($F(1,14) = 0.94$, $p = 0.3$) и 6-месячными крысами Wistar ($F(1,12) = 3.38$, $p = 0.08$), а также у 6-месячных крыс Wistar по сравнению с 2-месячными ($F(1,11) = 1.96$, $p = 0.18$). По данным однофакторного дисперсионного анализа введение этосуксимида значимо увеличивало ИР1 ($F(1,17) = 11.45$, $p < 0.01$) и ИР2 ($F(1,17) = 14.97$, $p < 0.01$) у крыс линии WAG/Rij по сравнению с животными той же линии, которым вводили физиологический раствор (рис. 1).

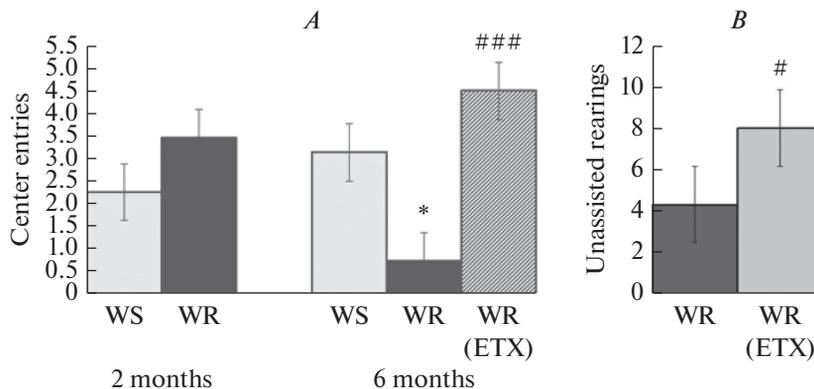


Рис. 2. Число выходов в центр арены и число стоек без опоры. *A* – число выходов в центр. WS – крысы Wistar, WR – крысы линии WAG/Rij, которым вводили физиологический раствор (контрольная группа), WR(ETX) – крысы линии WAG/Rij, которым вводили этосуксимид (экспериментальная группа). * $p < 0.05$ у 6-месячных WR по сравнению с WS того же возраста. ### $p < 0.001$ у экспериментальной группы WR по сравнению с контрольной. *B* – влияние этосуксимида на число стоек без опоры у 6-месячных WR. # $p < 0.05$ у экспериментальной группы WR по сравнению с контрольной.

Fig. 2. The number of center entries and the number of unassisted rearings. *A* – the number of center entries. WS – Wistar rats, WR - WAG/Rij rats subjected to saline treatment (control group), WR(ETX) – WAG/Rij rats subjected to ethosuximide treatment (experimental group). * $p < 0.05$ in 6-month-old WR compared with age-matched WS. ### $p < 0.001$ in the experimental group of WR compared with controls. *B* – effect of ethosuximide on the number of unassisted rearings in 6 month-old WR rats. # $p < 0.001$ in the experimental group of WR compared with controls.

Предъявление незнакомого предмета – одно из событий, запускающих исследовательскую активность, важными показателями которой являются число выходов в центр арены и число стоек без опоры, зарегистрированные во время трехдневной фазы адаптации, когда животные исследуют незнакомую для них арену. Двухфакторный дисперсионный анализ показал значимость фактора линия крыс ($F(1,25) = 1.70$, $p = 0.02$) и отсутствие значимости фактора возраст ($F(1,25) = 0.70$, $p = 0.41$) для такого показателя, как число выходов в центр арены в фазу адаптации. У крыс линии WAG/Rij в возрасте 2 мес. данный показатель не отличался от такового у крыс Wistar ($F(1,13) = 1.00$, $p = 0.34$) (рис. 2A), в то время как в возрасте 6 мес. наблюдали статистически значимые различия по числу выходов в центр арены между крысами линий WAG/Rij и Wistar ($F(1,12) = 11.81$, $p < 0.01$) (рис. 2A).

По данным однофакторного дисперсионного анализа у крыс линии WAG/Rij, которым вводили этосуксимид, число выходов в центр арены было значимо больше, чем у животных той же линии, которым вводили физиологический раствор ($F(1,17) = 12.30$, $p < 0.01$), то есть, антиабсансный препарат нивелировал межлинейные различия по этому показателю (рис. 2A).

Для другого показателя исследовательской активности – числа стоек без опоры на стенку арены – в фазе адаптации значимым по данным двухфакторного дисперсионного анализа являлся фактор возраст ($F(1,25) = 2.01$, $p = 0.02$), а незначимым – фактор линия крыс ($F(1,25) = 0.94$, $p = 0.28$). Число стоек без опоры у 6-месячных животных было меньше, чем у 2-месячных как у крыс линии WAG/Rij, так и у крыс Wistar. Однако уровня статистической значимости изменение данного показателя достигало только у крыс линии WAG/Rij ($F(1,14) = 10.59$, $p < 0.01$). У 6-месячных крыс Wistar число стоек без опоры было также меньше, чем у 2-месячных, однако, это

различие не достигало уровня статистической значимости ($F(1,11) = 3.41, p = 0.09$). Однофакторный дисперсионный анализ показал, что у крыс линии WAG/Rij, которым вводили этосуксимид, число стоек без опоры было больше по сравнению с контрольной группой, которой вводили физиологический раствор ($F(1,17) = 3.18, p = 0.02$) (рис. 2B).

Была установлена значимая ($p < 0.05$) положительная корреляция между ИП1 и числом стоек без опоры у крыс Wistar в возрасте 2 ($r = 0.81$) (рис. 3A) и 6 мес. ($r = 0.67$) (рис. 3C) и у крыс линии WAG/Rij в возрасте 2 ($r = 0.77$) (рис. 3B) и 6 мес. ($r = 0.73$) (рис. 3D), включая группу крыс линии WAG/Rij, которой вводили этосуксимид ($r = 0.76$) (рис. 3E).

Была также установлена значимая ($p < 0.05$) положительная корреляция между ИП1 и числом выходов в центр арены у крыс Wistar в возрасте 2 ($r = 0.90$) (рис. 4A) и 6 мес. ($r = 0.91$) (рис. 4C) и у крыс линии WAG/Rij в возрасте 2 ($r = 0.57$) (рис. 4B) и 6 мес. ($r = 0.49$) (рис. 4D), включая группу WAG/Rij, которой вводили этосуксимид ($r = 0.56$) (рис. 4E).

Схожую картину возрастных изменений наблюдали у такого поведенческого показателя, как число стоек с опорой (табл. 1) в фазах адаптации, ознакомления и тестирования. В первый день тестирования этот показатель был статистически значительно меньше как у 6-месячных крыс линии WAG/Rij, так и у 6-месячных крыс Wistar по сравнению с 2-месячными крысами линий WAG/Rij ($F(1,14) = 18.174, p < 0.001$) и Wistar ($F(1,11) = 10.11, p < 0.01$) соответственно. Однако это различие было в большей степени выражено у крыс линии WAG/Rij (в 10.3 раза меньше), чем у крыс Wistar (в 7.4 раза меньше). Меньшее число стоек с опорой было зарегистрировано на третий день тестирования у крыс линии WAG/Rij в возрасте 6 месяцев по сравнению с 2-месячными животными той же линии ($F(1,14) = 4.72, p = 0.03$) (табл. 1). При этом в отличие от числа стоек без опоры введение этосуксимида существенно не повлияло на данный показатель ($F(1,17) = 2.07, p = 0.15$) (табл. 1).

Способность к распознаванию нового объекта в тесте РНО существенно зависит не только от уровня исследовательской активности животных, но и от их внимания. С целью анализа различий в избирательной направленности на исследование объектов, характеризующей внимание, проводили видеорегистрацию треков передвижения крыс при предъявлении им объектов (рис. 5A–D). Кроме этого, для количественной оценки внимания использовали следующие показатели: число посещений пустой части арены и полный пройденный путь в те дни эксперимента, когда животным предъявляли объекты – в фазу ознакомления и фазу тестирования 1 и 2. Чем быстрее крысы подходили к объектам, чем больше времени исследовали новый (незнакомый) объект по сравнению с уже знакомым и чем меньше посещали пустую часть арены, тем больше внимания они проявляли по отношению к исследуемым объектам (рис. 5A, C, D). Отсутствие избирательной направленности на исследование объектов и частые посещения пустой части арены, напротив, служили показателями дефицита внимания (рис. 5B).

Избирательную направленность на исследование объектов (внимание) оценивали по доле времени, в течение которого крысы исследовали объекты (в % от общего времени тестирования). Установлено, что в Т2 у 6-месячных крыс линии WAG/Rij этот показатель внимания ($6.7 \pm 2.5\%$) был меньше ($p < 0.01$), чем у крыс Wistar, которым вводили физиологический раствор ($19.5 \pm 2.5\%$) или этосуксимид ($19.0 \pm 3.4\%$), а также у крыс линии WAG/Rij, которым вводили этосуксимид ($20 \pm 2.7\%$). При этом время исследования незнакомого объекта у крыс линии WAG/Rij было в среднем в 1.5 раза больше, чем время обследования знакомого объекта, в то время как у крыс Wistar с введением физиологического раствора или этосуксимида, а также у крыс линии WAG/Rij, которым вводили этосуксимид, время исследования незнакомого объекта было в среднем в 4, 3.8 и 3.2 раза больше, чем исследование зна-

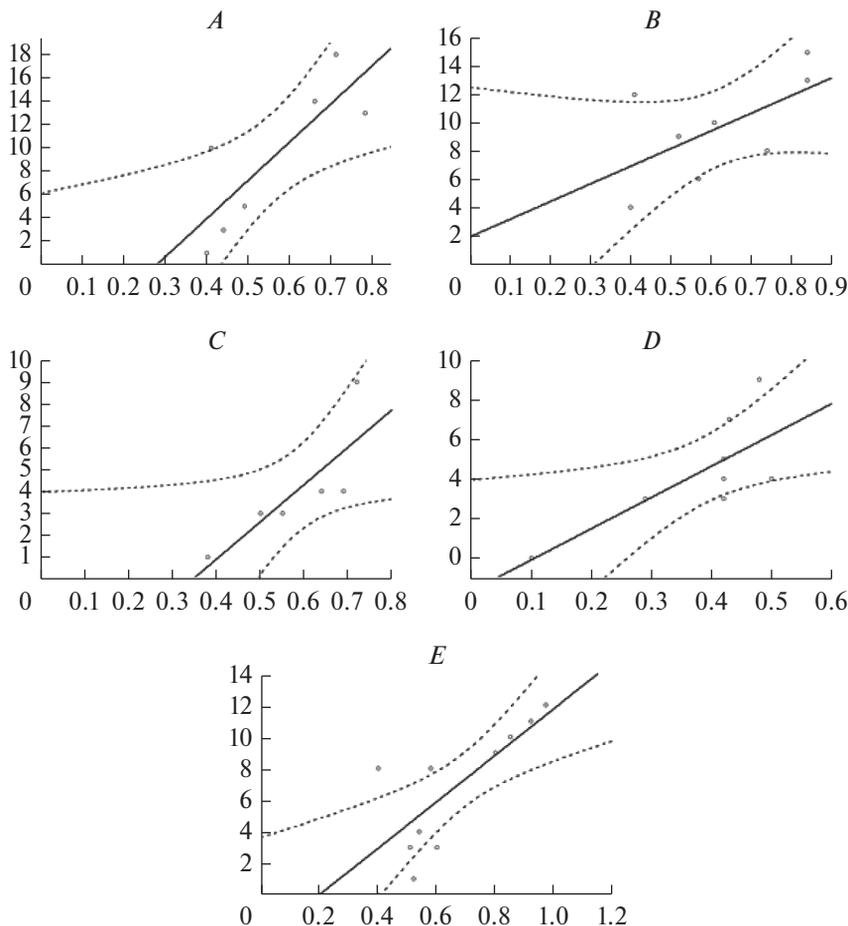


Рис. 3. Связь между ИР 1 и числом стоек без опоры. По оси абсцисс – индекс распознавания, по оси ординат – число стоек без опоры. Коэффициенты корреляции Пирсона: *A* – у 2-месячных крыс Wistar, $r = 0.81$. *B* – у 2-месячных крыс линии WAG/Rij, $r = 0.77$. *C* – у 6-месячных крыс Wistar, $r = 0.67$. *D* – у 6-месячных крыс линии WAG/Rij, $r = 0.73$. *E* – у 6-месячных крыс линии WAG/Rij, которым вводили этосуксимид, $r = 0.76$.

Fig. 3. Correlation between RI 1 and the number of unassisted rearings. Abscissa – recognition index, ordinate – the number of unassisted rearings. Pearson correlation coefficients: *A* – in 2-month-old Wistar rats, $r = 0.81$. *B* – in 2-month-old WAG/Rij rats, $r = 0.77$. *C* – in 6-month-old Wistar rats, $r = 0.67$. *D* – in 6-month-old WAG/Rij rats, $r = 0.73$. *E* – in 6-month-old ethosuximide-treated WAG/Rij rats, $r = 0.76$.

комого. Введение этосуксимида не оказало значимого влияния на показатели внимания у неэпилептических крыс Wistar: на долю времени, в течение которого крысы исследовали объекты (в % от общего времени тестирования), а также на предпочтение исследования незнакомого объекта по сравнению со знакомым.

Согласно данным двухфакторного дисперсионного анализа для числа посещений пустой части арены в фазу ознакомления и в фазу тестирования 1 и 2 была показана высокая значимость только одного фактора – линия крыс ($F(1,25) = 1.55$, $p = 0.03$) (табл. 1). Так, данный показатель у крыс линии WAG/Rij был больше, чем у крыс Wistar в возрасте как 2 ($F(1,13) = 7.78$, $p = 0.04$), так и 6 мес. ($F(1,12) = 9.12$,

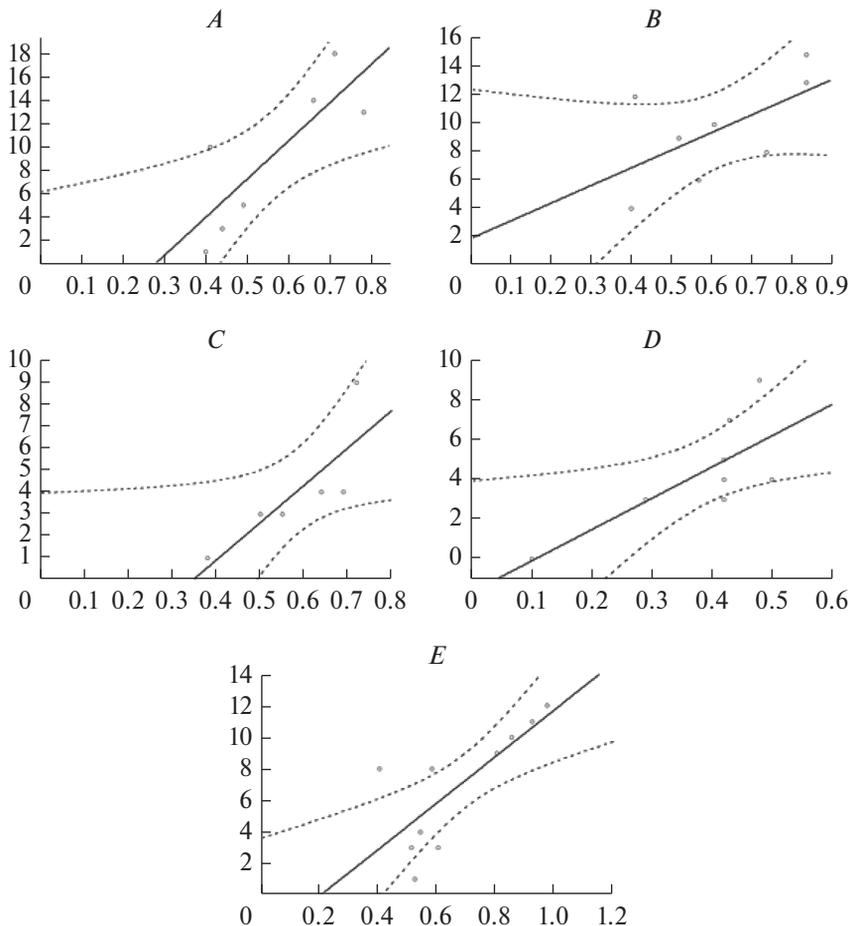


Рис. 4. Связь между ИР 1 и числом выходов в центр арены. По оси абсцисс – индекс распознавания, по оси ординат – число выходов в центр. Коэффициенты корреляции Пирсона: *A* – у 2-месячных крыс Wistar, $r = 0.90$. *B* – у 2-месячных крыс линии WAG/Rij, $r = 0.57$. *C* – у 6-месячных крыс Wistar, $r = 0.91$. *D* – у 6-месячных крыс линии WAG/Rij, $r = 0.49$. *E* – у 6-месячных крыс линии WAG/Rij, которым вводили этосуксимид, $r = 0.56$.

Fig. 4. Correlation between RI 1 and the number of center entries. Abscissa – recognition index, ordinate – the number of center entries. Pearson correlation coefficients: *A* – in 2-month-old Wistar rats, $r = 0.90$. *B* – in 2-month-old WAG/Rij rats, $r = 0.57$. *C* – in 6-month-old Wistar rats, $r = 0.91$. *D* – in 6-month-old WAG/Rij rats, $r = 0.49$. *E* – in 6-month-old ethosuximide-treated WAG/Rij rats, $r = 0.56$.

$p = 0.02$)) (табл. 1, рис. 5*A, C*). Однофакторный дисперсионный анализ показал, что у крыс линии WAG/Rij, которым вводили этосуксимид, число посещений пустой части арены было значимо меньше ($F(1,17) = 29.86, p < 0.001$) по сравнению с животными той же линии, которым вводили физиологический раствор, в те дни эксперимента, когда крысам предъявлялись объекты (табл. 1, рис. 5*D*). Этосуксимид не оказал значимого влияния на число посещений пустой части арены во время предъявления объектов у крыс линии Wistar ($A(1,14) = 2.1, p > 0.05$) (рис. 5*C*).

Для полного пройденного пути в фазу ознакомления и фазу тестирования 1 и 2 двухфакторный дисперсионный анализ продемонстрировал значимость обоих

Таблица 1. Показатели поведения ($M \pm m$) в тесте распознавания нового объекта
Table 1. Behavioral measures ($M \pm m$) in the novel object recognition test

Показатели поведения Behavioral measures		Фаза тестирования Test phase	2 месяца 2 months		6 месяцев 6 months		
			WS	WR	WS	WR	WR(ETX)
Число стоек с опорой Number of assisted rearings		A1	11.7 ± 1.6	13.7 ± 1.5	4.3 ± 1.7 ^{XX}	3.5 ± 1.5 ^{XXX}	2.0 ± 0.6
		A3	5.1 ± 1.3	6.9 ± 1.2	2.5 ± 1.4	1.9 ± 1.2 ^X	1.2 ± 0.6
Число посещений пустой части арены Number of entries to the empty part of the arena		T1 + T2 + T3	4.1 ± 1.4	8.6 ± 1.1*	1.2 ± 0.7	3.7 ± 0.6*	0.5 ± 0.1 ^{###}
Величина полного пройденного пути, м Total distance moved, m		T1 + T2 + T3	2.7 ± 0.3	2.8 ± 0.4	2.6 ± 0.4	4.2 ± 0.2 ^{X*}	3.9 ± 0.2
Латентный период выхода в центр арены, с Latency of center entries, s		A1	138 ± 33	169 ± 30	130 ± 36	284 ± 31*	113 ± 25 ^{##}
		A2	199 ± 33	215 ± 31	170 ± 36	265 ± 31	121 ± 29 [#]
		A3	209 ± 34	226 ± 32	269 ± 37	288 ± 32	163 ± 28 [#]
Число реакций грумминга Number of grooming reactions	Короткие Short	A1	3.7 ± 0.6	2.5 ± 0.6	0.7 ± 0.2 ^{XX}	0.6 ± 0.2 ^X	0.4 ± 0.2
		A2	4.0 ± 0.9	3.0 ± 0.8	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.1 ± 0.1 [#]
		A3	3.1 ± 0.6	1.7 ± 0.5	0.3 ± 0.1 ^X	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.2
	Длинные Long	T2	3.6 ± 0.8	3.6 ± 0.7	0.3 ± 0.1 ^X	0.1 ± 0.1 ^{XX}	0.09 ± 0.07
		T3	3.3 ± 0.6	4.0 ± 0.6	0.2 ± 0.1 ^{XX}	0.4 ± 0.2 ^{XXX}	0.4 ± 0.2
		T3	1.4 ± 0.4	1.0 ± 0.4	0.8 ± 0.5	2.9 ± 0.4 ^{X*}	2.0 ± 0.2 [#]
Число почесываний Number of scratching		A1	0.3 ± 0.3	8.0 ± 0.9 ^{***}	0.0 ± 1.1	0.5 ± 0.4 ^{XXX}	0.5 ± 0.2
		A3	0.1 ± 0.1	1.1 ± 0.5	0.8 ± 0.6	1.5 ± 0.6	0.4 ± 0.2 [#]
		T1	1.7 ± 0.3	2.4 ± 0.3	0.5 ± 0.4 ^X	0.4 ± 0.2 ^{XX}	1.6 ± 0.2 [#]
		T2	0.1 ± 0.3	0.8 ± 0.3	0.3 ± 0.3	1.2 ± 0.3 ^X	0.7 ± 0.3

Число стоек без опоры и число выходов в центр арены представлены на рис. 2. WS – крысы Wistar, WR – крысы линии WAG/Rij, которым вводили физиологический раствор (контрольная группа), WR(ETX) – крысы линии WAG/Rij, которым вводили этосуксимид (опытная группа). ^X $p < 0,05$; ^{XX} $p < 0,01$; ^{XXX} $p < 0,001$ у 6-месячных крыс по сравнению с 2-месячными животными той же линии; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ у WR по сравнению с WS того же возраста; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ у опытной группы WR по сравнению с контрольной.

The number of unassisted rearings and center entries is presented in Fig. 2. WS – Wistar rats subjected to saline treatment (control group), WR(ETX) – WAG/Rij rats subjected to ethosuximide treatment (experimental group). ^X $p < 0.05$; ^{XX} $p < 0.01$; ^{XXX} $p < 0.001$ in 6-month-old rats compared with 2-month-old rats of the same strain; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ in 6-month-old WR compared with age-matched WS. # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ in experimental group of WR compared with controls.

факторов – линия крыс ($F(1,25) = 3.00$, $p < 0.05$) и возраст ($F(1,25) = 4.87$, $p < 0.05$) (табл. 1). Полный пройденный путь был больше у 6-месячных крыс линии WAG/Rij по сравнению как с 6-месячными крысами Wistar ($F(1,12) = 5.27$, $p = 0.02$), так и с 2-месячными крысами той же линии ($F(1,14) = 3.94$, $p = 0.04$) (табл. 1).

Латентный период выхода в центр (с) у 6-месячных крыс линии WAG/Rij был больше, чем у крыс Wistar того же возраста в первый день тестирования ($F(1,12) = 5.27$, $p = 0.02$) (табл. 1). У крыс линии WAG/Rij, которым вводили этосуксимид, данный показатель был меньше в первые три дня тестирования (фаза адаптации) по сравнению с крысами той же линии, получавшими физиологический раствор (табл. 1). Причем, в первый день тестирования (A1) различия достигали высокого уровня статистической значимости ($F(1,17) = 30.916$, $p < 0.001$), во второй день (A2) – достаточного уровня ($F(1,17) = 14.52$, $p < 0.01$), а на третий день тестирования (A3) разли-

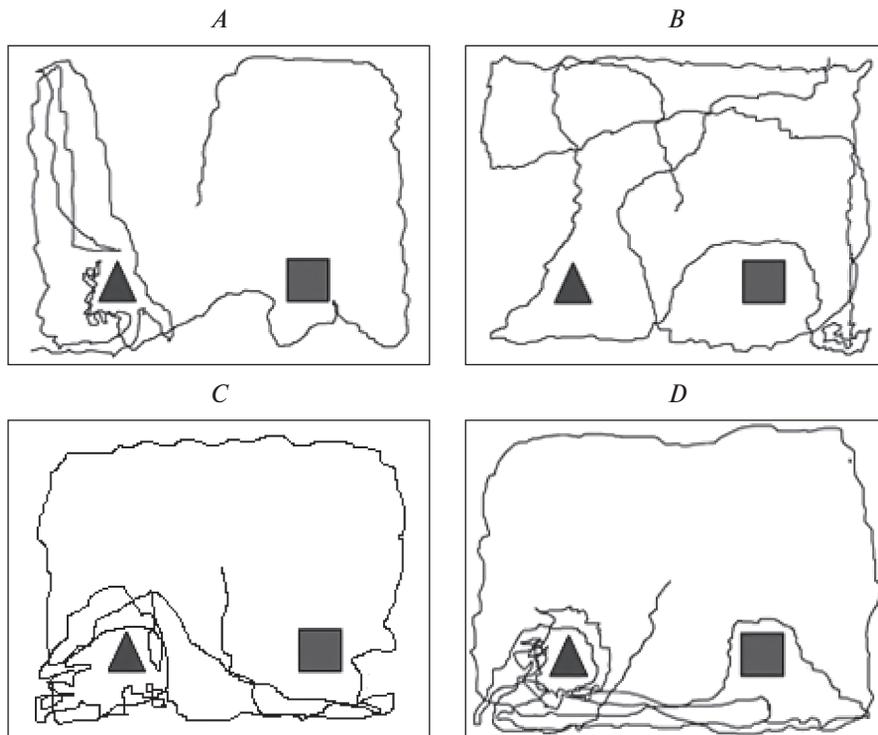


Рис. 5. Примеры треков передвижения крыс по арене в течение 5 мин тестирования. *A* – 6-месячная крыса Wistar, *B* – 6-месячная крыса линии WAG/Rij, *C* – 6-месячная крыса Wistar, которой вводили этосуксимид, *D* – 6-месячная крыса линии WAG/Rij, которой вводили этосуксимид. Квадратом обозначен пол arenas. Пирамида – незнакомый объект, куб – знакомый объект. Крыса Wistar, которой вводили физиологический раствор (*A*), крыса Wistar, которой вводили этосуксимид (*C*), и крыса линии WAG/Rij, которой вводили этосуксимид (*D*), избирательно исследовали незнакомый объект, а крыса линии WAG/Rij, которой вводили физиологический раствор (*B*), не демонстрировала избирательного исследования объектов и предпочтение незнакомому объекту.

Fig. 5. Examples of the movement tracks of rats in the arena within 5 minutes of testing. *A* – 6-month-old Wistar rat, *B* – 6-month-old WAG/Rij rat, *C* – 6-month-old ethosuximide-treated Wistar rat, *D* – 6-month-old ethosuximide-treated WAG/Rij rat. The square indicates the floor of the arena. Pyramid – an unfamiliar object, cube – a familiar object. Wistar rat (*A*), ethosuximide-treated Wistar rat (*C*) and ethosuximide-treated WAG/Rij rat (*D*) selectively investigated an unfamiliar object, saline-treated WAG/Rij rat (*B*) did not demonstrate a selective investigation of the objects and the preference for an unfamiliar object.

чия достигали наименьшего уровня статистической значимости ($F(1,17) = 6.01, p = 0.02$) (табл. 1).

Число коротких (неполных) реакций груминга уменьшалось с возрастом как у крыс линии WAG/Rij, так и у крыс Wistar (табл. 1), причем, возрастные изменения данного показателя в фазе адаптации были выражены в большей степени у крыс Wistar, чем у крыс WAG/Rij. Так, в первый день тестирования у 6-месячных крыс линии WAG/Rij число коротких реакций груминга было значимо меньше по сравнению с 2-месячными животными той же линии ($F(1,14) = 6.72, p = 0.02$) (табл. 1). Данный показатель также был значимо меньше у 6-месячных крыс Wistar по сравнению с 2-месячными ($F(1,11) = 10.58, p = 0.01$), но различия между двумя возрастными группами в большей степени были выражены у крыс Wistar, чем у крыс WAG/Rij. На

третий день тестирования у крыс Wistar в возрасте 6 месяцев было меньше число коротких реакций груминга по сравнению с 2-месячными животными ($F(1,11) = 7.40$, $p = 0.04$) (табл. 1). В фазу тестирования 1 и 2 у крыс обеих линий – WAG/Rij и Wistar также было значимо меньше число коротких реакций груминга в 6-месячном возрасте по сравнению с 2-месячным (табл. 1). В фазу тестирования 1 число коротких реакций груминга было меньше у 6-месячных крыс линии WAG/Rij по сравнению с 2-месячными ($F(1,14) = 12.53$, $p < 0.01$). У крыс Wistar данный показатель также был меньше в возрасте 6 мес. по сравнению с 2-месячными животными ($F(1,11) = 7.02$, $p = 0.02$) (табл. 1). В фазу тестирования 2 возраст-зависимое уменьшение числа коротких реакций груминга было обнаружено у крыс линии WAG/Rij ($F(1,14) = 17.572$, $p < 0.001$) и у крыс Wistar ($F(1,11) = 15.40$, $p < 0.01$). Введение этосуксимида повлияло на число коротких реакций груминга только на второй день тестирования: их число было значимо меньше у той группы крыс линии WAG/Rij, которой вводили этосуксимид, по сравнению с животными с введением физиологического раствора ($F(1,17) = 5.95$, $p = 0.03$) (табл. 1).

Различия в числе длинных (полных) реакций груминга были обнаружены только в фазу тестирования 2 (табл. 1). Данный показатель был больше у 6-месячных крыс линии WAG/Rij как по сравнению с крысами Wistar аналогичного возраста ($F(1,12) = 17.66$, $p < 0.01$), так и по сравнению с 2-месячными крысами линии WAG/Rij ($F(1,14) = 15.23$, $p < 0.01$). Введение этосуксимида уменьшало число длинных реакций груминга у крыс линии WAG/Rij по сравнению с контрольной группой животных данной линии ($F(1,17) = 5.54$, $p = 0.03$) (табл. 1).

Число почесываний в первый день тестирования было значимо больше у крыс линии WAG/Rij по сравнению с крысами Wistar (табл. 1). Эту картину наблюдали как в возрасте 2 ($F(1,13) = 17.892$, $p < 0.001$), так и 6 месяцев ($F(1,12) = 10.21$, $p < 0.01$). В фазу ознакомления ($F(1,14) = 6.37$, $p = 0.04$) и в фазу тестирования 1 число почесываний было меньше у 6-месячных крыс Wistar по сравнению с 2-месячными ($F(1,11) = 10.63$, $p < 0.01$), а также у 6-месячных крыс линии WAG/Rij по сравнению с 2-месячными животными этой линии ($F(1,14) = 12.62$, $p < 0.01$). У крыс линии WAG/Rij, которым вводили этосуксимид, данный показатель был меньше на третий день тестирования ($F(1,17) = 4.59$, $p = 0.04$) и, напротив, больше в фазу ознакомления ($F(1,17) = 10.09$, $p < 0.01$), по сравнению с животными с введением физиологического раствора (табл. 1).

Двухфакторный дисперсионный анализ показал значимость фактора этосуксимида ($F(1,6) = 66.269$, $p < 0.001$) и отсутствие значимости фактора день ($F(1,6) = 0.36$, $p > 0.05$) для числа ПВР. Введение этосуксимида значимо уменьшало данный показатель как на 3-и сутки после отмены инъекций ($F(1,6) = 15.11$, $p < 0.01$) (рис. 6A), так и на 7-е сутки ($F(1,6) = 14.47$, $p < 0.01$) у крыс линии WAG/Rij по сравнению с животными той же линии, которым вводили физиологический раствор (рис. 6A).

Для длительности ПВР двухфакторный дисперсионный анализ также показал значимость фактора этосуксимида ($F(1,6) = 17.77$, $p < 0.01$) и отсутствие значимости фактора день ($F(1,6) = 0.31$, $p > 0.05$). У крыс линии WAG/Rij на 3-и сутки после отмены инъекций этосуксимида средняя длительность ПВР была значимо меньше ($F(1,6) = 6.73$, $p = 0.02$) по сравнению с контрольной группой, которой вводили физиологический раствор (рис. 6B). При этом статистически значимых различий на 7-е сутки после отмены введения препарата между контрольной и экспериментальной группами крыс не наблюдали ($F(1,6) = 2.14$, $p = 0.10$) (рис. 6B).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В фазе ознакомления в тесте РНО ни одна из исследованных групп животных не проявляла предпочтение правого или левого объекта. Это говорит о том, что было

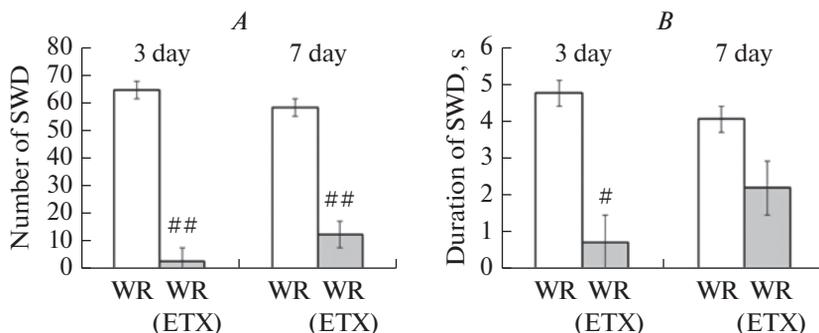


Рис. 6. Влияние хронического введения этосуксимида на число (A) и среднюю длительность (B) пиковых разрядов у крыс линии WAG/Rij. WR – крысы линии WAG/Rij, которым вводили физиологический раствор (контрольная группа), WR(ETX) – крысы линии WAG/Rij с введением этосуксимида (опытная группа). $^{\#}p < 0,05$, $^{\#\#}p < 0,01$ у опытной группы WR по сравнению с контрольной.

Fig. 6. Effect of chronic ethosuximide treatment on the number (A) and duration (B) of spike-wave discharges in WAG/Rij rats. WR – WAG/Rij rats subjected to saline treatment (control group), WR(ETX) – WAG/Rij rats subjected to ethosuximide treatment (experimental group). $^{\#}p < 0.05$, $^{\#\#}p < 0.01$ – in the experimental group of WR compared with controls.

выполнено одно из важнейших условий проведения теста РНО – отсутствие выраженного предпочтения одной из двух одинаковых фигур.

ИР1 и ИР2 у 2-месячных крыс линии WAG/Rij значимо не отличались от данных показателей у крыс Wistar, что указывает на отсутствие нарушений эпизодической памяти у крыс линии WAG/Rij данного возраста. У крыс линии WAG/Rij в возрасте 2 мес. не было обнаружено выраженных симптомов абсанс-эпилепсии на ЭЭГ [12]. Ранее было показано, что в тесте принудительного плавания значимых различий по длительности иммобильности между 2-месячными крысами линий WAG/Rij и Wistar не выявлено, что говорит об отсутствии симптомов депрессии в поведении у крыс линии WAG/Rij в возрасте 2 мес. [21]. Таким образом, у крыс линии WAG/Rij в возрасте 2 мес. отсутствие хорошо выраженной пик-волновой активности и коморбидной депрессии сопровождается отсутствием нарушений как кратковременной, так и долговременной эпизодической памяти.

В возрасте 6 мес. ИР1 был меньше у крыс линии WAG/Rij по сравнению с крысами Wistar аналогичного возраста и по сравнению с крысами линии WAG/Rij в возрасте 2 мес. Это свидетельствует о нарушении кратковременной эпизодической памяти у крыс линии WAG/Rij, что, вероятно, связано с экспрессией хорошо выраженных ПВР на ЭЭГ и симптомов депрессивно-подобного поведения у крыс линии WAG/Rij в 6-месячном возрасте [8, 14, 15]. В отличие от ИР1 различий в ИР2 не было обнаружено у 6-месячных крыс линии WAG/Rij по сравнению с 2-месячными животными той же линии и 6-месячными крысами Wistar. Это указывает на отсутствие нарушений долговременной эпизодической памяти в возрасте 6 мес. Примечательно, что ИР2 во всех группах был несколько меньше, чем ИР1, однако, ни в одной экспериментальной ситуации это различие не достигало уровня статистической значимости. Это свидетельствует о том, что на второй день тестирования у всех групп животных в одинаковой степени снижается интерес к исследованию нового объекта. Другими словами, наблюдается сходная динамика снижения интереса к исследуемому объекту у всех тестируемых групп животных.

У крыс линии WAG/Rij, которым вводили этосуксимид, был больше как IP1, так и IP2 по сравнению с животными той же линии с введением физиологического раствора.

Это указывает на то, что данный антиабсансный препарат улучшает как кратковременную, так и долговременную эпизодическую память у крыс линии WAG/Rij.

Предполагалось, что возможной причиной нарушений эпизодической памяти у крыс линии WAG/Rij с абсанс-эпилепсией и коморбидной депрессией может быть пониженный уровень исследовательской мотивации, который является одним из наиболее заметных поведенческих признаков депрессии. Помещение животного в незнакомую арену приводит к столкновению двух мотиваций: исследовательской мотивации, вызываемой новизной обстановки, и мотивации страха (тревоги), вызываемой умеренным стрессогенным воздействием (открытое, хорошо освещенное пространство). Баланс между исследовательской мотивацией и мотивацией страха определяет текущее поведение животного в арене. Вертикальная активность (стойки без опоры), осуществляемая животным в более опасной части арены — ближе к ее центру, свидетельствует о преобладании в поведении исследовательской мотивации, направленной на исследование новой обстановки [30]. Было установлено отсутствие отличий числа стоек без опоры и выходов в центр арены между крысами линий WAG/Rij и Wistar в возрасте 2 мес. Это отражает проявление нормальной исследовательской активности у крыс линии WAG/Rij в этом возрасте, когда отсутствуют выраженная пик-волновая активность и признаки депрессивно-подобного поведения. В возрасте 6 месяцев число выходов в центр арены у крыс линии WAG/Rij становится значимо меньше по сравнению с аналогичными показателями у крыс Wistar. Другой показатель исследовательской активности (число стоек без опоры) также был меньше у 6-месячных крыс линий WAG/Rij и Wistar по сравнению с 2-месячными животными тех же линий. У крыс линии WAG/Rij, которым вводили этосуксимид, число обоих показателей исследовательской активности по сравнению с крысами той же линии с введением физиологического раствора, было значимо больше. В настоящей работе установлено, что стойки без опоры и выходы в центр арены во время стадии адаптации являются достаточно надежными поведенческими маркерами (предикторами) успешности последующего распознавания нового объекта в тесте РНО. Это подтверждается наличием значимой положительной корреляции между IP1 и числом стоек без опоры у крыс Wistar и у крыс WAG/Rij, а также наличием значимой положительной корреляции между IP1 и числом выходов в центр арены как у крыс Wistar, так и у крыс WAG/Rij. Другими словами, была обнаружена положительная корреляция между эпизодической памятью в тесте РНО и показателями исследовательской мотивации.

Тест РНО не требует специального предварительного обучения, способность отличить незнакомый объект от знакомого, в основном, определяется вниманием — направленной активностью животного на исследование предъявляемых объектов: двух одинаковых во время фазы ознакомления и знакомого/незнакомого во время тестовой фазы 1 и 2. Дефицит исследовательской мотивации проявится, в том числе, снижением внимания и увеличением отвлекаемости при решении задачи [31]. Число посещений пустой части арены у крыс линии WAG/Rij было больше, чем у крыс Wistar в возрасте как 2, так и 6 мес. Полный пройденный путь был также больше у крыс WAG/Rij по сравнению с крысами Wistar в возрасте 6 месяцев. Подобное отвлечение от исследования объектов (вместо повышенного интереса к объекту) может рассматриваться как дефицит внимания (исходя из вышеизложенного определения). Крысы линии WAG/Rij чаще посещали ту часть арены, в которой отсутствовали объекты, они активно перемещались по арене, не оказывая предпочтения ни одному из исследуемых объектов. Внимание крыс линии WAG/Rij к предъявляемым предметам было слабо выражено: животные проводили

меньше времени рядом с объектами по сравнению с крысами Wistar и крысами WAG/Rij, которым вводили этосуксимид. Введение этосуксимида значительно уменьшало число посещений пустой части арены у крыс линии WAG/Rij по сравнению с животными той же линии, которые получали физиологический раствор. Это указывает на то, что препарат, по всей видимости, уменьшал отвлекаемость при решении задачи, то есть улучшал внимание у крыс линии WAG/Rij.

Общее время исследования объектов в T2 (в % от времени тестирования) у 6-месячных крыс WAG/Rij было меньше, чем у крыс Wistar, которым вводили физиологический раствор или этосуксимид, а также у крыс WAG/Rij, которым вводили этосуксимид. При этом крысы линии WAG/Rij исследовали незнакомого объект в течение меньшего времени, чем крысы Wistar, которым вводили физиологический раствор или этосуксимид, а также крысы линии WAG/Rij, которым вводили этосуксимид. Это указывает на отсутствие предпочтения незнакомого объекта по сравнению со знакомым у крыс WAG/Rij по сравнению с крысами Wistar, а также крысами линии WAG/Rij, которым вводили этосуксимид. Отсутствие избирательной направленности на исследование незнакомого объекта (отсутствие предпочтения незнакомого объекта по сравнению со знакомым) также указывает на дефицит внимания у крыс WAG/Rij.

С этим выводом согласуются результаты, полученные ранее в тесте сложный лабиринт с пищевым подкреплением, в котором на фоне пищевой депривации проводилась выработка у крыс пищедобывательного навыка. Скорость достижения критерия обученности при выполнении прямой задачи в сложном лабиринте была значительно меньше у крыс опытной группы (WAG/Rij), чем у контрольной группы (Wistar). При этом число ошибок (возврат в предыдущие отсеки лабиринта), которые могут свидетельствовать о дефиците внимания, было значительно больше у крыс линии WAG/Rij по сравнению с крысами Wistar [32].

В нашем предыдущем исследовании [26] наряду с тестом РНО был проведен тест социального распознавания, схема которого идентична тесту РНО, но в качестве объектов для распознавания были использованы 21-дневные ранее незнакомые крысы-самцы той же линии, что и исследуемые животные. Тест социального распознавания был нами проведен для того, чтобы выяснить, может ли быть связана пониженная исследовательская мотивация, выявленная в тесте РНО, с природой исследуемого объекта (одушевленный/неодушевленный), так как взаимодействие с живыми крысятами имеет более высокую биологическую значимость для животных, чем исследование неодушевленных предметов. Индекс социального распознавания у 6-месячных крыс линии WAG/Rij был меньше, чем у крыс Wistar как через 1 ч, так и через 24 ч после фазы ознакомления, что свидетельствует о нарушении как кратковременной, так и долговременной памяти у генетической модели абсанс-эпилепсии [26]. Кроме того, в тесте социального распознавания у 6-месячных крыс линии WAG/Rij наблюдали также дефицит внимания, который оценивали по общему времени исследования живого объекта в фазе ознакомления. Полное время исследования 21-дневного крысенка было значительно меньше у крыс линии WAG/Rij по сравнению с крысами Wistar. Более того, у крыс WAG/Rij наблюдали такую форму поведения, как социальное избегание — отказ от исследования живого объекта, что говорит о пониженной исследовательской мотивации [26]. Таким образом, независимо от природы объекта у крыс линии WAG/Rij с генетической абсанс-эпилепсией и коморбидной депрессией наблюдают пониженную исследовательскую мотивацию по сравнению с крысами, лишенными пик-волновой активности и симптомов депрессии (крысы Wistar).

В первый день тестирования латентный период выхода в центр арены у 6-месячных крыс линии WAG/Rij был больше, чем у крыс Wistar того же возраста. У крыс WAG/Rij, которым вводили этосуксимид, данный показатель был меньше в первые

три дня тестирования по сравнению с крысами этой же линии, получавшими физиологический раствор. Аналогичные данные были получены ранее в тесте сложный лабиринт с пищевым подкреплением: средняя величина латентного периода выхода из стартового отсека была больше у крыс WAG/Rij на 56% относительно крыс Wistar. При переучивании величина латентного периода выхода из стартового отсека у крыс WAG/Rij также была больше на 67% относительно контрольных крыс Wistar [32]. Эти данные также свидетельствуют о пониженной исследовательской мотивации у крыс линии WAG/Rij.

Стойки с опорой, в отличие от стоек без опоры, осуществляемые животным в более безопасной части арены, возле бортиков, интерпретируются большинством исследователей как показатель тревожности (сдвиг поведения животного в сторону мотивации страха (тревожности)) [30]. Наблюдала зависимость от возраста уменьшение числа стоек с опорой в первый и третий день тестирования. Это различие было в большей степени выражено у крыс линии WAG/Rij, чем у крыс Wistar. Число коротких реакций груминга уменьшалось с возрастом как у крыс WAG/Rij, так и у крыс Wistar как в фазу адаптации, так и в дни тестирования. Число почесываний в первый день тестирования было значимо больше у крыс линии WAG/Rij по сравнению с крысами Wistar. Эта картина особенно отчетливо проявлялась в возрасте 2 мес. В фазе ознакомления число почесываний было меньше у 6-месячных животных обеих линий по сравнению с 2-месячными. Причем, у крыс линии WAG/Rij эта особенность поведения была выражена в большей степени, чем у крыс Wistar. Можно предположить, что указанные поведенческие показатели – стойки с опорой, короткие (неполные) реакции груминга [33] и почесывания могут отражать уровень тревожности, уменьшение которого с возрастом было выражено в большей степени у крыс линии WAG/Rij, чем у крыс Wistar. Повышенный уровень тревожности был ранее установлен у 2-месячных крыс WAG/Rij по сравнению с крысами Wistar аналогичного возраста в тестах на тревожность с использованием установок светотемновая камера и открытое поле [21].

Различия по числу длинных (полных) реакций груминга были обнаружены только в последний день тестирования (Т3). Данный показатель был больше у 6-месячных крыс WAG/Rij по сравнению с крысами Wistar аналогичного возраста и по сравнению с 2-месячными крысами WAG/Rij. Число длинных (полных) реакций груминга отражает привыкание к экспериментальной ситуации, которая, вероятно, становится комфортной для животных [33]. Так как различия по этому показателю были зарегистрированы в заключительной фазе тестирования, можно предположить, что они связаны с утратой интереса к исследованию объектов у крыс линии WAG/Rij в возрасте 6 месяцев, когда депрессивно-подобные симптомы в поведении у них хорошо выражены [8, 14, 15]. С этим предположением согласуются полученные ранее данные о том, что эффект повторного тестирования в открытом поле на число пересеченных квадратов, стоек и выходов в центр поля (величина снижения двигательной и исследовательской активности) был больше выражен у крыс линии WAG/Rij по сравнению с крысами Wistar. Это свидетельствует о различиях в привыкании к новой ситуации между крысами линий WAG/Rij и Wistar и указывает на более низкую эмоциональную реактивность (эмоциональность) у 6-месячных крыс линии WAG/Rij [8].

Введение этосуксимида значимо уменьшало число и длительность ПВП на 3-и сутки после отмены инъекций у крыс WAG/Rij по сравнению с животными той же линии, которым вводили физиологический раствор. На 7-е сутки число ПВП остается также меньше у крыс линии WAG/Rij, которым вводили этосуксимид, по сравнению с крысами этой же линии с введением физиологического раствора, в то время как средняя длительность разрядов восстанавливается. Эти данные свидетельствуют о том, что те крысы линии WAG/Rij, которым вводили препарат, были практи-

чески полностью лишены пик-волновой активности — основного симптома абсанс-эпилепсии — во все дни проведения теста РНО.

Ранее было показано, что этосуксимид не обладает собственной антидепрессантной активностью, не связанной с его подавляющим влиянием на ПВР [24, 25]. Об этом свидетельствует тот факт, что кратковременное (17 дней) и длительное (4.5 мес.) хроническое введение этосуксимида не оказывало антидепрессантно-подобного эффекта на неэпилептических крыс Wistar: у них не наблюдали изменений потребления/предпочтения сладкого раствора по сравнению с водой (тест потребления сахарозы) и уровня иммобильности (тест принудительного плавания) [24, 25]. Кроме того, этосуксимид не оказывал влияния на эпизодическую память у крыс Wistar [26]. Это дает основание полагать, что у крыс линии WAG/Rij симптомы депрессии во все дни тестирования были также подавлены, о чем свидетельствовало повышение уровня исследовательской мотивации, продемонстрированное в тесте РНО.

Таким образом, данные, полученные в настоящей работе, позволяют заключить, что выявленные нарушения эпизодической памяти в тесте РНО у крыс линии WAG/Rij могут быть следствием пониженной исследовательской мотивации как одного из симптомов депрессии, коморбидной абсанс-эпилепсии. Уровень исследовательской активности (число стоек без опоры и выходов в центр арены) у животных в фазе адаптации может служить прогностическим показателем успешности последующего распознавания нового объекта в тесте РНО.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kanner A.M.* Depression in epilepsy: prevalence, clinical semiology, pathogenic mechanisms, and treatment. *Biol. Psychiatry.* 54: 388–398. 2003.
2. *Chen B., Choi H., Hirsch L.J., Katz A., Legge A., Buchsbaum R., Detyniecki K.* Psychiatric and behavioral side effects of antiepileptic drugs in adults with epilepsy. *Epilepsy Behav.* 76: 24–31. 2017.
3. *Mula M., Sander J.W.* Negative effects of antiepileptic drugs on mood in patients with epilepsy. *Drug Saf.* 30: 555–567. 2007.
4. *Brooks-Kayal A.R., Bath K.G., Berg A.T., Galanopoulou A.S., Holmes G.L., Jensen F.E., Kanner A.M., O'Brien T.J., Whittemore V.H., Winawer M.R., Patel M., Scharfman H.E.* Issues related to symptomatic and disease-modifying treatments affecting cognitive and neuropsychiatric comorbidities of epilepsy. *Epilepsia.* 54(4): 44–60. 2013.
5. *Chen S.D., Wang Y.L., Liang S.F., Shaw F.Z.* Rapid amygdala kindling causes motor seizure and comorbidity of anxiety- and depression-like behaviors in rats. *Front. Behav. Neurosci.* 10: 129. 2016.
6. *Xie W., Cai L., Yu Y., Gao L., Xiao L., He Q., Ren Z., Liu Y.* Activation of brain indoleamine 2, 3-dioxygenase contributes to epilepsy-associated depressive-like behavior in rats with chronic temporal lobe epilepsy. *J. Neuroinflamm.* 11: 41. 2014.
7. *Vergnes M., Marescaux C., Boehrer A., Depaulis A.* Are rats with genetic absence epilepsy behaviorally impaired? *Epilepsy Res.* 9: 97–104. 1991.
8. *Sarkisova K., van Luijckelaar G.* The WAG/Rij strain: a genetic animal model of absence epilepsy with comorbidity of depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 35(4): 854–876. 2011.
9. *Sarkisova K.Yu., Midzyanovskaya I.S., Kulikov M.A.* Depressive-like behavioral alterations and c-fos expression in the dopaminergic brain regions in WAG/Rij rats with genetic absence epilepsy. *Behav. Brain Res.* 2003. 144: 211–226. 2003.
10. *van Luijckelaar G., Sarkisova K., Midzyanovskaya I., Tolmacheva E.* Stress vulnerability and depressive symptoms in genetic absence epileptic rats. In: *New Research on Epilepsy and Behavior.* N.Y. Nova Science Publ. Inc. 211–278. 2007.
11. *Jones N.C., Salzberg M.R., Kumar G., Couper A., Morris M.J., O'Brien T.J.* Elevated anxiety and depression-like behavior in a rat model of genetic generalized epilepsy, suggesting common causation. *Exp. Neurol.* 209: 254–260. 2008.
12. *Gabova A.V., Sarkisova K.Yu., Fedosova E.A., Shatskova A.B., Morozov A.A.* Developmental changes in peak-wave discharges in WAG/Rij rats with genetic absence epilepsy. *Neurosci. Behav. Physiol.* 50: 245–252. 2020.
13. *Coenen A.M., van Luijckelaar E.L.* The WAG/Rij rat model for absence epilepsy: age and sex factors. *Epilepsy Res.* 1: 297. 1987.
14. *Саркисова К.Ю., Куликов М.А., Кудрин В.С., Наркевич В.Б., Мидзяновская И.С., Бирюкова Л.М., Фоломкина А.А., Базян А.С.* Нейрохимические механизмы депрессивноподобного поведения у крыс линии WAG/Rij. *Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова.* 63(3): 303–315. 2013. [*Sarkisova K.Yu., Kulikov M.A., Kudrin V.S., Narkevich V.B., Midzyanovskaya I.S.,*

- Birioukova L.M., Folomkina A.A., Bazyan A.S.* Neurochemical mechanisms of depression-like behavior in WAG/Rij rats. *Zh. Vyssh. Nerv. Deyat. Im. I.P. Pavlova.* 2013. 63(3): 303–315 (In Russ)].
15. *Саркисова К.Ю., Куликов М.А., Кудрин В.С., Мидзяновская И.С., Бирюкова Е.В.* Возрастные изменения в поведении, в содержании моноаминов, их метаболитов и в плотности D1 и D2 дофаминовых рецепторов в структурах мозга у крыс линии WAG/Rij с депрессивноподобной патологией. *Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова.* 64(6): 668–685. 2014. [*Sarkisova K.Y., Kulikov M.A., Kudrin V.S., Midzyanovskaya I.S., Birioukova L.M.* 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. Deyat. Im. I.P. Pavlova.* 64(6): 668–685. 2014. (In Russ)].
 16. *Sarkisova K.Yu., Kulikov M.A.* Behavioral characteristics of WAG/Rij rats susceptible and non-susceptible to audiogenic seizures. *Behav. Brain Res.* 166: 9–18. 2006.
 17. *Jacobs C.S., Willment K.C., Sarkis R.A.* Non-invasive cognitive enhancement in Epilepsy. *Front. Neurol.* 10: 167. 2019.
 18. *Lezak M.D., Howieson D.B., Bigler E.D., Tranel D.* Neuropsychological assessment. 5th ed. Oxford Univer. Press. 2012.
 19. *Cheng D., Yan X., Gao Z., Xu K., Zhou X., Chen Q.* Common and distinctive patterns of cognitive dysfunction in children with benign epilepsy syndromes. *Pediatr. Neurol.* 72: 36–41. 2017.
 20. *Гецова В.М., Орлова Н.В., Фоломкина А.А., Базян А.С.* Низкие дозы дисульфирама и L-ДОФА односторонне модифицируют типологические особенности поведения двух линий крыс Wistar и WAG/Rij. *Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова.* 53 (5): 656–662. 2003. [*Getsova V.M., Orlova N.V., Folomkina A.A., Bazyan A.S.* Low doses of disulfiram and L-DOPA evoke synergic modifications in behavior of two rat strains Wistar and WAG/Rij. *Zh. Vyssh. Nerv. Deyat. Im. I.P. Pavlova.* 53 (5): 656–662. 2003. (In Russ)].
 21. *Fedosova E.A., Sarkisova K.Yu., Kudrin V.S., Narkevich V.B., Bazyan A.S.* Behavioral and neurochemical characteristics of two months old WAG/Rij rats with genetic absence epilepsy. *Intern. J. Clinic Exper. Neurol.* 3(2): 32–44. 2015.
 22. *Inoue M., Peeters B.W.M.M., van Luijtelaaar E.L.J.M., Vossen J.M.H., Coenen A.M.L.* Spontaneous occurrence of spike-wave discharges in five inbred strains of rats. *Physiol. Behav.* 48(1): 199–201. 1990.
 23. *Karson A., Utkan T., Balç F., Arıcıoğlu F., Ates N.* Age-dependent decline in learning and memory performances of WAG/Rij rat model of absence epilepsy. *Behav. Brain Funct.* 8: 51. 2012.
 24. *Саркисова К.Ю., Куликов М.А., Фоломкина А.А.* Оказывает ли антиабсансный препарат этосуксимид антидепрессантный эффект? *Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова.* 61(2): 227–235. 2011. [*Sarkisova K.Yu., Kulikov M.A., Folomkina A.A.* Does antiabsence drug ethosuximide exert antidepressant effect? *Zh. Vyssh. Nerv. Deyat. Im. I.P. Pavlova.* 61(2): 227–235. 2011. (In Russ)].
 25. *Sarkisova K.Yu., Kuznetsova G.D., Kulikov M.A., van Luijtelaaar G.* Spike-wave discharges are necessary for the expression of behavioral depression-like symptoms. *Epilepsia.* 51: 146–160. 2010.
 26. *Leo A., Citraro R., Tallarico M., Iannone M., Fedosova E., Nesci V., De Sarro G., Sarkisova K., Russo E.* Cognitive impairment in the WAG/Rij rat absence model is secondary to absence seizures and depressive-like behavior. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 94: 109652. 2019.
 27. *Antunes M., Biala G.* The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure and its modifications. *Cogn. Process.* 13: 93–110. 2012.
 28. *Mazarati A., Jones N.C., Galanopoulou A.S., Harte-Hargrove L.C., Kalynchuk L.E., Lenck-Santini P.P., Medel-Matus J.S., Nehlig A., de la Prida L.M., Sarkisova K., Veliskova J.* A companion to the preclinical common data elements on neurobehavioral comorbidities of epilepsy: a report of the TASK3 behavior working group of the ILAE/AES Joint Translational Task Force. *Epilepsia Open.* 3(1): 24–52. 2018.
 29. *Blumenfeld H., Klein J.P., Schridde U., Vestal M., Rice T., Khera D.S., Bashyal C., Giblin K., Paul-Laughinghouse C., Wang F., Phadke A., Mission J., Agarwal R.K., Englot D.J., Motelow J., Nersesyan H., Waxman S.G., Levin A.R.* Early treatment suppresses the development of spike-wave epilepsy in a rat model. *Epilepsia.* 49(3): 400–409. 2008.
 30. *Судаков С.К., Назарова Г.А., Алексеева Е.В., Башкатова В.Г.* Определение уровня тревожности у крыс: расхождение результатов в тестах “открытое поле”, “крестообразный придомный лабиринт” и тесте Фогеля. *Бюл. эксп. биол. мед.* 155(3): 7–12. 2013. [*Sudakov S.K., Nazarova G.A., Alekseeva E.V., Bashkatova V.G.* Estimation of the level of anxiety in rats: differences in results of open-field test, elevated plus-maze test, and Vogel’s conflict test. *Bull. Exp. Biol. Med.* 155(3): 295–297. 2013. (In Russ)].
 31. *Dalgleish T., Watts F.N.* Biases of attention and memory in disorders of anxiety and depression. *Clinic Psychol. Rev.* 10(5): 589–604. 1990.
 32. *Малышев А.В., Захаров А.М., Саркисова К.Ю., Дубынин В.А.* Реверсивное обучение у крыс линии WAG/Rij с депрессивноподобным поведением. *Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова.* 62(5): 580–590. 2012. [*Malyshov A.V., Zakharov A.M., Sarkisova K.Yu., Dubynin V.A.* Reverse learning in WAG/Rij rats with depression-like behavior. *Zh. Vyssh. Nerv. Deyat. Im. I.P. Pavlova.* 62(5): 580–590. 2012. (In Russ)].

33. *Kalueff A.V., Tuohimaa P.* The grooming analyses algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. *J. Neurosci. Methods.* 143(2): 69–77. 2005.

Ethosuximide Increases Investigatory Motivation and Improves Episodic Memory in the Novel Object Recognition Test in WAG/Rij Rats with Genetic Absence Epilepsy

E. A. Fedosova^{a,*}, A. B. Shatskova^a, and K. Yu. Sarkisova^a

^aInstitute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

**e-mail: ekaterina5fedosova@rambler.ru*

In the present study, episodic memory was investigated in the novel object recognition test in WAG/Rij and Wistar rats at the age of 2 and 6 months. In order to suppress spike-wave seizure activity and depressive-like comorbidity WAG/Rij rats, at the age of 6 months, were injected ethosuximide (300 mg/kg, 14 days, i/p). Novel object recognition test consisted of 3 phases: adaptation phase, familiarization phase (two identical objects), testing session 1 (familiar and novel object 1) and testing session 2 (familiar and novel object 2). In adaptation phase, investigatory activity (number of rearings and center entries) was recorded. Recognition memory was tested with a delay of 1h (testing session 1) and 24h (testing session 2), after familiarization phase. Episodic memory was assessed using novel object recognition index. It has been found that recognition index in WAG/Rij rats, at the age of 2 months, did not differ significantly, but at the age of 6 months, it differ significantly from the corresponding measure in Wistar rats. WAG/Rij rats exhibited reduced investigatory motivation compared with Wistar rats at the age of 6 months only. A positive correlation was found between recognition index and investigatory motivation (number of unassisted rearings and center entries). Ethosuximide suppressed spike-wave seizures, increased investigatory motivation and improved episodic memory in WAG/Rij rats. Results suggest that episodic memory impairments in WAG/Rij rats are a consequence of reduced investigatory motivation as one of the symptom of depression co-morbid to absence epilepsy.

Keywords: absence epilepsy, comorbid depression, investigatory motivation, novel object recognition, episodic memory, WAG/Rij rat

ЦИТИРОВАТЬ:

Федосова Е.А., Шацкова А.Б., Саркисова К.Ю. Этосуксимид повышает исследовательскую мотивацию и улучшает эпизодическую память в тесте распознавания нового объекта у крыс линии WAG/Rij с генетической абсанс-эпилепсией. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 106(8): 974–993.

DOI: 10.31857/S0869813920080051

TO CITE THIS ARTICLE:

Fedosova E.A., Shatskova A.B., Sarkisova K.Yu. Ethosuximide Increases Investigatory Motivation and Improves Episodic Memory in the Novel Object Recognition Test in WAG/Rij Rats with Genetic Absence Epilepsy. *Russian Journal of Physiology.* 106(8): 974–993.

DOI: 10.31857/S0869813920080051

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ГЕМОДИНАМИЧЕСКИМИ РЕАКЦИЯМИ НА ХОЛОДОВОЙ СТРЕСС И ИЗМЕНЕНИЯМИ УРОВНЯ САЛИВАРНОГО КОРТИЗОЛА

© 2020 г. Д. Б. Дёмин*

*Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики
им. акад. Н.П. Лавёрова РАН, Архангельск, Россия*

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

Поступила в редакцию 10.02.2020 г.
После доработки 06.04.2020 г.
Принята к публикации 30.05.2020 г.

С целью определения типов гемодинамических реакций на общее охлаждение организма и выявления степени выраженности холодового стресса от динамики изменения слюварного кортизола в эксперименте обследованы 30 здоровых мужчин-добровольцев в возрасте 18–20 лет. Эксперимент включал три десятиминутных этапа: пребывание в состоянии покоя при температуре 20°C, нахождение в условиях холодовой камеры при температуре –20°C, согревание при температуре 20°C. Во время каждого этапа регистрировали артериальное давление (АД), частоту сердечных сокращений (ЧСС), температуру в слуховом проходе, проводили отбор проб слюны для последующего определения уровней свободного кортизола. Испытуемые были разделены на две группы по динамике изменений слюварного кортизола во время охлаждения – с повышением ($n = 22$) и снижением ($n = 8$) уровня гормона. Показано, что за время охлаждения температура тела испытуемых значительно снижалась в среднем на 2.1–2.3°C и не достигала исходных значений к концу этапа согревания. В обеих группах лиц при охлаждении показано повышение АД и снижение ЧСС, при этом в группе с повышением содержания кортизола выявлены значимо более высокие уровни систолического АД и незначимое снижение ЧСС. При согревании гемодинамические показатели стремились к исходным показателям, а изменение уровня слюварного кортизола было сходным с таковым при охлаждении. Таким образом, нарастание уровня кортизола в слюне при кратковременном (10 мин) охлаждении организма человека связано с выраженной холодовой гипертензией, более низким барорефлекторным ответом и риском холодовых повреждений сосудов. Снижение уровня слюварного кортизола как отражение сокращения поступления свободного гормона в клетку при холодовом стрессе, в комплексе с умеренной холодовой артериальной гипертензией, может свидетельствовать об успешной адаптации организма к холоду с ограничением развития гипотермии.

Ключевые слова: кортизол, артериальное давление, воздушное охлаждение организма, гипотермия

DOI: 10.31857/S086981392008004X

Оценка динамики изменений концентрации кортизола при экстремальных воздействиях является важным показателем развития стресса. В крови определенная часть кортизола находится в связанном с белком плазмы (транскортином) состоянии и не обладает биологической активностью. С диагностической целью предпо-

читательнее определять концентрацию именно свободных, т.е. не связанных с плазменными белками гормонов [1]. Несмотря на многочисленные данные о прямой корреляции кортизола в крови и в слюне, имеется достаточно свидетельств о разнонаправленных изменениях уровня кортизола в слюне при различных нагрузках. Так, при психосоциальном стрессе уровень слюнного кортизола, как правило, нарастает, что соответствует концепции общего адаптационного синдрома [2]. Однако при физических нагрузках, особенно у спортсменов, уровень слюнного кортизола может не только не нарастать, но и снижаться [3]. Многие авторы расценивают факт снижения кортизола в слюне как недостаточность выраженности стрессорного воздействия, что зачастую противоречит как силе самого воздействия и субъективным ощущениям (чувство переутомления, утомляемость), так и показателям функциональной активности сердечно-сосудистой системы — яркая симпатическая реакция (повышение ударного объема сердца, артериального давления, изменение частоты сердечных сокращений) [4, 5]. Есть данные, что при пробе с охлаждением кистей рук в холодной воде наибольшая выраженность субъективного стресса коррелирует с менее выраженным подъемом артериального давления и с падением уровня кортизола в слюне [6]. В настоящее время стресс рассматривается не столько как явление с объективными физико-химическими параметрами стрессора, сколько с силой субъективного восприятия этого стрессора испытуемым. Так, при моделировании стрессовой ситуации в виртуальном пространстве уровень слюнного кортизола также повышался, как и при реально выполняемом тесте. В этом плане в большей степени уровень слюнного кортизола прямо коррелирует с социальным стрессом [7]. Выполнение же физической нагрузки зачастую связано с получением удовольствия или “мышечной радости”, что не может расцениваться как потенциально угрожаемое для личности состояние. Поэтому при физических нагрузках динамика изменений уровня кортизола может быть разной, по-видимому, вследствие включения, в той или иной степени, стресс-лимитирующих систем (например, системы эндорфинов) [4]. В литературе отсутствуют данные о взаимосвязи между динамикой изменения концентрации кортизола, с одной стороны, и типами гемодинамических реакций и степенью снижения температуры тела при кратковременном общем охлаждении человека, с другой.

Цель работы состояла в изучении изменения уровня слюнного кортизола при холодном воздействии как показателя степени выраженности стресса, а также в оценке того, какие физиологические реакции можно рассматривать как адаптивные, а какие — в качестве риска холодного повреждения сосудов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведено поперечное исследование, в котором приняли участие 30 здоровых мужчин в возрасте 18–20 лет, проживающих в г. Архангельске. Испытуемых выбрали на добровольной основе, от них было получено письменное информированное согласие на участие в эксперименте, одобренном Комиссией по биомедицинской этике ФИЦКИА РАН (протокол № 2 от 28.03.2018). Исследование проводили с соблюдением этических норм, изложенных в Хельсинкской декларации и директивах Европейского сообщества (8/609ЕС). Критерием исключения было наличие в анамнезе сердечно-сосудистых и эндокринных нарушений.

Эксперимент включал три этапа. На первом этапе (I) регистрировали фоновые гемодинамические показатели и температуру тела обследуемых — в покое, сидя, при температуре воздуха 20°C.

На втором этапе (II) добровольцы находились в течение 10 мин в положении сидя в условиях холодной камеры “УШЗ-25Н” (Ксирон-Холод, Москва) при температу-

ре -20°C . При этом все испытуемые были одеты в однотипные легкие хлопчатобумажные костюмы, без верхней одежды, головных уборов и перчаток.

Третий этап (III) проводился после выхода испытуемых из холодильной камеры, изучаемые показатели регистрировали в покое, сидя, при температуре воздуха 20°C .

Проводили регистрацию артериального давления (АД, мм рт. ст.) и частоты сердечных сокращений (ЧСС, уд/мин), трехкратно с последующим усреднением показателей, при помощи метрологически аттестованного автоматического измерителя АД (тонометра) A&D Medical UA-668 (Япония). В связи с техническими ограничениями рабочих температур используемого тонометра регистрация АД и ЧСС в условиях холодильной камеры (второй этап, II) не проводилась, показатели регистрировали в начале (сразу после выхода из камеры – начальная стадия третьего этапа, III-н) и в конце этапа согревания (10 мин после выхода из камеры – конечная стадия третьего этапа, III-к). Измерение центральной температуры испытуемых проводили в правом слуховом проходе при помощи медицинского электронного инфракрасного термометра V.Well WF-1000 (Швейцария) [8].

Дополнительно трехкратно: на первом этапе (фон), сразу после выхода из холодильной камеры (III-н) и через 10 мин после выхода из камеры (III-к) у испытуемых проводился сбор слюны объемом около 1.5 мл в подготовленные стерильные пробирки типа эппендорф. До отбора проб за 60 мин исключался прием пищи, напитков, использование жевательной резинки или чистка зубов. Образцы замораживали при температуре -20°C , исследование уровня кортизола в слюне проводили при комнатной температуре. Слюну центрифугировали в течение 10 мин при 2000 g, использовали только чистый бесцветный супернатант. Методом иммуноферментного *in vitro* анализа (ИФА) на автоматическом планшетном анализаторе ELISYS Uno (Human GmbH, Германия) при помощи набора реагентов Salivary Cortisol EIA (ООО ХЕМА, Москва) в слюне определяли уровни свободного кортизола. Использовали диапазоны колебаний свободного кортизола 0.28–5.80 нг/мл в слюне человека через 3.5–4.5 ч после пробуждения для исследуемой возрастной группы, согласно инструкции производителя.

После первичного анализа динамики изменений уровня слюнного кортизола в ходе эксперимента мужчины были дополнительно разделены на две группы: с повышением (ПК – 8 человек, 19.4 ± 0.8 лет) и снижением (СК – 22 человека, 19.2 ± 0.8 лет) уровня гормона к окончанию третьего этапа.

Полученные результаты обрабатывали при помощи пакета прикладных программ Statistica v. 10.0 (StatSoft Inc., США), учитывали средние значения (M) и стандартные отклонения (SD). Для проверки статистической гипотезы разности значений использовали критерий Вилкоксона для двух зависимых выборок и критерий Манна–Уитни для двух независимых групп. Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез принимали $p < 0.05$.

Сбор и дальнейшее использование первичного материала в рамках данной работы проводили совместно с сотрудниками лаборатории биоритмологии ФИЦКИА РАН д. б. н., доц. Л. В. Поскотиновой, к. б. н. Е. В. Кривоноговой и О. В. Кривоноговой.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Учитывая, что использование слюны в качестве материала для исследования обладает большими преимуществами, так как ее сбор является неинвазивной и безболезненной процедурой, свободный слюнный кортизол может рассматриваться как идеальный показатель для оценки острого ответа на стресс. Исходные уровни слюнного кортизола в целом по выборке были в пределах нормативных значений. Исходя из способа формирования групп, динамика содержания гормона в хо-

Таблица 1. Изменение температуры тела, уровня слюварного кортизола и показателей гемодинамики у мужчин при экспериментальном общем охлаждении организма ($M \pm SD$)
Table 1. Change in body temperature, salivary cortisol level and hemodynamic parameters in men with experimental general cooling of the body ($M \pm SD$)

Показатель Indices	Группа Group	I этап I stage	II этап II stage	III-к этап III-f stage	p-уровень p-level
Температура тела, °C Body temperature, °C	ПК IC	36.3 ± 0.2	34.2 ± 0.8	35.7 ± 0.5	I-II-IIIк < 0.001 I-II-IIIф < 0.001
	СК DC	36.3 ± 0.2	34.0 ± 1.1	35.7 ± 0.5	I-II-IIIк < 0.001 I-II-IIIф < 0.001
		I этап I stage	III-н этап III-s stage	III-к этап III-f stage	
Слюварный кортизол, нг/мл Salivary cortisol, ng / ml	ПК IC	1.26 ± 1.01	2.06 ± 1.19	2.13 ± 1.30	I-IIIн < 0.05 I-IIIк < 0.05 I-IIIс < 0.05 I-IIIф < 0.05
	СК DC	2.34 ± 1.57	1.61 ± 1.21	1.30 ± 0.90	I-IIIн-IIIк < 0.001 I-IIIс-IIIф < 0.001
Систолическое АД, мм рт. ст. Systolic blood pressure, mm Hg	ПК IC	129.4 ± 13.6	145.7 ± 13.5	128.4 ± 12.3	I-IIIн-IIIк < 0.01 IIIн ПК-СК < 0.05 I-IIIс-IIIф < 0.01 IIIс IC-DC < 0.05
	СК DC	123.7 ± 13.2	129.2 ± 10.0	121.5 ± 11.1	I-IIIн < 0.05 IIIн-IIIк < 0.01 I-IIIс < 0.05 IIIс-IIIф < 0.01
Диастолическое АД, мм рт. ст. Diastolic blood pressure, mm Hg	ПК IC	87.7 ± 11.9	98.7 ± 18.8	88.6 ± 10.5	I-IIIн-IIIк < 0.01 I-IIIс-IIIф < 0.01
	СК DC	81.3 ± 7.2	90.2 ± 9.5	83.3 ± 8.0	I-IIIн-IIIк < 0.001 I-IIIс-IIIф < 0.001
ЧСС, уд/мин Heart rate, bpm	ПК IC	68.1 ± 15.4	62.0 ± 11.9	63.7 ± 14.6	—
	СК DC	68.9 ± 10.3	63.0 ± 8.7	67.9 ± 10.2	I-IIIн-IIIк < 0.01 I-IIIс-IIIф < 0.01

ПК и СК – группы с повышением и снижением уровня слюварного кортизола в ходе эксперимента. I этап – фон, II этап – охлаждение, III-н и III-к этапы – начало и конец этапа согревания.
 IC and DC – groups with an increase and a decrease in the salivary cortisol level. I stage – rest, II stage – cooling, III-s and III-f stages – start and finish warming stage.

де эксперимента была различной. В группе ПК выявлено значимое повышение уровня слюварного кортизола, в наибольшей степени к окончанию исследования ($p < 0.05$). В группе СК отмечено значимое снижение содержания гормона ($p < 0.001$). Значимого отличия между группами на различных этапах исследования выявлено не было (табл. 1).

Центральная температура испытуемых имела сходную динамику в обеих группах со значимым снижением к окончанию холодого воздействия (конец II этапа) ($p < 0.01-0.001$) и значимым повышением при согревании (III-к) ($p < 0.01-0.001$), однако и через 10 мин после окончания холодого воздействия температура не достигала исходного уровня.

Показатели центральной гемодинамики со сходными тенденциями изменялись в обеих группах лиц. Сразу после выхода из холодого камеры (III-н) систолическое АД отчетливо возрастало у всех обследованных лиц относительно фоновых значений ($p < 0.05-0.01$), а на этапе согревания (III-к) значимо снижалось ($p < 0.01$), при этом в группе ПК на этапе III-н данный показатель был значимо вы-

ше, чем в группе СК ($p < 0.05$). Динамика диастолического АД в группах была сходной с таковой для систолического давления ($p < 0.01-0.001$). Динамика ЧСС в обеих группах лиц была зеркальной динамике АД и выражалась в снижении значений этого показателя сразу после выхода из холодной камеры (III-н) и постепенном его повышении на этапе согревания (III-к), при этом статистически значимые изменения отмечали лишь в группе СК ($p < 0.01$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По степени снижения центральной температуры тела ($34.0-34.2^{\circ}\text{C}$) гипотермию, экспериментально созданную у испытуемых, можно отнести к мягкой, а по длительности воздействия — к кратковременной [8]. Подразумевая, что снижение температуры в ушном проходе отражает степень холодовой вазоконстрикции сосудов оболочки тела (максимально приближенной к центру), то снижение кортизола ассоциировано со степенью выраженности барорефлекса (значимое снижение ЧСС) в ответ на холодовое повышение давления в магистральных сосудах. В то же время у лиц с повышением уровня слюнного (свободного) кортизола барорефлекс, как мы полагаем, не срабатывает в должной мере, что отражается в не столь значимом снижении ЧСС и более выраженном повышении систолического АД. Можно предположить, что сохранность барорефлекса в условиях гипотермии и снижения уровня свободного кортизола свидетельствует о более эффективном срабатывании адаптивных механизмов в условиях холода. При этом менее выраженная барорефлекторная реакция в комплексе с катаболическими эффектами нарастающего уровня кортизола приводит к более активному повышению АД и риску холодовых повреждений сосудов.

Учитывая вышеописанную динамику изменений показателей ЧСС и АД, перед нами встал вопрос о том, является ли контролируемое охлаждение организма человека стрессом в классическом его понимании? При столкновении со стрессором организм должен ответить на вызов. Обычно повышение уровня кортизола рассматривают как индикатор наличия стресса. Действительно, содержание кортизола при остром стрессе повышается в сыворотке крови и в слюне [2]. Однако при длительном воздействии стрессора возможно как повышение, так и снижение активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГН-системы), что проявляется в разнонаправленных изменениях содержания кортизола [9]. Согласно результатам мета-анализов, повышенная продукция кортизола чаще наблюдается при депрессивных состояниях [2, 10], тогда как посттравматические стрессовые расстройства, синдром хронического напряжения и общее психологическое истощение ассоциируются с тенденцией к снижению уровня кортизола [11]. Хотя активация ГГН-системы — неотъемлемая часть нормальной стресс-реакции, ее длительная или чрезмерная активация почти всегда имеет неблагоприятные последствия [2, 12].

При кратковременной умеренной гипотермии содержание кортизола в крови возрастает на 43.2% относительно контроля [13], при глубокой гипотермии это повышение составляет 54.4%, дальнейшее пролонгирование умеренной гипотермии приводит к снижению уровня кортизола и соответственно повышению уровня адренокортикотропного гормона (АКТГ) по сравнению с кратковременной умеренной гипотермией. Таким образом, при исследованных гипотермических состояниях существенное повышение уровня кортизола в крови происходит на фоне низкой концентрации АКТГ, что наводит на мысль об АКТГ-независимом ответе надпочечников. Потенциальные механизмы, вовлеченные в этот процесс, могут включать в себя повышение активности симпатической нервной системы, с активацией чревного нерва, или повышение уровня других стероидогенных факторов, в том

числе нейропептидов (вазоактивного интестинального пептида – VIP, кортикотропин-высвобождающего гормона – CRH) и простагландина E2 [14].

Помимо вышесказанного, выявленная динамика показателей ЧСС и АД позволяет предположить, что при снижении температуры внешней среды и, как следствие, при гипотермии, у испытуемых со снижением уровня слюварного (свободного) кортизола не происходит ожидаемой ответной стрессорной реакции (срабатывают стресс-лимитирующие системы). Это кажущееся несоответствие, вероятно, можно интерпретировать с учетом характера стрессора. Наше исследование проводилось в конце календарной зимы (февраль), т.е. при относительной физической адаптированности обследуемых к низким температурам. Кроме того, исследование не было для них внезапной ситуацией, требующей немедленного ответа симпатической нервной и ГГН-систем, все испытуемые были заранее психологически готовы к эксперименту, знали его дизайн и продолжительность.

Еще в 1960-е годы, когда Селье проводил исследования, ориентируясь на физические стрессоры (например, тепло, холод, боль), Mason [15] занимался изучением изменений уровня секреции кортизола в стрессогенных условиях (например, воздушный перелет или прыжки с парашютом) с учетом психологических параметров стресса. В результате были сформулированы три основные характеристики стрессора, детерминирующие реакцию стресса: он должен восприниматься индивидом как новый, и/или неожиданный, и/или неподвластный контролю со стороны индивида. Значительно позднее к этому перечню была добавлена еще одна характеристика – наличие угрозы социальной оценки [16]. Эти четыре параметра характеризуют субъективное восприятие ситуации, пребывание в которой запускает биохимические проявления стрессовой реакции [2, 17].

Таким образом, нарастание уровня кортизола в слюне при кратковременном (10 мин) охлаждении организма человека связано с выраженной холодовой гипертензией, более низким барорефлекторным ответом и риском холодовых повреждений сосудов. Снижение уровня слюварного кортизола как отражение сокращения поступления свободного гормона в клетку при холодовом стрессе в комплексе с умеренной холодовой артериальной гипертензией может свидетельствовать о варианте успешной адаптации организма к холоду с ограничением развития гипотермии. Экспериментальное кратковременное однократное воздушное общее охлаждение при таких разноплановых физиологических реакциях, по-видимому, не может являться прямой моделью кратковременного стресса. В то же время мы не исключаем того, что дальнейшее нахождение человека при подобном холодовом воздействии может привести к потере контроля над механизмами адаптации, истощению функции коры надпочечников, критичному снижению уровня кортизола и развитию патологических состояний.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках темы ФНИР ИФПА ФГБУН ФИЦКИА РАН № АААА-А19-119120990083-9.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Adam E.K., Kumari M. Assessing salivary cortisol in large-scale, epidemiological research. *Psychoneuroendocrinology*. 34(10): 1423–1436. 2009.
2. Козлов А.И., Козлова М.А. Кортизол как маркер стресса. *Физиология человека*. 40(2): 123–136. 2014. [Kozlov A.I., Kozlova M.A. Cortisol as a Marker of Stress. *Human Physiology*. 40(2): 123–136. 2014. (In Russ)].
3. Rutherford-Markwick K., Starck C., Dulson D.K. Salivary diagnostic markers in males and females during rest and exercise. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* 14: Art. 27. 2017.

4. Kilian Y., Engel F., Wahl P., Achtzehn S., Sperlich B., Mester J. Markers of biological stress in response to a single session of high-intensity interval training and high-volume training in young athletes. *Eur. J. Appl. Physiol.* 116: 2177–2186. 2016.
5. Кубасов Р.В., Барачевский Ю.Е., Иванов А.М., Кубасова Е.Д. Симпатоадреналовая и гипофизарно-надпочечниковая активность у сотрудников МВД России при различных уровнях профессиональной напряженности. *Экология человека.* 6: 9–14. 2015. [Kubasov R.V., Barachevskiy Yu.E., Ivanov A.M., Kubasova E.D. Sympathoadrenal and Hypophysial-Adrenal Activity in Law Enforcement Staff Depending on Professional Load. *Human Ecology.* 6: 9–14. 2015. (In Russ)].
6. Tyler C.J., Reeve T., Cheung S.S. Cold-induced vasodilation during single digit immersion in 0°C and 8°C water in men and women. *PLoS One.* 10(4): e0122592. 2015.
7. Zimmer P., Buttlar B., Halbeisen G., Walther E., Domes G. Virtually stressed? A refined virtual reality adaptation of the Trier Social Stress Test (TSST) induces robust endocrine responses. *Psychoneuroendocrinology.* 101: 186–192. 2019.
8. Niven D.J., Gaudet J.E., Laupland K.B., Mrklas K.J., Roberts D.J., Stelfox H.T. Accuracy of peripheral thermometers for estimating temperature: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Intern. Med.* 163(10): 768–777. 2015.
9. Raison C.L., Miller A.H. When not enough is too much: The role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders. *Am. J. Psychol.* 160: 1554–1565. 2003.
10. Heim C., Ehler U., Hellhammer D.H. The potential role of hypocortisolism in the pathophysiology of stress-related bodily disorders. *Psychoneuroendocrinology.* 25: 1–35. 2000.
11. Nicolson N., Van Diest R. Salivary cortisol patterns in vital exhaustion. *J. Psychosom. Res.* 49: 335–342. 2000.
12. Wolkowitz O.M., Epel E.S., Reus V.I. Stress hormone-related psychopathology: pathophysiological and treatment implications. *World J. Biol. Psych.* 2: 115–143. 2001.
13. Джабер Маяхи М.Т., Кличханов Н.К. Влияние даларгина на содержание гормонов гипофизарно-надпочечникового и гипофизарно-тиреоидного эндокринного комплексов в крови крыс при гипотермии. *Известия Самарского научн. центра РАН.* 14(5): 273–277. 2012. [Jaber Mayahi M.T., Klichkhanov N.K. Effect of dalargin on pituitary-adrenal and pituitary-thyroid endocrine complex hormones content in the blood of rats during hypothermia. *Izvestia of Samara Scient. Center of the Russian Academy of Sciences.* 14(5): 273–277. 2012. (In Russ)].
14. Davidson J.O., Fraser M., Naylor A.S., Roelfsema V., Gunn A.J., Bennet L. Effect of cerebral hypothermia on cortisol and adrenocorticotrophic hormone responses after umbilical cord occlusion in preterm fetal sheep. *Pediatr. Res.* 63: 51–55. 2008.
15. Mason J.W. A review of psychoendocrine research on the pituitary-adrenal cortical system. *Psychosom. Med.* 30: 576–607. 1968.
16. Dickerson S.S., Kemeny M.E. Acute stressors and cortisol reactivity: A meta-analytic review. *Psychosom. Med.* 54: 105–123. 2002.
17. Lupien S.J., Maheu F., Tu M. The effects of stress and stress hormones on human cognition: Implications for the field of brain and cognition. *Brain Cogn.* 65: 209–237. 2007.

The Relationship Between Hemodynamic Reactions to Cold Stress and Changes of Salivary Cortisol Levels

D. B. Demin*

*Federal Center for Integrated Arctic Research of the Russian Academy of Sciences,
Arkhangelsk, Russia*

*e-mail: denisdemin@mail.ru

An experimental study was conducted with the participation of 30 healthy male volunteers (18–20 years) in order to determine the types of hemodynamic reactions to the general cooling of the body and to determine the severity of cold stress from the dynamics of salivary cortisol levels. The experiment included three 10-minute stages: rest $t = 20^{\circ}\text{C}$; being in a cold chamber $t = -20^{\circ}\text{C}$; warming $t = 20^{\circ}\text{C}$. During each stage, blood pressure (BP), heart rate (HR), temperature in the ear canal were determined, and saliva samples were taken for subsequent determination of free cortisol levels. Volunteers were divided into two groups according to the dynamics of changes in salivary cortisol during cooling: with an increase ($n = 22$) and a decrease ($n = 8$) in the hormone's level. It was shown that during cooling the body temperature of the subjects significantly decreased

by an average of 2.1–2.3°C and did not reach the initial values by the end of the warming stage. In both groups of individuals, when cooling, an increase in BP and a decrease in HR occurred, while in the group with an increase in cortisol, significantly higher levels of systolic BP and a slight decrease in HR were detected. During warming, the hemodynamic indices tended to the initial levels, and the change in the salivary cortisol level was similar to that during cooling. Thus, an increase in the level of salivary cortisol during short-term (10 min) cooling of the human body is associated with severe cold arterial hypertension, a lower baroreflex response, and the risk of cold damage to blood vessels. A decrease in salivary cortisol as a reflection of a decrease in the release of free hormone into the cell during cold stress, in combination with moderate cold arterial hypertension, may indicate a successful adaptation of the body to cold with limited development of hypothermia.

Keywords: cortisol, blood pressure, whole-body cold air exposure, hypothermia

ЦИТИРОВАТЬ:

Дёмин Д.Б. Взаимосвязь между гемодинамическими реакциями на холодовой стресс и изменениями уровня слюварного кортизола. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(8): 994–1001.

DOI: 10.31857/S086981392008004X

TO CITE THIS ARTICLE:

Demin D.B. The Relationship Between Hemodynamic Reactions to Cold Stress and Changes of Salivary Cortisol Levels. Russian Journal of Physiology. 106(8): 994–1001.

DOI: 10.31857/S086981392008004X

РОЛЬ NO и H₂S В РЕГУЛЯЦИИ ТОНУСА ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ СОСУДОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК

© 2020 г. Г. И. Лобов¹, И. Б. Соколова¹, *

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

*E-mail: SokolovaIB@infran.ru

Поступила в редакцию 28.02.2020 г.

После доработки 19.03.2020 г.

Принята к публикации 30.05.2020 г.

Хроническая болезнь почек (ХБП) широко распространена и является фактором риска развития цереброваскулярных заболеваний и неврологических осложнений. К настоящему времени мало известно о процессах, посредством которых ХБП усиливает риск повреждения мозга. В нашем исследовании на модели ХБП у самцов крыс линии Вистар *in vivo* изучались NO- и H₂S-опосредованные изменения клеточных и молекулярных механизмов регуляции тонуса церебральных артерий. ХБП моделировали посредством удаления 5/6 почечной ткани в возрасте 4 мес. Через 4 мес. удаляли часть теменной кости и твердой мозговой оболочки и под микроскопом измеряли диаметр артерий при действии блокаторов и ингибиторов сигнальных путей. У нефрэктомизированных крыс реакции церебральных артерий на аппликацию ацетилхолина проявлялись преимущественно в виде констрикции, тогда как в контрольной группе преобладала вазодилатация. Нитропруссид натрия приводил к дилатации артерий, амплитуда которой у крыс с ХБП была значительно меньше по сравнению с контролем. Метиленовый синий и глибенкламид у крыс с ХБП приводили к незначительному ослаблению реакций на ацетилхолин, в то время как у контрольных крыс дилатация артерий значительно уменьшалась. Степень дилатации церебральных артерий на H₂S у крыс с ХБП была значительно меньше по сравнению с контролем. Пропаргилглицин вызывал слабые изменения диаметра артерий у крыс с ХБП, в то время как в контроле реакции при применении пропаргилглицина были достоверно значимы. Делается заключение, что ХБП способствует ослаблению эндотелий-зависимых и эндотелий-независимых NO- и H₂S-опосредованных дилататорных реакций в церебральных артериях.

Ключевые слова: хроническая болезнь почек, пиальные артерии, NO, H₂S, вазодилатация, вазоконстрикция

DOI: 10.31857/S0869813920080063

В многочисленных исследованиях показано, что хроническая болезнь почек (ХБП), которой страдает 23.4% населения (1–5 стадии) [1], является фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний. Пациенты с ХБП имеют в 15–30 раз более высокий риск этих заболеваний, смертность у пациентов с ХБП 5-й стадии от сердечно-сосудистых заболеваний примерно в 15 раз выше, чем в общей популяции [2]. ХБП является независимым фактором риска развития цереброваскулярных заболеваний, особенно заболеваний мелких сосудов, которые могут проявляться в различных вариантах, начиная от микрокровоизлияний и лакунарных инфарктов и заканчивая болезнями белого вещества, когнитивными нарушениями и

инсультами. Такая ситуация наблюдается не только у пациентов с терминальной стадией почечной недостаточности, но также у пациентов с легкой или умеренной ХБП [3]. Мета-анализ когортных исследований показывает, что ХБП увеличивает риск инсульта на 71–92% [4]. При ХБП на сосудистую стенку действует множество повреждающих факторов: повышенное артериальное давление, повышенный окислительный стресс, гиперфосфатемия, кальцификация, дисфункция тромбоцитов, хроническое воспаление и уремические токсины [5].

Наряду с нейрогенными и гуморальными механизмами эндотелиальные клетки в сосудистой системе мозга, синтезируя вазоактивные вещества, поддерживают необходимый уровень тонуса артерий и артериол и величину церебрального кровотока [6]. Ацетилхолин, брадикинин, АТФ и АДФ активируют рецепторы, расположенные на эндотелии, который, в свою очередь, генерирует различные сигнальные молекулы, влияющие на цереброваскулярный тонус в нормальных условиях и во время болезни. Эндотелиальные клетки секретируют дилататоры: оксид азота (NO), эндотелиальный гиперполяризующий фактор (EDHF) и простаглицлин (PGI₂). Имеются данные, свидетельствующие о том, что в нормальных условиях в крупных мозговых артериях преобладает высвобождение NO, тогда как EDHF более важен в мелких артериях и артериолах. Производимый эндотелием PGI₂ не вносит значительного вклада в цереброваскулярный тонус покоя у здоровых взрослых в нормальных условиях [7].

Известно, что за образование NO из L-аргинина в физиологических условиях ответственна эндотелиальная синтаза оксида азота (eNOS) [8]. В ряде публикаций показано, что в процессе контроля мозгового кровообращения EDHF дополняет NO, продуцируемый эндотелием, в особенности в мелких сосудах [9]. Полагают, что при патологических состояниях активация EDHF может компенсировать дисфункцию в системе NO для поддержания мозгового кровотока [10]. В ряде работ приводятся данные, доказывающие, что в кровеносных сосудах роль EDHF выполняет H₂S, который гиперполяризует мембрану сосудистых гладкомышечных клеток артерий и приводит к их дилатации [11].

Эндотелиальные клетки регулируют тонус церебральных сосудов посредством взаимодействия с гладкомышечными клетками [12]. При ХБП комплекс различных патологических факторов инициирует и способствует прогрессированию нарушений структуры и функции гладкомышечных клеток церебральных артерий [13].

Целью данной работы было исследование NO- и H₂S-опосредованной регуляции тонуса церебральных артерий у крыс с моделью ХБП.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена на животных из “Коллекции лабораторных млекопитающих разной таксономической принадлежности” Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Исследования проводились в соответствии с регламентом, установленным Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях и рекомендациями биоэтической комиссии Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Эксперименты проведены на крысах-самцах линии Вистар ($n = 35$). Животных содержали в стандартных условиях вивария при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище. В начале эксперимента возраст животных составлял 3 мес., масса 250–280 г; в конце эксперимента – 7 мес. и 400–500 г соответственно. Все хирургические и экспериментальные действия были проведены на животных, наркотизированных внутривенно (золетил 20 мг/кг, Virbac, Франция); этаназия проведена путем введения увеличенной дозы наркотического вещества. Для проведения исследования были сформированы две группы животных: 1 – нефрэк-

томированные крысы ($n = 17$, артериальное давление (АД) 159 ± 3.5 мм рт. ст.), 2 – ложнооперированные крысы ($n = 18$, АД 117 ± 1.5 мм рт. ст.). Распределение животных по группам в начале эксперимента было проведено методом случайной выборки. Нефрэктомия (НЭ) у крыс проводили по описанной ранее методике [14] в 2 этапа: на первом этапе удаляли 2/3 части левой почки, на втором – правую почку полностью. Контролем служили ложнооперированные крысы, которые подвергались аналогичному оперативному вмешательству, но без удаления почечной ткани.

Через 4 мес. после операций проводили прижизненное исследование реакций пиальных артерий сенсомоторной коры головного мозга на воздействие vasoактивных веществ. Для этого у наркотизированных крыс в теменной области черепа высверливали отверстие ($S \approx 1 \text{ см}^2$), твердую мозговую оболочку в пределах отверстия удаляли, тем самым открывая поле сенсомоторной коры 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), температура раствора составляла 38°C. На протяжении всего эксперимента контролировали среднее АД инвазивным методом через катетер в бедренной артерии, соединенный с датчиком DTXPlus™ (Argon Critical Care Systems, Сингапур), с помощью компьютерной программы, разработанной в нашей лаборатории. АД животных в течение всего эксперимента оставалось примерно на одном уровне. Температуру тела животного поддерживали на уровне 38°C. Визуализацию пиальных артерий (при общем увеличении оптической системы 160 крат) проводили с помощью оригинальной установки, включающей в себя стереоскопический микроскоп MC-2ZOOM (Микромед, Россия), цветную камеру-видеоокуляр для микроскопа DCM-510 (Scopetek, Китай) и персональный компьютер.

У экспериментальных крыс все исследованные пиальные артерии были разбиты на группы по исходным диаметрам: более 80, 60–80, 40–60, 20–40 и менее 20 мкм. У каждого экспериментального животного было исследовано более 20 сосудов. В начале эксперимента у каждого животного измеряли диаметр пиальных артерий (у нефрэктомизированных крыс $n = 530$; у ложнооперированных $n = 455$) в стандартных условиях при непрерывном орошении поверхности мозга раствором Кребса. Затем у этих же крыс измеряли диаметр тех же сосудов при аппликации на поверхность мозга раствора различных веществ, активирующих или ингибирующих внутриклеточные сигнальные пути: ацетилхолин (Acetylcholine chloride, Sigma-Aldrich, 0.1 мкМ), метиленовый синий (Methylene blue, Sigma-Aldrich, 10 мкМ), нитропруссид натрия (Sodium nitroprusside, Sigma-Aldrich, 10 мкМ), гидросульфид натрия (Sodium hydrosulfide monohydrate, Sigma-Aldrich, 30 мкМ), L-NAME (N(ω)-nitro-l-arginine methyl ester, Sigma-Aldrich, 100 мкМ), пропаргилглицин (D-Propargylglycine, Sigma-Aldrich, 5 мМ), индометацин (Indomethacin, Sigma-Aldrich, 100 мкМ), глибенкламид (Glybenclamide, Sigma-Aldrich, 10 мкМ), пинацидил (Pinacidil monohydrate, Sigma-Aldrich, 200 мкМ). Применяемые вещества растворяли перед экспериментом в растворе Кребса. Индометацин, глибенкламид и пинацидил предварительно растворяли в диметилсульфоксиде (DMSO) и перед воздействием необходимого количества концентрата добавляли в физиологический раствор. Концентрация DMSO в конечном растворе не превышала 0.1%. Ранее проведенные исследования показали, что DMSO в такой концентрации не оказывает влияния на тонус церебральных артерий.

Проверка выборки на нормальность распределения и математическая обработка полученных данных проведена с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel 2003 и программы InStat 3.02 (GraphPad Software Inc., США). Данные представлены в виде среднего арифметического значения и его ошибки. Сравнение средних данных независимых выборок при нормальном характере распределения вариант в совокупности данных (выборке) рассчитывали при помощи t -критерия Стьюдента. При распределении вариант в выборке, отличном от нормального, при

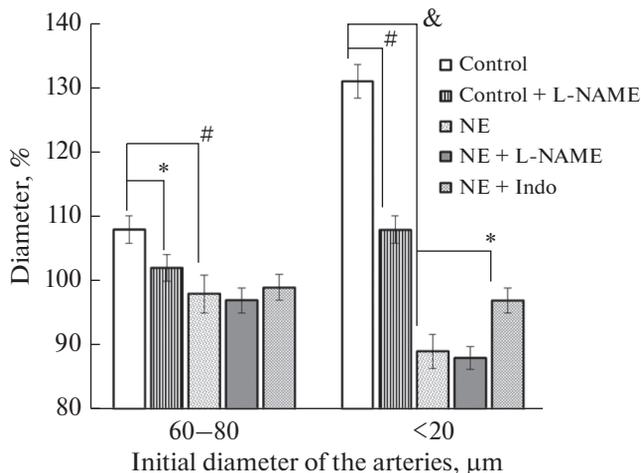


Рис. 1. Изменения диаметра крупных (60–80 мкм) и мелких (<20 мкм) пиальных артерий при действии ацетилхолина. Контроль – ложнооперированные крысы, NE – нефрэктомированным крысы, L-NAME – ингибитор синтазы NO, Indo – индометацин. Исходный диаметр артерий принят за 100%. * – $p < 0.05$; # – $p < 0.01$; & – $p < 0.001$.

Fig. 1. Changes in the diameter of large (60–80 microns) and small (<20 microns) pial arteries under the action of acetylcholine. Control – false-operated rats, NE – nephrectomized rats, L-NAME – NO-synthase inhibitor, Indo – indomethacin. The initial diameter of the arteries is taken as 100%. * – $p < 0.05$; # – $p < 0.01$; & – $p < 0.001$.

сравнении двух групп применяли U-критерий Манна–Уитни. Достоверным уровнем отличий считали вероятность не менее 95% ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С целью исследования эндотелий-зависимой дилатации пиальных артерий в физиологических условиях в раствор, омывающий поверхность мозга, вводили ацетилхолин, широко применяемый для стимуляции синтазы NO. У ложнооперированных животных ацетилхолин приводил к дилатации 50–80% пиальных артерий: диаметр крупных артерий (60–80 мкм) увеличился на $8.2 \pm 1.3\%$, мелких (<20 мкм) – на $31.1 \pm 2.2\%$. У нефрэктомированных крыс аппликация ацетилхолина сопровождалась вазоконстрикцией в среднем у 80% исследованных артерий. Максимальное уменьшение размеров наблюдалось в артериях диаметром менее 40 мкм. С целью выяснения возможной роли простаноидов в развитии вазоконстрикции в физиологический раствор добавляли индометацин. Предварительная аппликация индометацина привела к уменьшению констрикторной реакции артерий на ацетилхолин (рис. 1).

Вторая серия опытов по исследованию эндотелий-зависимой NO-опосредованной дилатации церебральных артерий заключалась в предварительной аппликации на поверхность мозга L-NAME (неселективный ингибитор NO-синтазы) и последующем воздействии ацетилхолина. Действие L-NAME приводило у ложнооперированных животных к выраженной констрикции пиальных артерий, максимальная констрикция наблюдалась в мелких артериях (уменьшение диаметра составило $23 \pm 1.6\%$). Действие ацетилхолина на фоне L-NAME сопровождалось увеличением диаметра (рис. 1). У нефрэктомированных крыс реакции церебральных артерий на применение L-NAME отличались от таковых у контрольных животных, умень-

шение диаметра было менее выраженным. Максимальные различия были зарегистрированы в мелких артериях (разница в амплитуде вазоконстрикции крыс контрольной группы и нефрэктомированных крыс составила около 12%). Применение ацетилхолина на фоне действия L-NAME приводило к незначительной констрикции артерий (рис. 1)

В следующей серии экспериментов оценивали эндотелий-независимую вазодилатацию. С этой целью в физиологический раствор добавляли нитропруссид натрия, являющийся донором NO. Нитропруссид натрия оказывал выраженный дилататорный эффект на пиальные артерии крыс. В группе ложнооперированных крыс увеличение диаметра крупных артерий при действии нитропруссида натрия составило $31.4 \pm 3.6\%$, а в мелких — $93.4 \pm 7.7\%$. У нефрэктомированных крыс реакция на нитропруссид натрия была менее выраженной (диаметр крупных артерий увеличился на $19.8 \pm 2.1\%$, а мелких — на $49.6 \pm 3.8\%$).

Затем проводили исследование функциональной активности сигнальной цепочки: растворимая гуанилатциклаза (рГЦ) → циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ) → → АТФ-чувствительные K^+ -каналы в гладкомышечных клетках пиальных артерий крыс. У ложнооперированных животных применение метиленового синего (ингибитор рГЦ) приводило к констрикции всех артерий. Реакции крупных артерий ложнооперированных и нефрэктомированных крыс на метиленовый синий и на ацетилхолин на фоне метиленового синего не имели достоверных отличий. В мелких артериях (диаметром <20 мкм) контрольных животных под влиянием метиленового синего диаметр уменьшился на 19.3%, добавление ацетилхолина привело к уменьшению констрикции. Реакции мелких артерий нефрэктомированных крыс при действии метиленового синего отличались от таковых в группе ложнооперированных — их диаметр уменьшился на $14.2 \pm 1.8\%$. При добавлении ацетилхолина в раствор с метиленовым синим развивалась дополнительная вазоконстрикция (рис. 2).

В следующей серии опытов исследовали роль АТФ-чувствительных K^+ -каналов гладкомышечных клеток в реализации эффектов ацетилхолина. АТФ-чувствительные K^+ -каналы блокировали глибенкламидом [15]. Применение глибенкламида на протяжении 10 мин привело у контрольных животных к достоверному уменьшению диаметра всех пиальных артерий (на 8–15%). Действие ацетилхолина на фоне глибенкламида у ложнооперированных животных сопровождалось дилатацией всех артерий, однако степень расширения была значительно меньше по сравнению с эффектом ацетилхолина в физиологическом растворе. У нефрэктомированных крыс аппликация глибенкламида сопровождалась слабой вазоконстрикцией. Действие ацетилхолина на фоне глибенкламида приводило к недостоверным изменениям диаметра крупных артерий и уменьшению диаметра мелких артерий.

Второй вариант изучения роли АТФ-чувствительных K^+ -каналов гладкомышечных клеток церебральных артерий в регуляции их тонуса заключался в применении пинацидила (активатор АТФ-чувствительных K^+ -каналов). Пинацидил приводил к выраженной дилатации церебральных артерий как ложнооперированных, так и нефрэктомированных крыс. Степень расширения крупных и мелких артерий нефрэктомированных крыс на пинацидил была достоверно ниже по сравнению с таковой у ложнооперированных животных. Максимальная дилатация была зарегистрирована в мелких артериях ложнооперированных крыс — $38.3 \pm 2.6\%$ от исходного диаметра.

После NO вторым по важности газотрансммиттером, регулирующим различные физиологические функции, является сероводород (H_2S). В нашем исследовании в качестве донора H_2S мы использовали гидросульфит натрия (NaHS) в концентрации 30 мкМ. При растворении в воде NaHS быстро гидролизуетеся с образованием H_2S . Аппликация NaHS на поверхность мозга приводила к дилатации церебральных

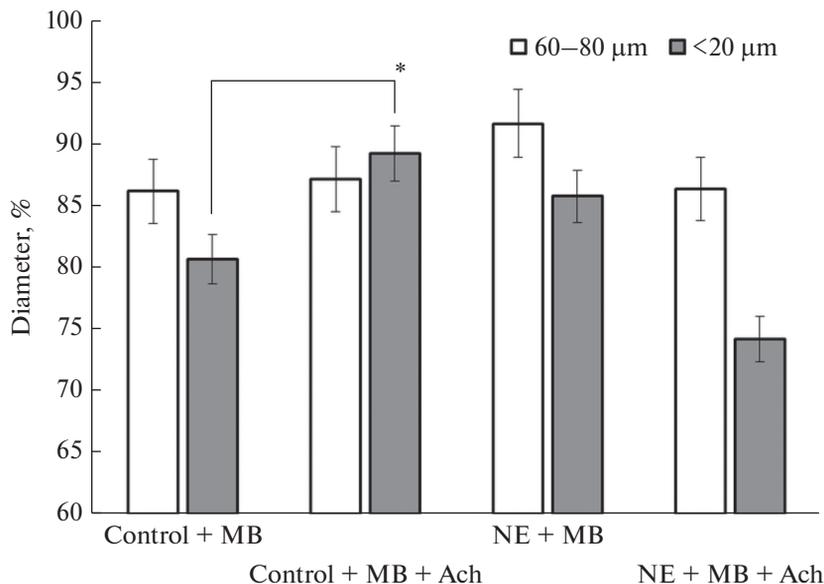


Рис. 2. Изменения диаметра крупных (60–80 мкм) и мелких (<20 мкм) пиальных артерий при действии метиленового синего (MB) и ацетилхолина (Ach). Контроль – ложнооперированные крысы, NE – нефрэктомизированные крысы. Исходный диаметр артерий принят за 100%. * – $p < 0.05$.

Fig. 2. Changes in the diameter of large (60–80 μm) and small (<20 μm) pial arteries under the action of methylene blue (MB) and acetylcholine (Ach). Control – false-operated rats, NE – nephrectomized rats. The initial diameter of the arteries is taken as 100%. * – $p < 0.05$.

артерий как в контрольной группе, так и у нефрэктомизированных крыс. Увеличение диаметра крупных пиальных артерий при аппликации NaHS составило $9.7 \pm 0.7\%$, а мелких (диаметром менее 20 мкм) – $35.4 \pm 2.2\%$. Аналогичное воздействие на пиальные артерии нефрэктомизированных крыс также сопровождалось их дилатацией, однако амплитуда дилатации была меньшей во всех группах артерий. Увеличение диаметра крупных артерий составило $3.3 \pm 0.4\%$, увеличение диаметра мелких артерий – $10.2 \pm 0.9\%$ (рис. 4).

В последние годы проведено довольно много исследований, в которых изучалось взаимодействие NO и H₂S в различных тканях, в том числе и в сосудах. Мы оценили взаимодействие NO и H₂S в церебральных артериях крыс. С этой целью ингибировали продукцию NO посредством аппликации L-NAME. На фоне L-NAME действие H₂S у крыс приводило к увеличению диаметра крупных церебральных артерий на $4.1 \pm 0.4\%$, мелких – на $11.4 \pm 0.8\%$. У нефрэктомизированных крыс изменения диаметра при действии H₂S на фоне L-NAME составили $+2.1 \pm 0.4\%$ и $+5.6 \pm 0.6\%$ соответственно (рис. 4).

В заключительной серии опытов исследовали возможность образования эндогенного H₂S в стенке церебральных артерий у ложнооперированных и нефрэктомизированных крыс. С этой целью в физиологический раствор, апплицируемый на поверхность мозга, добавляли пропаргилглицин (ППГ), являющийся ингибитором цистатион-γ-лиазы (CSE) – фермента, продуцирующего H₂S в сосудистой стенке. Действие ППГ не приводило к достоверным изменениям диаметра крупных пиальных артерий контрольных и нефрэктомизированных крыс. Уменьшение

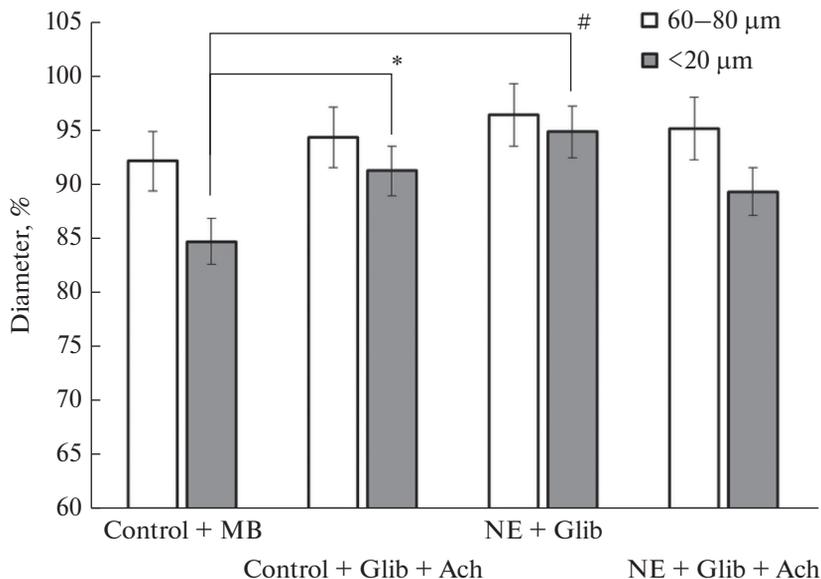


Рис. 3. Изменения диаметра крупных (60–80 мкм) и мелких (<20 мкм) пиальных артерий при действии глибенкламида (Glib) и ацетилхолина (Ach) на фоне глибенкламида. Контроль – ложнооперированные крысы, NE – нефрэктомированные крысы. Исходный диаметр артерий принят за 100%. * – $p < 0.05$; # – $p < 0.01$.

Fig. 3. Changes in the diameter of large (60–80 μm) and small (<20 μm) pial arteries under the action of glibenclamide (Glib) and acetylcholine (Ach) against the background of glibenclamide. Control – false-operated rats, NE – nephrectomized rats. The initial diameter of the arteries is taken as 100%. * – $p < 0.05$; # – $p < 0.01$.

диаметра мелких артерий под действием ППГ у контрольных животных составило $9.3 \pm 1.1\%$, у нефрэктомированных – $3.7 \pm 0.6\%$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В регуляции мозгового кровотока принимают участие нейрогенные, гуморальные, а также эндотелий-зависимые и эндотелий-независимые локальные механизмы. Поток крови зависит не только от расширения артериол, непосредственно переходящих в капиллярное русло, но также от расширения более крупных артерий [16]. Имеются экспериментальные данные, доказывающие, что эндотелий церебральных артерий может играть главную роль в проведении дилататорного ответа вдоль сосудистого русла от мелких артерий к более крупным [17]. Синтез и выделение NO эндотелиальными клетками является одним из основных факторов местной регуляции тонуса церебральных артерий и мозгового кровотока [18, 7]. В нашем исследовании мы изучали NO- и H₂S-опосредованные механизмы регуляции тонуса церебральных артерий у крыс с моделью ХБП. В процессе работы мы измеряли диаметры всех пиальных артерий, но в данной публикации представлены результаты исследования только крупных артерий (диаметром 60–80 мкм), которые выполняют преимущественно функцию коллекторов, и мелких (диаметром менее 20 мкм), осуществляющих резистивную функцию в сложной сосудистой сети мозга [19]. Результаты исследования показали, что ацетилхолин, являющийся классическим активатором эндотелиальной NO-синтазы [20], оказывает преимущественно дилататорный эффект на пиальные артерии крыс контрольной группы,

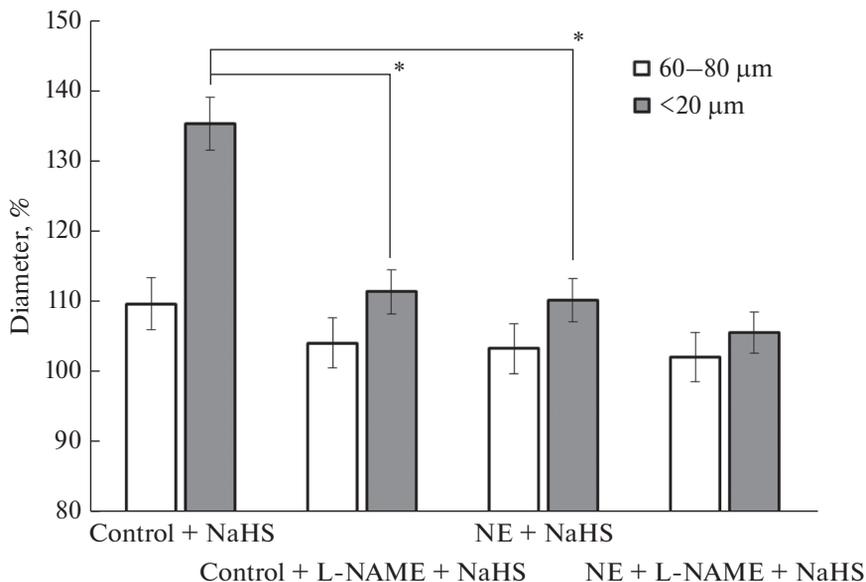


Рис. 4. Изменения диаметра крупных (60–80 мкм) и мелких (<20 мкм) пиальных артерий при действии гидросульфида натрия (NaHS) и гидросульфида натрия на фоне L-NAME. Контроль – ложнооперированные крысы, NE – нефрэктомизированные крысы. За 100% принят исходный диаметр артерий (первая и третья пара столбиков) и диаметр артерий после воздействия L-NAME (вторая и четвертая пара столбиков). * – $p < 0.01$.

Fig. 4. Changes in the diameter of large (60–80 μm) and small (<20 μm) pial arteries under the action of sodium hydrosulfide (NaHS) and sodium hydrosulfide against the background of L-NAME. Control – false-operated rats, NE – nephrectomized rats. The initial diameter of the arteries (the first and third pair of columns) and the diameter of the arteries after exposure to L-NAME (the second and fourth pair of columns) are taken as 100%. * – $p < 0.01$.

при этом максимальная дилатация была зарегистрирована в мелких артериях (рис. 1). Предварительная аппликация L-NAME значительно уменьшала или полностью подавляла дилататорный ответ артерий на ацетилхолин, это свидетельствует о том, что основным фактором, способствующим дилатации пиальных артерий крыс в физиологических условиях, является NO. У нефрэктомизированных крыс реакция большинства артерий на ацетилхолин проявлялась в виде констрикции. В крупных артериях (82% от исследованных) степень уменьшения диаметра была минимальной и часто недостоверной, в мелких артериях (73% от исследованных) в среднем составляла $11.3 \pm 0.8\%$ от исходного диаметра. Также мы показали, что ингибитор NO-синтазы – L-NAME у нефрэктомизированных крыс не приводит к достоверным изменениям диаметра. Эти данные свидетельствуют о том, что у нефрэктомизированных животных в церебральных артериях происходит ингибирование NO-синтазы.

Отсутствие ацетилхолин-индуцируемой дилатации в большинстве церебральных артерий объясняется ингибированием NO-синтазы, но в этих артериях у нефрэктомизированных крыс при действии ацетилхолина была зарегистрирована вазоконстрикция. Механизм констрикции церебральных артерий нефрэктомизированных крыс на ацетилхолин пока не изучен. Мы предположили возможное участие метаболитов арахидовой кислоты в активации сокращений гладкомышечных клеток. Мы ингибировали циклооксигеназу индометацином и на фоне индометацина апплицировали ацетилхолин. Предварительное введение индометацина не оказы-

вало значимых эффектов в крупных церебральных артериях нефрэктомированных крыс, а в мелких — приводило к уменьшению амплитуды или подавлению вазоконстрикции. Мы предполагаем, что в констрикции мелких артерий нефрэктомированных крыс при действии ацетилхолина принимают участие простаноиды, обладающие констрикторными свойствами, в частности, 20-НЕТЕ, являющийся мощным вазоконстриктором. Так, при обследовании пациентов с прогрессирующей ХБП было выявлено значительное увеличение концентрации 20-НЕТЕ в различных органах и, в частности, в стенке кровеносных сосудов. Авторы исследования установили, что под влиянием уремических токсинов метаболизм арахидоновой кислоты смещается в пользу СYP4F2, активность которого приводит к образованию избыточного количества 20-НЕТЕ [21].

Применение донора NO — нитропруссид натрия показало, что и в крупных и в мелких артериях развивается выраженная эндотелий-независимая дилатация. При этом диаметр мелких артерий увеличивался в среднем на $93.4 \pm 5.2\%$. У нефрэктомированных крыс дилататорная реакция церебральных артерий на нитропруссид натрия была значительно слабее (увеличение диаметра мелких артерий составило в среднем $47.6 \pm 2.7\%$ от исходного уровня). Значительное ослабление дилататорных реакций на экзогенный NO в церебральных артериях нефрэктомированных крыс свидетельствует о нарушениях в сигнальном пути (или в сократительном механизме) в гладкомышечных клетках артерий этих животных. Мы предположили, что в гладкомышечных клетках артерий нефрэктомированных крыс нарушена сигнальная цепочка рГЦ—цГМФ—АТФ-чувствительные K^+ -каналы (протеинкиназа G).

С целью исследования сигнального пути, активируемого NO в гладкомышечных клетках церебральных артерий (растворимая гуанилатциклаза (рГЦ) → циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ) → АТФ-чувствительные K^+ -каналы), мы применяли метиленовый синий, являющийся ингибитором рГЦ. Действие метиленового синего на церебральные артерии контрольных крыс проявлялось в виде констрикции (диаметр крупных артерий уменьшился на $13.8 \pm 1.6\%$, мелких — на $19.3 \pm 1.5\%$). Применение ацетилхолина на фоне метиленового синего не приводило к значимым изменениям диаметра церебральных артерий ложнооперированных крыс. Реакции крупных и мелких церебральных артерий нефрэктомированных крыс не отличались от реакций артерий ложнооперированных животных. Применение ацетилхолина на фоне метиленового синего в мелких артериях привело к дополнительной констрикции (диаметр уменьшился на $25.8 \pm 2.1\%$). Сравнение данных показывает, что в мелких артериях нефрэктомированных крыс механизмы дилатации ослаблены, преобладает констрикция. Экспериментальное ингибирование одного из механизмов вазодилатации (NO → рГЦ → цГМФ) сопровождается у нефрэктомированных крыс выраженной констрикцией. Это, вероятно, связано с тем, что и другие механизмы вазодилатации (простаглицлин- и ЭГФ-опосредованные), которые в норме в значительной степени компенсируют дефицит NO [22, 23], функционируют недостаточно эффективно. Об ингибировании механизмов дилатации при уремии свидетельствует также отмеченный выше факт, что ацетилхолин-индуцируемая вазодилатация, выявляемая у контрольных животных в физиологических условиях, сменяется у нефрэктомированных животных на ацетилхолин-индуцируемую вазоконстрикцию.

Мы также исследовали роль АТФ-чувствительных K^+ -каналов гладкомышечных клеток в дилатации церебральных артерий у контрольных и нефрэктомированных крыс. Было установлено, что аппликация глибенкламида, являющегося блокатором АТФ-чувствительных K^+ -каналов, сопровождается констрикцией артерий в обеих группах животных, при этом степень сужения у контрольных животных была значительно больше по сравнению с нефрэктомированными. Эти дан-

ные показывают, что АТФ-чувствительные K⁺-каналы гладкомышечных клеток в физиологических условиях принимают участие в снижении тонуса церебральных артерий, по-видимому, будучи активированными спонтанно продуцируемым NO (сигнальная цепочка: NO → рГЦ → цГМФ → АТФ-чувствительные K⁺-каналы). Ранее при исследовании функций NO в артериях различных органов у разных животных было показано, что у здоровых животных эндотелий постоянно продуцирует NO, высвобождение которого может возрасть при действии различных физических и химических факторов [24, 25]. Накопление уремиических токсинов у нефрэктомированных животных приводит к ингибированию NO-синтазы, уменьшению количества продуцируемого ею NO и ослаблению активации АТФ-чувствительных K⁺-каналов клеток. Также есть основания полагать, что у нефрэктомированных крыс снижена плотность АТФ-чувствительных K⁺-каналов на мембране гладкомышечных клеток церебральных артерий или их чувствительность к вазоактивным веществам (в наших экспериментах в мелких артериях нефрэктомированных крыс реакция на пинацидил (активатор АТФ-чувствительных K⁺-каналов) была достоверно меньше по сравнению с реакцией артерий контрольных животных). Ранее при исследовании изолированных колец брыжеечных артерий нефрэктомированных крыс также были выявлены нарушения механизмов вазодилатации, которые авторы объясняют действием уремиических токсинов на АТФ-чувствительные K⁺-каналы мембраны гладкомышечных клеток артерий [26].

Исследования последнего десятилетия показывают, что в нормальных условиях в различных тканях животных и человека образуется H₂S, который играет важную роль в регуляции деятельности многих систем и органов [27]. В частности, в сердечно-сосудистой системе H₂S образуется в гладкомышечных клетках, эндотелиальных клетках сосудов и кардиомиоцитах и обладает антиоксидантными, антиапоптотическими, противовоспалительными и вазоактивными свойствами [28]. Имеются данные о том, что нарушения в образовании и биодоступности H₂S является важным показателем повреждения эндотелиальных клеток и эндотелиальной дисфункции [28, 29]. У пациентов с ХБП и у животных с моделью ХБП выявлено снижение концентрации H₂S в биологических жидкостях [30, 31]. Добавление доноров сероводорода приводит к повышению сероводорода в плазме крови и повышению активности eNOS, что сопровождается снижением АД и улучшением функции почек [32]. В нашем исследовании мы изучали реакции церебральных артерий контрольных и нефрэктомированных крыс на экзогенный H₂S, механизмы его действия на артерии и возможность образования эндогенного H₂S в стенке артерий. Мы применяли NaHS в концентрации 30 мкМ, поскольку ранее было показано, что концентрация H₂S в плазме крови крыс разных линий составляет 10–46 мкМ [33]. Было установлено, что донор H₂S — NaHS приводил к дилатации большинства изученных церебральных артерий. Максимальная дилатация была зарегистрирована в мелких артериях, их диаметр увеличился в среднем на 36.2 ± 1.9%. У нефрэктомированных крыс увеличение диаметра мелких артерий при действии H₂S составило 10.2 ± 1.1%.

В последние годы появляется все больше свидетельств того, что H₂S и NO не являются независимыми регуляторами, но имеют перекрывающиеся сигнальные пути трансдукции. H₂S и NO не только влияют на биосинтез друг друга, но также производят новые виды сигнальных молекул посредством химического взаимодействия [34]. Хорошо известно, что H₂S может увеличивать активность eNOS и, следовательно, последующую продукцию NO непосредственно или через сигнальный путь АМПК/Акт. В эндотелиальных клетках H₂S увеличивает образование NO в два

раза посредством активации eNOS [35]. Есть данные, что H₂S может усиливать активность eNOS путем S-сульфгидратации. Известно, что NO вырабатывается только димерами eNOS. H₂S способствует образованию димера eNOS для увеличения образования NO. В свою очередь, NO повышает активность и экспрессию CSE, что ведет к усилению выработки H₂S [29, 36]. Однако в литературе имеются и другие данные о взаимодействии H₂S и NO. Так, при исследовании брыжеечных артерий мышей было показано, что предварительная обработка сосудов H₂S приводила к снижению вазорелаксантного эффекта нитропрусида натрия [37]. Примерно такие же результаты были получены при исследовании аорты крыс [38].

Как было отмечено выше, L-NAME приводил к констрикции церебральных артерий. Максимальное уменьшение диаметра наблюдали в мелких артериях. Добавление H₂S на фоне действия L-NAME вызывало дилатацию сосудов, амплитуда которой была меньше по сравнению с эффектом H₂S в растворе Кребса (рис. 4). Меньший дилататорный эффект H₂S на церебральные артерии при снижении производства NO свидетельствует о том, что часть этого эффекта в физиологических условиях реализуется с участием NO. Ослабление дилатации мелких артерий нефрэктомированных крыс при действии H₂S можно частично объяснить ингибированием у этих животных eNOS и продукцией меньшего количества NO, который необходим для реализации дилататорного эффекта H₂S. Ранее при исследовании эндотелиальных клеток пупочной вены было показано, что H₂S стимулирует выработку NO и защищает эндотелиоциты путем индукции сигнального пути Akt/eNOS [39].

В заключительной серии экспериментов мы оценили способность клеток стенки церебральных артерий продуцировать эндогенный H₂S. Известно, что основными ферментами, образующими в сосудистой стенке H₂S, являются цистатион-γ-лиаза (CSE) и цистатион-β-синтаза (CBS) [40]. В наших опытах мы ингибировали CSE посредством добавления в апплицируемый раствор пропаргилглицина – селективного ингибитора CSE [41]. Было установлено, что пропаргилглицин практически не оказывал влияния на крупные церебральные артерии и приводил к выраженной дилатации мелких артерий у контрольных животных. Уменьшение диаметра мелких артерий у нефрэктомированных крыс было незначительным и часто недостоверным. Полученные данные показали наличие в стенке мелких церебральных артерий крыс CSE и базальной продукции ею H₂S в физиологических условиях. Уремия, характерная для нефрэктомированных животных, ингибирует продукцию H₂S в стенке мелких церебральных артерий крыс.

Мы приходим к заключению, что ХБП способствует ослаблению эндотелий-зависимых и эндотелий-независимых NO- и H₂S-опосредованных дилататорных реакций в церебральных артериях.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Данное исследование выполнено в рамках темы № FMUG-2019-0001, № гос. регистрации – АААА-А18-118050490045-3.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Imtiaz S., Salman B., Qureshi R., Drohlia M., Saudi A.* A review of the epidemiology of chronic kidney disease in Pakistan: A global and regional perspective. *J. Kidney Dis. Transpl.* 29(6): 1441–1451. 2018.
2. *Muntner P., He J., Hamm L., Loria C., Whelton P.* Renal insufficiency and subsequent death resulting from cardiovascular disease in the United States. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13(3): 745–753. 2002.

3. *Chillon J.-M., Massy Z., Stengel B.* Neurological complications in chronic kidney disease patients. *Contrib. Nephrol.* 179: 1–6. 2013.
4. *Toyoda K.* Cerebrorenal interaction and stroke. *Cardiol. Res. Pract.* 179: 1–6. 2013.
5. *Lau W., Huisa B., Fisher M.* The cerebrovascular-chronic kidney disease connection: perspectives and mechanisms. *Transl. Stroke Res.* 8(1): 67–76. 2017.
6. *Hainsworth A., Oommen A., Bridges L.* Endothelial cells and human cerebral small vessel disease. *Brain Pathol.* 25(1): 44–50. 2015.
7. *Faraci F.* Role of endothelium-derived relaxing factor in cerebral circulation: large arteries vs. microcirculation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 261: H1038–H1042. 1991.
8. *Atochin D., Demchenko I., Astern J., Boso A., Piantadosi C., Huang P.* Contributions of endothelial and neuronal nitric oxide synthases to cerebrovascular responses to hyperoxia. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 23: 1219–1226. 2003.
9. *You J., Johnson T., Marrelli S., Bryan R.* Functional heterogeneity of endothelial P2 purinoceptors in the cerebrovascular tree of the rat. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 277: H893–H900. 1999.
10. *Marrelli S.* Altered endothelial Ca²⁺ regulation after ischemia/reperfusion produces potentiated endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated dilations. *Stroke.* 33: 2285–2291. 2002.
11. *Tang G., Yang G., Jiang B., Ju Y., Wu L., Wang R.* H₂S is an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Antioxid. Redox Signal.* 19(14): 1634–1646. 2013.
12. *Hill R., Tong L., Yuan P., Murikinati S., Gupta S., Grutzendler J.* Regional blood flow in the normal and ischemic brain is controlled by arteriolar smooth muscle cell Contractility and not by capillary pericytes. *Neuron.* 87(1): 95–110. 2015.
13. *Alesutan I.* Augmentation of phosphate-induced osteo-/chondrogenic transformation of vascular smooth muscle cells by homoarginine. *Cardiovasc. Res* 110(3): 408–418. 2016.
14. *Смирнов А.В., Добронравов В.А., Неворотин А.И., Хохлов С.Е., Сиповский В.Г., Барабанова В.В., Чегу С.Г., Жлоба А.А., Блашко Э.Л.* Гипергомостемия усугубляет повреждение нефрона при экспериментальной хронической почечной недостаточности. *Нефрология.* 9(4): 67–74. 2005. [*Smirnov A.V., Dobronravov V.A., Nevorotin A.I., Khokhlov S.E., Sipovskiy V.G., Barabanova V.V., Chegu S.G., Zhloba A.A., Blashko E.L.* Hyperhomocyst Greedyemia aggravates nephron damage in experimental chronic renal failure. *Nephrology.* 9(4): 67–74. 2005. (In Russ)].
15. *Bonev A., Nelson M.* ATP-sensitive potassium channels in smooth muscle cells from guinea pig urinary bladder. *Am. J. Physiol.* 264(5 Pt 1): 1190–1200. 1993.
16. *Segal S.* Communication among endothelial and smooth muscle cells coordinates blood flow control during exercise. *News Physiol. Sci.* 7: 152–156. 1992.
17. *Horiuchi T., Dietrich H., Hongo K., Dacey R.* Mechanism of extracellular K⁺-induced local and conducted responses in cerebral penetrating arterioles. *Stroke.* 33: 2692–2699. 2002.
18. *Iadecola C.* Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 5: 347–360. 2004.
19. *Avolio A., Kim M., Adji A., Gangoda S., Avadhanam B., Tan I., Butlin M.* Crebral haemodynamics: effects of systemic arterial pulsatile function and hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* 20(3): 20–25. 2018.
20. *Han J., Chen Z., He G.* Acetylcholine- and sodium hydrosulfide-induced endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization in cerebral vessels of global cerebral ischemia-reperfusion rat. *J. Pharmacol. Sci.* 121(4): 318–326. 2013.
21. *Afshinnia F., Zeng L., Byun J., Wernisch S., Deo R., Chen J., Hamm L., Miller E., Rhee E., Fischer M., Sharma K., Feldman H., Michailidis G., Pennathur S.* Elevated lipoxigenase and cytochrome P450 products predict progression of chronic kidney disease. *Nephrol. Dial Transplant.* 35(2): 303–312. 2020.
22. *Yada T., Shimokawa H., Tachibana H.* Endothelium-dependent hyperpolarization-mediated vasodilatation compensates nitric oxide-mediated endothelial dysfunction during ischemia in diabetes-induced canine coronary collateral microcirculation in vivo. *Microcirculation.* 25(5): e12456. 2018.
23. *Mokhtar S., Vanhoutte P., Leung S., Yusof M., Wan Sulaiman W., Mat Saad A., Suppian R., Rasool A.* Endothelium dependent hyperpolarization-type relaxation compensates for attenuated nitric oxide-mediated responses in subcutaneous arteries of diabetic patients. *Nitric Oxide.* 53: 35–44. 2016.
24. *Bohlen H.* Nitric oxide and the cardiovascular system. *Compar. Physiol.* 5(2): 808–823. 2015.
25. *Giles T., Sander G., Nossaman B., Kadowitz P.* 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. 2012.
26. *Kalliovalkama J., Jolma P., Tolvanen J., Kõhonen M., Hutri-Köhönen N., Saha H., Tuorila S., Moilanen E., Pursti I.* Potassium channel-mediated vasorelaxation is impaired in experimental renal failure. *Am. J. Physiol.* 277(4): H1622–H1629. 1999.

27. *Чертюк В.М., Коцюба А.Е.* Эндотелиальный (интимный) механизм регуляции мозговой гемодинамики: трансформация взглядов. Тихоокеанский мед. журн. 2: 17–26. 2012. [Chertok V.M., Kotsyuba A.E. Endothelial (intimal) mechanism of cerebral hemodynamics regulation: changing views. Pacific Med. J. 2: 17–26. 2012. (In Russ)].
28. *Kanagy N., Szabo C., Papapetropoulos A.* Vascular biology of hydrogen sulfide. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 312(5): C537–C549. 2017.
29. *Sun H., Wu Z., Nie X., Bian J.* Role of endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the link between inflammation and hydrogen sulfide. Front. Pharmacol. 10: 1568. 2020.
30. *Perna A., Lanza D., Sepe I., Di Nunzio A., Conzo G., Satta E., Capasso G., Ingrosso D.* Vasodilatation caused by endogenous hydrogen sulfide in chronic renal failure. J. Ital. Nefrol. 30(2): 18–25. 2013.
31. *Perna A., Luciano M., Ingrosso D., Raiola I., Pulzella P., Sepe I., Lanza D., Violetti E., Capasso R., Lombardi C., De Santo N.* Hydrogen sulfide, the third gaseous signaling molecule with cardiovascular properties, is decreased in hemodialysis patients. J. Ren. Nutr. 20(5): S11–S14. 2010.
32. *Pushpakumar S., Kundu S., Sen U.* Hydrogen sulfide protects hyperhomocysteinemia-induced renal damage by modulation of caveolin and eNOS interaction. Sci. Rep. 9(1): 2223. 2019.
33. *Wang R.* The gasotransmitter role of hydrogen sulfide. Antioxidants & Redox Signal. 5(4): 493–501. 2003.
34. *Testai L., D'Antongiovanni V., Piano I., Martelli A., Citi V., Duranti E., Viridis A., Blandizzi C., Gargini C., Breschi M., Calderone V.* Different patterns of H₂S/NO activity and cross-talk in the control of the coronary vascular bed under normotensive or hypertensive conditions. Nitric Oxide. 47: 25–33. 2015.
35. *Predmore B., Julian D., Cardounel A.* Hydrogen sulfide increases nitric oxide production from endothelial cells by an Akt-dependent mechanism. Front. Physiol. 2: 104–108. 2011.
36. *Wu D., Hu Q., Zhu D.* An Update on Hydrogen Sulfide and Nitric Oxide Interactions in the Cardiovascular System. Oxid Med. Cell Longev. 2018: 4579140. 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/4579140>
37. *Tang G., Yang G., Jiang B., Ju Y., Wu L., Wang R.* H₂S is an endothelium-derived hyperpolarizing factor. Antioxidants & Redox Signal. 19(14): 1634–1646. 2013.
38. *Ali M., Ping C., Mok Y., Ling L., Whiteman M., Bhatia M., Moore IP.* Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new role for endogenous hydrogen sulphide? Br. J. Pharmacol. 149(6): 625–634. 2006.
39. *Xiao L., Dong J., Teng X., Jin S., Xue H., Liu S., Guo Q., Shen W., Ni X., Wu Y.* Hydrogen sulfide improves endothelial dysfunction in hypertension by activating peroxisome proliferator-activated receptor delta/endothelial nitric oxide synthase signaling. J. Hypertens. 36(3): 651–665. 2018.
40. *Szjörty I., Marky L., Filipovic M., Miljkovic J., Tabeling C., Tsvetkov D., Wang N., Rabelo L., Witzgenrath M., Diedrich A., Tank J., Akahoshi N., Kamata S., Ishii I., Gollasch M.* Cystathionine γ -Lyase-Produced Hydrogen Sulfide Controls Endothelial NO Bioavailability and Blood Pressure. Hypertension. 71(6): 1210–1217. 2018.
41. *Wang M., Hu Y., Fan Y., Guo Y., Chen F., Chen S., Li Q., Chen Z.* Involvement of hydrogen sulfide in endothelium-derived relaxing factor-mediated responses in rat cerebral arteries. J. Vasc. Res. 53(3–4): 172–185. 2016.

Role of NO and H₂S in the Regulation of the Tone of Cerebral Vessels in Chronic Kidney Disease

G. I. Lobov^a and I. B. Sokolova^{a, *}

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

^{*}*e-mail: SokolovaIB@infran.ru*

Chronic kidney disease (CKD) is a widely spread condition that is a risk factor for the development of cerebrovascular diseases and neurological complications. Currently the mechanisms by which CKD increases the risk of brain damage are poorly understood. In our study, NO- and H₂S-mediated changes in the cellular and molecular mechanisms of cerebral artery tone regulation were investigated in male Wistar rats in vivo with a CKD model. CKD was modeled by removal of 5/6 renal tissue at 4 months of age. After 4 months, part of the parietal bone and the dura mater were removed, and the diameter of the arteries was measured under the action of blockers and signaling pathway inhibitors using a microscope. In nephrectomized rats, the reactions of cerebral arteries to the application of acetylcholine (AH) manifested mainly in the form of constriction, while

vasodilation predominated in the control group. Sodium nitroprusside led to a dilatation of the arteries, the amplitude of which in rats with CKD was significantly lower compared to the control group. Methylene blue and glibenclamide in rats with CKD led to a slight weakening of reactions to ACh, while in control group rats, the dilatation of arteries was significantly reduced. The degree of dilatation of cerebral arteries on H₂S in rats with CKD was significantly less compared to rats in the control group. Propargylglycine caused only slight changes in artery diameter of CKD rats, while in the control group the reaction to propargylglycines was statistically significant. We conclude that the CKD attenuates endothelium-dependent and endothelium-independent NO- and H₂S-mediated dilator reactions in cerebral arteries.

Keywords: chronic kidney disease, pial arteries, NO, H₂S, vasodilation, vasoconstriction

ЦИТИРОВАТЬ:

Лобов Г.И., Соколова И.Б. Роль NO и H₂S в регуляции тонуса церебральных сосудов при хронической болезни почек. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(8): 1002–1015.

DOI: 10.31857/S0869813920080063

TO CITE THIS ARTICLE:

Lobov G.I., Sokolova I.B. Role of NO and H₂S in the Regulation of the Tone of Cerebral Vessels in Chronic Kidney Disease. Russian Journal of Physiology. 106(8): 1002–1015.

DOI: 10.31857/S0869813920080063

СТЕПЕНЬ АКТИВАЦИИ ГЕМОПОЭЗА С ПОМОЩЬЮ СУММАРНОЙ РНК ЗАВИСИТ ОТ СПОСОБА ЕЕ ПАРЕНТЕРАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ

© 2020 г. Н. В. Тишевская¹*, Н. М. Геворкян²

¹Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия

²Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
Москва, Россия

*E-mail: natalya-tishevskaya@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.03.2020 г.

После доработки 06.04.2020 г.

Принята к публикации 17.04.2020 г.

В работе исследовали эффекты стимулирующей гемопоэза суммарной РНК при подкожном (п/к), внутримышечном (в/м), внутрибрюшинном (в/б), внутривенном (в/в) и интраназальном (и/н) способах введения. Суммарную РНК выделяли из лимфоидных клеток селезенки здоровых крыс через 17 ч после кровопотери. В качестве модели угнетенного эритропоэза использовалась бензолная анемия. Через 28 сут после первой инъекции бензола крысам различными способами вводили РНК. При в/б, в/в и и/н введении в крови крыс с бензолной анемией уже на 7-е сутки в 1.5–2 раза увеличилось количество ретикулоцитов и тромбоцитов, количество лейкоцитов в группах с в/в и и/н введением увеличилось в 1.4–1.6 раза. К 14-ым суткам количество ретикулоцитов в группах с в/б, в/в и и/н введением увеличилось в 2–2.6, количество лейкоцитов – в 1.6, тромбоцитов – в 1.4–1.6 раза. На 21-е сутки в указанных группах количество ретикулоцитов было выше контроля в 3–4, лейкоцитов – в 1.4, тромбоцитов – в 1.5–1.7 раза. На 21-е сутки появился эффект от в/м введения РНК: количество ретикулоцитов увеличилось в 2, а количество тромбоцитов – в 1.2 раза. На 21-е сутки у крыс исследовали миелограммы. При всех способах введения РНК, кроме п/к, в костном мозге достоверно увеличилось количество базофильных, полихроматофильных и эозинофильных эритробластов, а также количество мегакариоцитов. Количество миелобластов, промиелоцитов, миелоцитов и лимфоцитов увеличилось в костном мозге крыс только при в/б, в/в и и/н способах введения. Таким образом, наилучшими способами введения суммарной РНК оказались в/б, в/в и и/н. При в/м введении стимулирующий гемопоэз эффект появился только к 21-ым суткам. П/к введение суммарной РНК было неэффективным.

Ключевые слова: РНК, лимфоцит, гемопоэз, регенерация

DOI: 10.31857/S0869813920080099

С развитием регенерационной медицины особое значение приобретают научные направления, связанные с изучением факторов, влияющих на морфогенез, и с поиском новых средств, модулирующих пролиферацию, дифференцировку и созревание клеток. Одним из центральных звеньев регуляции роста и развития тканей является лимфоидная система. Морфогенетическая функция Т-лимфоцитов реализуется не только путем синтеза этими клетками гормонов и тканевых факторов роста [1, 2], но и посредством межклеточного информационного обмена, связанного с переносом молекул РНК [3]. Многими исследователями доказана способ-

ность экзогенных суммарных РНК к регуляции различных процессов в организме [4–6], причем в сравнении с результатом введения цельных клеток, активность выделенной из этих клеток суммарной РНК оказывается существенно выше [7]. Ранее нами были получены данные о том, что суммарная РНК лимфоидных клеток селезенки и периферической крови стимулирует гемопоэз у животных с посттрансфузионной полицитемией и бензолной анемией [8, 9].

При изучении морфогенетических свойств молекул РНК в экспериментах *in vivo* и при разработке новых РНК-содержащих биологически активных препаратов необходимо знать, какие пути введения вещества в организм будут наиболее эффективны, а при каких тестируемые вещества могут потерять свою биологическую активность. В экспериментальной физиологии используется множество парентеральных способов введения веществ лабораторным животным, однако у каждого биологически активного вещества есть свои особенности протекания первых этапов кинетики – всасывания, транспорта, связывания с молекулами-переносчиками и т.д. Целью настоящей работы явилось сравнение выраженности стимулирующего гемопоэза действия лимфоцитарной суммарной РНК при введении ее в организм животных наиболее распространенными в лабораторной практике путями (подкожно, внутримышечно, внутривенно, внутривенно), а также определение возможности использования интраназального способа введения суммарной РНК.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа была выполнена на 36 нелинейных крысах-самцах (сток Вистар) массой 200–210 г с токсической гипопластической анемией и 15 нелинейных крысах-самцах (сток Вистар) массой 220–250 г, из лимфоидных клеток селезенки которых выделяли суммарную РНК. Исследование проведено в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями о соблюдении биоэтических норм этического комитета ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России. Животные содержались в экспериментально-биологической клинике Южно-Уральского государственного медицинского университета в соответствии с правилами СП 2.2.1.3218 и Директивой 2010/63/EU по охране животных, используемых в научных целях: в стандартных клетках из поликарбоната (по 6 крыс в каждой клетке), в условиях свободного доступа к воде, при температуре воздуха 24–25°C. Ежедневный рацион животных состоял из специализированного гранулированного корма, соответствующего по содержанию питательных веществ, витаминов и минералов международным стандартам и ГОСТ Р 50258-92 (Комбикорма полнорационные для лабораторных животных). Все манипуляции с животными производили под эфирным наркозом, эвтаназию грызунов осуществляли путем цервикальной дислокации, также проводимой под эфирным наркозом.

Для моделирования гипопластической анемии 36 крысам трижды (с интервалом в 7 сут) подкожно вводили равную по объему смесь химически чистого бензола (Камская химическая компания, Россия) в дозе 0.05 мл/100 г массы животного и стерильного подсолнечного масла (ТОО Жайик-AS, Казахстан) в дозе 0.05 мл/100 г массы животного [10]. На 28-е сутки после первой инъекции бензола у животных были исследованы показатели периферической крови, после чего случайным образом они были разделены на 6 групп (по 6 крыс в каждой группе). В этот же день 5 группам животных была введена суммарная РНК. Оставшиеся 6 крыс составили контрольную группу.

В работе использовалась стимулирующая гемопоэз суммарная РНК лимфоидных клеток селезенки. С целью ее получения 15 здоровым интактным крысам была произведена кровопотеря в объеме 2% от массы тела (после ампутации кончика предварительно прогретого хвоста собирали вытекающую из раны кровь). Через

17 ч после кровопотери животные были подвергнуты эвтаназии. Лимфоциты выделяли путем суспендирования ткани селезенки в стеклянном гомогенизаторе с фильтрацией через капроновый фильтр и последующим 3-х кратным отмыванием клеток стерильным 0.9%-ным раствором NaCl. Суммарную РНК выделяли в стерильных условиях методом гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформной экстракции. Концентрация выделенной РНК определялась спектрофотометрическим методом по оптической плотности препарата при длине волны 260 нм.

Суммарную РНК вводили подопытным крысам различными способами через 7 суток после последней инъекции бензола. При введении РНК использовали метод стерилизующей фильтрации (стерильные шприцевые насадки с диаметром пор 0.22 мкм). Доза РНК в каждом случае составляла 20 мкг/100 г массы, объем вводимого раствора во всех случаях кроме интраназального способа введения составлял 0.5 мл. При подкожном (п/к) способе введения инъекции производили в область холки, при внутримышечном (в/м) – в мышцы бедра, при внутрибрюшинном (в/б) – в нижний правый квадрант области живота, при внутривенном (в/в) – в хвостовую вену. Интраназальное (и/н) введение осуществляли с помощью механического дозатора, животным закапывали по 25 мкл в каждый носовой ход. Крысам контрольной группы суммарную РНК не вводили.

На 7-е, 14-е и 21-е сутки после введения РНК в крови животных определяли число форменных элементов. Количество эритроцитов и лейкоцитов подсчитывали в камере Горяева, количество тромбоцитов – в окрашенном по Романовскому-Гимза мазке крови (метод Фонио), количество ретикулоцитов – в мазке крови, окрашенном бриллиантовым крезиловым синим.

На 21-е сутки животные были выведены из эксперимента с целью изучения состояния костномозгового кроветворения. В мазках костного мозга, окрашенных по Романовскому-Гимза, определяли процентное содержание эритроидных, лимфоидных, мегакариоцитарных и молодых миелоидных клеток. В каждом мазке подсчитывалось 500 клеток костного мозга.

Статистическая обработка результатов была выполнена с помощью компьютерной программы IBM SPSS Statistics 19,0. Сравнения групп проводились методами непараметрической статистики с использованием критериев Манна-Уитни и хи-квадрат. Для выявления наиболее эффективных способов введения суммарной РНК был применен центроидный метод иерархической кластеризации с последующим построением дендрограммы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что бензол обладает выраженным миелотоксическим действием, и даже при его однократном введении в костном мозге возникает гипоплазия всех ростков кроветворения [11]. В нашем эксперименте после трехкратного введения бензола количество ретикулоцитов у крыс снизилось в 4.8, лейкоцитов – в 3.3, тромбоцитов – в 4.2 раза, т.е. в периферической крови появились явные признаки угнетения гемопоэза. При этом число зрелых эритроцитов не отличалось от показателей здоровых животных, поскольку эти клетки циркулируют в крови 90–110 дней, и периферическое звено эритрона в указанном временном промежутке (28 сут после первой инъекции токсиканта) еще не отреагировало на бензольную интоксикацию. Таким образом, к моменту введения РНК у подопытных крыс развилась токсическая гипопластическая анемия.

Через 7 сут после п/к или в/м введения РНК количество форменных элементов крови оставалось низким и не отличалось от контрольных значений (табл. 1). У крыс, которым РНК вводилась в/б, в/в или и/н, число ретикулоцитов в среднем увеличилось в 2 раза, а число тромбоцитов – в 1.4 раза. В/в и и/н пути введения

Таблица 1. Динамика количества форменных элементов крови у крыс с бензольной анемией при различных способах введения суммарной РНК**Table 1.** The dynamics of blood cells number in rats with benzene anemia with various methods of administration total RNA.

Пути введения Administration	Ретикулоциты ($\times 10^9/\text{л}$) Reticulocytes	Эритроциты ($\times 10^{12}/\text{л}$) Erythrocytes	Лейкоциты ($\times 10^9/\text{л}$) Leukocytes	Тромбоциты ($\times 10^9/\text{л}$) Platelets
7-е сутки (Day 7)				
Контроль The control	6.6 \pm 0.3	5.6 \pm 0.1	2.43 \pm 0.04	84.0 \pm 1.8
Подкожное Subcutaneous	6.0 \pm 0.4	5.7 \pm 0.1	2.4 \pm 0.1	86.6 \pm 2.3
Внутримышечное Intramuscular	7.4 \pm 0.2	5.7 \pm 0.2	2.5 \pm 0.1	86.8 \pm 2.7
Внутрибрюшинное Intraperitoneal	13.0 \pm 0.4*	5.8 \pm 0.3	2.8 \pm 0.1	106.2 \pm 2.2*
Внутривенное Intravenous	15.2 \pm 0.4*	5.5 \pm 0.1	3.9 \pm 0.1*	138.6 \pm 3.1*
Интраназальное Intranasal	11.0 \pm 0.5*	5.4 \pm 0.2	3.5 \pm 0.1*	101.0 \pm 3.2*
14-е сутки (Day 14)				
Контроль The control	7.2 \pm 0.4	5.6 \pm 0.1	2.5 \pm 0.1	90.6 \pm 3.5
Подкожное Subcutaneous	6.8 \pm 0.6	5.9 \pm 0.4	2.4 \pm 0.1	93.8 \pm 3.0
Внутримышечное Intramuscular	8.6 \pm 0.3	5.8 \pm 0.1	2.5 \pm 0.1	103.8 \pm 2.7
Внутрибрюшинное Intraperitoneal	18.6 \pm 0.5*	5.9 \pm 0.3	3.9 \pm 0.1*	126.6 \pm 3.0*
Внутривенное Intravenous	19.0 \pm 1.1*	6.0 \pm 0.5	4.0 \pm 0.1*	145.6 \pm 2.6*
Интраназальное Intranasal	14.4 \pm 0.5*	5.8 \pm 0.1	3.8 \pm 0.1*	130.8 \pm 3.6*
21-е сутки (Day 21)				
Контроль The control	7.0 \pm 0.6	5.6 \pm 0.3	2.8 \pm 0.1	105.2 \pm 3.2
Подкожное Subcutaneous	8.0 \pm 0.5	5.8 \pm 0.1	2.6 \pm 0.1	110.0 \pm 2.2
Внутримышечное Intramuscular	15.0 \pm 0.8*	6.0 \pm 0.1	3.2 \pm 0.1	127.4 \pm 2.6*
Внутрибрюшинное Intraperitoneal	27.0 \pm 0.5*	6.1 \pm 0.2	3.8 \pm 0.1*	168.4 \pm 4.1*
Внутривенное Intravenous	28.7 \pm 0.7*	6.0 \pm 0.2	4.2 \pm 0.1*	182.4 \pm 3.3*
Интраназальное Intranasal	21.8 \pm 0.7*	6.2 \pm 0.1	3.9 \pm 0.1*	157.8 \pm 4.0*

* – наличие достоверных различий между показателями контрольных и опытных групп, $p < 0.05$.* – the differences between the control and experimental groups, $p < 0.05$.

Таблица 2. Процентное содержание эритроидных клеток и мегакариоцитов в костном мозге крыс с бензольной анемией через 21 сутки после введения суммарной РНК
Table 2. The percentage of erythroid cells and megakaryocytes in bone marrow of rat with benzene anemia 21 days after the injection of total RNA

Пути введения Administration	Базофильные эритробласты Basophilic erythroblasts	Полихроматофильные эритробласты Polychromatophilic erythroblasts	Оксифильные эритробласты Orthochromatic erythroblasts	Мегакариоциты Megakaryocytes
Контроль The control	1.4 ± 0.1	3.2 ± 0.2	5.4 ± 0.1	0.22 ± 0.03
Подкожное Subcutaneous	1.7 ± 0.2	3.3 ± 0.1	5.6 ± 0.2	0.21 ± 0.01
Внутримышечное Intramuscular	1.9 ± 0.1*	4.4 ± 0.1*	8.2 ± 0.3*	0.84 ± 0.02*
Внутрибрюшинное Intraperitoneal	3.4 ± 0.2*	8.2 ± 0.2*	12.8 ± 0.3*	1.92 ± 0.05*
Внутривенное Intravenous	4.4 ± 0.3*	10.4 ± 0.1*	16.7 ± 0.6*	1.84 ± 0.07*
Интраназальное Intranasal	4.2 ± 0.2*	8.8 ± 0.4*	14.4 ± 0.5*	1.43 ± 0.05*

* – наличие достоверных различий между показателями контрольных и опытных групп, $p < 0.05$.

* – the differences between the control and experimental groups, $p < 0.05$.

РНК привели и к увеличению числа лейкоцитов в периферической крови крыс с бензольной анемией. Через 14 сут после введения РНК эффективность в/б, в/н и и/н путей введения не вызывала сомнений: количество ретикулоцитов, лейкоцитов и тромбоцитов в крови животных этих групп было достоверно выше, чем у контрольных крыс.

На 21-е сутки после в/в и в/б введения РНК количество ретикулоцитов в крови подопытных животных в 4 раза превысило контрольные значения, в группе с и/н введением – в 3 раза. Число лейкоцитов и тромбоцитов у животных этих групп также было достоверно больше, чем в контрольной группе. К 21-ым суткам впервые был зарегистрирован эффект после в/м инъекции РНК: количество ретикулоцитов и тромбоцитов в данной группе стало достоверно больше контрольных значений.

При исследовании влияния суммарной РНК лимфоидных клеток селезенки на гемопоэз у крыс с бензольной анемией было установлено, что эритроидный и мегакариоцитарный ростки кроветворения к 21-ым суткам отреагировали на все пути введения РНК, кроме п/к (табл. 2). При этом в/б, в/в и и/н способы введения РНК оказались в 2–3 раза эффективнее в/м инъекций.

В группах животных, получивших п/к или в/м инъекцию РНК, процентное содержание молодых миелоидных и лимфоидных клеток не отличалось от показателей контрольной группы крыс (табл. 3). Если же суммарная РНК вводилась крысам в/б, в/в или и/н, то в миелограмме был отмечен достоверный прирост количества вышеуказанных клеток.

Увеличение числа лимфоидных клеток в костном мозге, наблюдаемое при введении суммарной РНК лимфоцитов селезенки анемизированных животных заслуживает отдельного внимания, поскольку ранее нами было показано, что именно эти клетки принимают непосредственное участие в регуляции восстановительных морфогенезов в норме и при патологии [3, 8, 9, 12].

Для определения наиболее эффективных способов введения суммарной РНК был проведен кластерный анализ, представляющий собой многомерную статистическую процедуру, объединяющую исходные данные в сравнительно однородные группы (кластеры). Метод выявил, что полученные нами результаты образуют

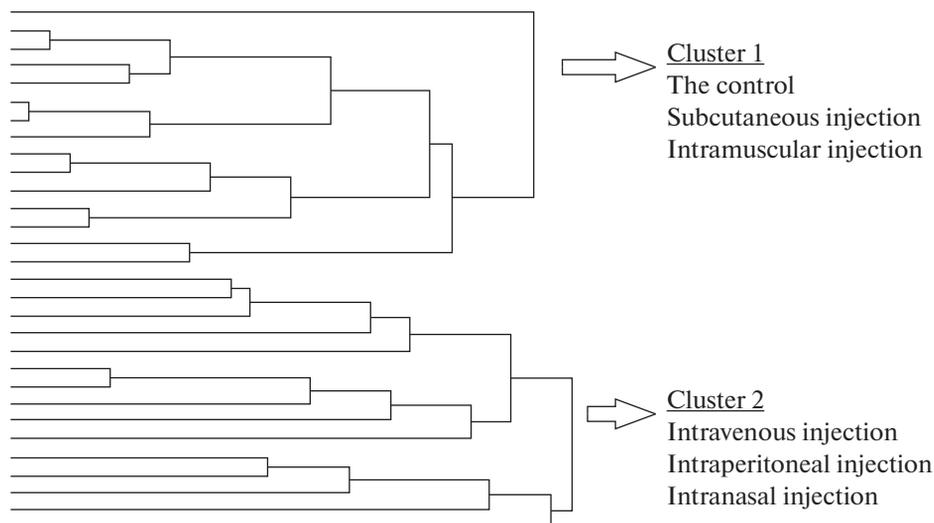


Рис. 1. Результат проведенного кластерного анализа (дендрограмма).

Fig. 1. The result of the cluster analysis (dendrogram).

2 кластера (рис. 1). В первый кластер вошли показатели контрольной группы крыс и групп животных, получивших препарат п/к или в/м. Второй кластер был образован показателями животных, получивших РНК в/в, в/б или и/н.

По совокупности полученных нами результатов самым действенным был в/в способ введения РНК, однако в/б и и/н пути введения оказались не менее эффективными, чем в/в инъекции. В/б введение растворов широко используется в ветеринарной практике и нередко в лечебных учреждениях, поскольку за счет большой площади поверхности и обильной васкуляризации брюшины этот способ характе-

Таблица 3. Процентное содержание миелоидных клеток и лимфоцитов в костном мозге крыс с бензольной анемией через 21 сутки после введения суммарной РНК

Table 3. The percentage of myeloid and lymphoid cells in bone marrow of rats with benzene anemia 21 days after the injection of total RNA.

Пути введения Administration	Миелобласты Myeloblasts	Промиелоциты Promyelocytes	Миелоциты Myelocytes	Лимфоциты Lymphocytes
Контроль The control	0.13 ± 0.05	0.74 ± 0.09	2.1 ± 0.1	6.4 ± 0.3
Подкожное Subcutaneous	0.14 ± 0.06	0.71 ± 0.04	2.3 ± 0.1	6.5 ± 0.4
Внутримышечное Intramuscular	0.16 ± 0.08	0.75 ± 0.05	2.5 ± 0.2	6.8 ± 0.3
Внутрибрюшинное Intraperitoneal	0.82 ± 0.06*	1.23 ± 0.08*	3.9 ± 0.2*	16.6 ± 0.7*
Внутривенное Intravenous	0.85 ± 0.05*	1.35 ± 0.06*	4.1 ± 0.3*	15.6 ± 0.5*
Интраназальное Intranasal	0.69 ± 0.05*	1.28 ± 0.06*	4.1 ± 0.2*	16.4 ± 0.6*

* – наличие достоверных различий между показателями контрольных и опытных групп, $p < 0.05$.

* – the differences between the control and experimental groups, $p < 0.05$.

ризуется быстрой и эффективной абсорбцией. И/н введению веществ в настоящее время уделяют особое внимание, так как оно представляет собой абсолютно не инвазивный способ, обеспечивающий быстрое поступление лекарственных препаратов сначала в мозговой, а затем в системный кровоток. Эффективность данного способа введения обусловлена хорошей васкуляризацией слизистой оболочки носа, малой толщиной и пористостью базальной мембраны эпителия носовой полости, а также большой площадью абсорбции. У крыс с массой тела менее 250 г общая площадь поверхности носовых ходов составляет 10.4 см² [13]. Важно отметить, что продемонстрированная в данной работе эффективность и/н способа введения лимфоцитарной суммарной РНК служит доказательством того, что ее морфогенетическая активность реализуется за счет входящих в ее состав микроРНК [3], поскольку эпителиальный барьер слизистой носовых путей является препятствием для соединений, молекулярная масса которых превышает 1000 Да [14].

Несмотря на сведения о том, что экзогенные нуклеиновые кислоты и олигонуклеотиды быстро проходят через гистогематические барьеры, и даже при конъюнктивальном введении они обнаруживаются в кровотоке уже через 10–15 мин [15], очевидно, что путь введения экзогенных РНК в организм имеет большое значение. В/б, в/в и и/н пути введения позволили лимфоцитарной суммарной РНК в полной мере реализовать свои стимулирующие гемопоэз эффекты, и они были сопоставимы по выраженности действия. П/к инъекция оказалась самым не эффективным способом доставки суммарной РНК в организм животных, а при в/м введении ее стимулирующая гемопоэз активность проявилась лишь к 21-ым суткам, и по совокупности показателей центрального и периферического звеньев кроветворения группа животных с в/м введением существенно “отставала” от групп, получивших РНК в/в, в/б или и/н.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований Государственных академий наук на 2013-2020 годы по теме “Создание клеточных моделей молекулярных процессов в органах и тканях” (НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Козлова Н.И. Роль Т-лимфоцитов в гормональной регуляции морфогенетических процессов. Успехи соврем. биологии. 135(2): 189–202. 2015. [Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M., Kozlova N.I. The role of T-lymphocytes in hormonal regulation of morphogenetic processes. Uspekhi sovremen. biologii. 135(2): 189–202. 2015. (In Russ)].
2. Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Козлова Н.И. Т-лимфоциты и тканевые факторы роста. Рос. физиол. журн. им. Сеченова. 101(8): 865–884. 2015. [Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M., Kozlova N.I. T-lymphocytes and tissue growth factors. Russ. J. Physiol. 101(8): 865–884. 2015. (In Russ)].
3. Тишевская Н.В., Бабаева А.Г., Геворкян Н.М. Роль лимфоцитарных РНК в межклеточном информационном обмене и регуляции регенеративных процессов. Рос. физиол. журн. им. Сеченова. 102(11): 1280–1301. 2016. [Tishevskaya N.V., Babaeva A.G., Gevorkyan N.M. The role of lymphocytic RNA in the intercellular information exchange and in the regulation of regenerative processes. Russ. J. Physiol. 102(11): 1280–1301. 2016. (In Russ)].
4. Смирнов А.В. Специфические эффекты и возможные механизмы действия экзогенных РНК. Успехи соврем. биологии. 106(1): 20–36. 1988. [Smirnov A.V. Specific effects and possible mechanisms of action of exogenous RNA. Uspekhi sovremen. biologii. 106(1): 20–36. 1988. (In Russ)].
5. Vitvitskii V.N., Soboleva L.S., Shevchenko V.A. Cytotoxic and cytogenetic effects of radiation are modulated by introduction of RNAs isolated from various tissues in the organism. Biol. Bull. 27(3): 237–240. 2000.
6. Гоникова З.З., Никольская А.О., Кирсанова Л.А., Шагидулин М.Ю., Онищенко Н.А., Севастьянов В.И. Исследование регенераторной и тканеспецифичной активности общей РНК клеток костного мозга. Вестник трансплантол. и искусствен. органов. 20(3): 64–

69. 2018. [Gonikova Z.Z., Nikolskaya A.O., Kirsanova L.A., Shagidulin M.Yu., Onishchenko N.A., Sevastyanov V.I. Investigation of regenerative and tissue-specific activity of total RNA of bone marrow cells. *Vestnik transplantol. i iskusstven. organov.* 20(3): 64–69. 2018. (In Russ)].
7. Гоникова З.З., Никольская А.О., Кирсанова Л.А., Шагидулин М.Ю., Онищенко Н.А., Севастьянов В.И. Сравнительный анализ эффективности стимуляции процессов регенерации печени клетками костного мозга и общей РНК этих клеток. *Вестник трансплантолог. и искусствен. органов.* 21(1): 113–121. 2019. [Gonikova Z.Z., Nikolskaya A.O., Kirsanova L.A., Shagidulin M.Yu., Onishchenko N.A., Sevastyanov V.I. The comparative analysis of the effectiveness of stimulation of liver regeneration by bone marrow cells and total RNA of these cells. *Vestnik transplantol. i iskusstven. organov.* 21(1): 113–121. 2019. (In Russ)].
8. Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Бабаева А.Г., Захаров Ю.М., Козлова Н.И., Болотов А.А. Влияние суммарной РНК лимфоидных клеток селезенки на эритропоэз при экспериментальной полицитемии. *Рос. физиол. журн. им. Сеченова.* 101(4): 451–461. 2015. [Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M., Babaeva A.G., Zakharov Yu. M., Kozlova N.I., Bolotov A.A. Influence of total RNA splenic lymphoid cells on erythropoiesis in experimental polycythemia. *Russ. J. Physiol.* 101(4): 451–461. 2015. (In Russ)].
9. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Головкина Л.Л., Муратова Ю.О., Рагимов А.А. О гемопоэтических свойствах рибонуклеиновой кислоты лимфоцитов периферической крови больных истинной полицитемией и здоровых доноров. *Онкогематология.* 10(2): 58–62. 2015. [Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Golovkina L.L., Muratova Yu.O., Ragimov A.A. About hematopoietic properties of peripheral blood lymphocytes RNA from patients with polycythemia vera and healthy donors. *Onkogematologia.* 10(2): 58–62. 2015. (In Russ)].
10. Tishevskaya N.V., Bolotov A.A., Lebedeva Y.E. Dynamics of erythropoiesis in erythroblastic islands in the bone marrow in experimental benzene-induced anemia. *Bull. Exp. Biol. Med.* 161(3): 384–387. 2016.
11. Захаров В.Н., Караулов А.В., Соколов В.В., Фраш В.Н. Изменения системы крови при воздействии радиации и бензола. Новосибирск. Наука. 1990. [Zakharov V.N., Karaulov F.V., Sokolov V.V., Frash V.N. Changes in the blood system exposed to radiation and benzene. Novosibirsk. Nauka. 1990. (In Russ)].
12. Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Козлова Н.И. Современный взгляд на роль Т-лимфоцитов в регуляции эритропоэза. *Успехи современ. биологии.* 136(1): 83–96. 2016. [Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M., Kozlova N.I. A modern view of the role of T-lymphocytes in regulation of erythropoiesis. *Uspekhi sovremen. biologii.* 136(1): 83–96. 2016. (In Russ)].
13. Кательникова А.Е., Крышень К.Л., Зуева А.А., Макарова М.Н. Интраназальное введение лекарственных средств лабораторным животным. *Лабор. животные для научных исследований.* 2: 9. 2019 [Katelnikova A.E., Kryshen K.L., Zueva A.A., Makarova M.N. Intranasal introduction to laboratory animals. *Labor. Animals for Science.* 2: 9. 2019 (In Russ)].
14. Illum L. Nasal drug delivery – recent developments and future prospects. *J. Control. Release.* 161(2): 254–263. 2012
15. Власова И.Е., Нечаева М.В., Власов В.В. Системы доставки нуклеиновых кислот в клетки млекопитающих. *Успехи современ. биологии.* 114(6): 715–724. 1994. [Vlasova I.E., Nechaeva M.V., Vlasov V.V. Nucleic acid delivery systems to mammalian cells. *Uspekhi sovremen. biologii.* 114(6): 715–724. 1994. 1988. (In Russ)].

Comparative Analysis of the Effectiveness of Various Routes of Administration of Total RNA

N. V. Tishevskaya^{a, *} and N. M. Gevorkyan^b

^aSouth Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

^bInstitute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

*e-mail: natalya-tishevskaya@yandex.ru

The effects of hematopoiesis-stimulating total RNA were studied with subcutaneous (s/c), intramuscular (i/m), intraperitoneal (i/p), intravenous (i/v) and intranasal (i/n) routes of administration. Total RNA was isolated from the lymphoid cells of the spleens of healthy rats 17 hours after blood loss. Benzene anemia was used as a model of inhibited erythropoiesis. 28 days after the first benzene injection, RNA was administered. After 7 days in i/p, i/v, i/n groups the number of reticulocytes and platelets increased 1.5–2 times, in i/v and i/n groups the number of leukocytes increased 1.4–1.6 times. After 14 days in i/p, i/v, i/n groups the number of reticulocytes increased 2–2.6 times, the number of leukocytes – 1.6 times, platelets – 1.4–1.6 times. After 21 days in these groups, the number of reticulocytes was 3–4 times higher than the control rats, leukocytes – 1.4 times,

platelets – 1.5–1.7 times. After 21 days the effect of the i/m administration of RNA appeared: the number of reticulocytes increased 2 times, the number of platelets – 1.2 times. On 21 days, myelograms were examined. In all groups, except s/c, the number of basophilic, polychromatophilic and orthochromatic erythroblasts, as well as the number of megakaryocytes, significantly increased in the bone marrow. The number of myeloblasts, promyelocytes, myelocytes and lymphocytes increased in the bone marrow only in i/p, i/v, i/n groups. Thus, the best methods for administration of total RNA were i/p, i/v, and i/n routes of administration. In i/m group, the stimulating hematopoiesis effect appeared only by 21 days. S/c administration of total RNA was ineffective.

Keywords: RNA, lymphocyte, hematopoiesis, regeneration

ЦИТИРОВАТЬ:

Тишевская Н.В., Геворкян Н.М. Степень активации гемопоэза с помощью суммарной РНК зависит от способа ее парентерального введения. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 106(8): 1016–1024.

DOI: 10.31857/S0869813920080099

TO CITE THIS ARTICLE:

Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M. Comparative Analysis of the Effectiveness of Various Routes of Administration of Total RNA. Russian Journal of Physiology. 106(8): 1016–1024.

DOI: 10.31857/S0869813920080099

УРЕМИЧЕСКИЙ СИНДРОМ ВЫЗЫВАЕТ НАРУШЕНИЕ
ДЕФОРМАЦИОННО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК
ЭРИТРОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕМОДИАЛИЗА

© 2020 г. Ю. А. Борисов¹, Ю. С. Судницына^{2,3,*}, Т. Д. Власов¹, Л. В. Дульнева¹,
В. О. Аболмасов¹, И. В. Миндукшев³, А. В. Смирнов¹

¹Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

²Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН,
Москва, Россия

³Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: julia.sudnitsyna@gmail.com

Поступила в редакцию 03.03.2020 г.

После доработки 19.04.2020 г.

Принята к публикации 30.05.2020 г.

Хроническая болезнь почек в терминальной, V стадии (ХБП V), сопровождается структурными и функциональными нарушениями эритроцитов, представляющими угрозу их стабильному функционированию, однако механизмы этих явлений недостаточно изучены. Методом лазерной дифракции было исследовано влияние ХБП V и самого сеанса гемодиализа (ГД) на деформационно-функциональные показатели эритроцитов пациентов с ХБП V. ГД сессия не влияла на деформационные характеристики эритроцитов. Однако было показано двухэтапное ухудшение деформационно-функциональных свойств эритроцитов у пациентов с ХБП V: стадия увеличения хрупкости эритроцитов (повышение V_i , снижение T_{max}) у пациентов, находящихся на ХГД до 25 мес. (группа 1), и стадия увеличения ригидности (снижение V_i , увеличение T_{max}) у пациентов, находящихся на хроническом гемодиализе (ХГД) от 25 до 250 мес. (группа 2). В междуализном промежутке было выявлено увеличение концентрации уремических токсинов, приводящее к гиперосмоляльности плазмы (до 330 мОсм/кгH₂O в группе 1 и до 340 мОсм/кгH₂O в группе 2), однако концентрация Na⁺ и глюкозы оставались в пределах нормы. Таким образом, мы показали отсутствие влияния самой ГД сессии, вместе с тем, было выявлено двухэтапное ухудшение деформационных характеристик эритроцитов пациентов с ХБП V, вызванное уремическим синдромом, которое может приводить к почечной анемии и сердечно-сосудистым осложнениям, характерным для пациентов ХГД.

Ключевые слова: хронический гемодиализ, эритроциты, аммонийный стресс, уремия, уремический синдром, лазерная дифракция, азотистый гомеостаз

DOI: 10.31857/S0869813920080038

Хроническая болезнь почек в терминальной, V стадии (ХБП V), характеризуется прогрессирующей утратой почками их функции, сопровождаемой осложнениями и высокой смертностью, в большей степени вызванной сердечно-сосудистыми нарушениями [1]. ХБП V вызывает в организме ряд изменений, нарушающих гомеостаз [2–6]. Одним из таких изменений является нормоцитарная нормохромная

анемия, существенно ухудшающая качество жизни пациентов с ХБП V [7–11]. Одной из основных причин возникновения почечной анемии считается сниженная продукция эритропоэтина [11], однако, сокращение жизненного цикла эритроцитов и уремические токсины также могут играть существенную роль [9, 12–17]. Сокращенный жизненный цикл эритроцитов может быть обусловлен как токсическим влиянием окружающей уремической плазмы на эритроциты [13], так и следствием лечения хроническим гемодиализом (ХГД) [9]. Известно, что помимо снижения общего количества эритроцитов в условиях уремии им присущи многочисленные структурные и функциональные нарушения: сниженная антиоксидантная активность [18, 19], повышенная адгезионная способность к эндотелию и прокоагулянтная активность [20, 21], изменения экспрессии белков плазматической мембраны [13]. Все перечисленные факторы представляют непосредственную угрозу стабильному функционированию эритроцитов [1, 8, 17], однако, механизмы развития этих явлений недостаточно изучены.

Структура и целостность цитоплазматической мембраны эритроцита регулирует вязко-эластичные свойства (деформируемость) клетки, обеспечивающие возможность прохождения сквозь микроциркуляторное русло и имеющие решающее значение для нормального функционирования эритроцитов [13, 22, 23]. Снижение деформируемости может приводить к нарушению микроциркуляции, гемолизу внутри капилляров и преждевременной секвестрации эритроцитов ретикуло-эндотелиальной системой, что также может служить причиной анемии [24–28].

Процесс лечения ХГД сопряжен с компрессией эритроцитов в экстракорпоральном круге кровообращения [4], кровь пациента подвергается физическому и химическому воздействию на протяжении длительного времени [29], что может негативно влиять как на продолжительность жизни эритроцитов, так и на их деформационно-функциональные характеристики [30–33]. Эти данные указывают на возможное усугубление почечной анемии, вызванное лечением ХГД.

Таким образом, при лечении анемии, сопряженной с ХБП V, детальное изучение показателей физико-химических свойств эритроцитов и механизмов воздействия на них травмирующих факторов имеет важное значение для отработки клинических методов коррекции состояния пациентов. До сих пор остается неясным, является ли основным повреждающим фактором уремический синдром или же сам сеанс гемодиализа (ГД).

В представленной работе методом лазерной дифракции в модели аммонийного стресса исследовали влияние ХПБ V и сеанса ГД на деформационно-функциональные показатели эритроцитов. Было выявлено, что сам сеанс ГД не приводит к значимым изменениям деформационных показателей эритроцитов у пациентов ХГД, в то время как продолжительность воздействия уремического синдрома и/или лечения ХГД приводит к двухэтапному нарушению деформационно-функциональных свойств эритроцитов. На первой стадии происходит увеличение хрупкости (до 25 мес. лечения ХГД), а на второй – увеличение ригидности эритроцитов (от 25 до 250 мес. лечения ХГД).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследовали свойства эритроцитов 19 человек без ренальной патологии – доноры (Me 44 года: 30, 49) и 23 пациентов отделения хронического гемодиализа (группа 1 – до 25 месяцев на лечении ХГД, $n = 10$, Me 49 лет: 36, 61; группа 2 – от 25 до 250 мес. на лечении ХГД, $n = 13$, Me 53 года: 36, 67) НИИ Нефрологии ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова до и после ГД сессии. Группа пациентов состояла из больных с ХБП (V стадия), получающих лечение хроническим ГД, из них 11 мужчин и 12 женщин: 5 больных страдали хроническим гломерулонефритом, у 14 отмечался нефроскле-

роз, у двоих — хронический пиелонефрит, у одного больного диагностирован поликистоз и еще у одного — амилоидоз почек. Проведение всех процедур было одобрено этическим комитетом ПСПБГМУ им. акад. И.П. Павлова (протокол № 217 от 17.01.2020) и соответствовало Хельсинкской декларации.

Реактивы. В экспериментах были использованы: изотоническая среда № 1 — HEPES-буфер (в мМ: NaCl 140; KCl 5; HEPES 10; MgCl₂ 2; D-глюкоза 5; EGTA 2; pH 7.4, осмоляльность 300 мОсм/кгH₂O) и изотоническая аммонийная среда № 2 — NH₄⁺-буфер (в мМ: NH₄Cl 140; KCl 5; HEPES 10; MgCl₂ 2; CaCl₂ 1; D-глюкоза 5; pH 7.4, осмоляльность 300 мОсм/кгH₂O) для модели аммонийного стресса. Все реактивы были приобретены в Sigma Aldrich (Германия).

Подготовка суспензии эритроцитов. Кровь доноров и пациентов, после подписания ими письменного согласия, отбирали в вакутейнеры с ЭДТА в качестве антикоагулянта. Эритроциты получали центрифугированием цельной крови (10 мин, 400 g) и ресуспендировали в среде № 1 (RBC = 0.5×10^6 кл/мл, НСТ 5%).

Исследование функциональных характеристик эритроцитов. Изменение деформационно-функциональных показателей эритроцитов исследовали методом лазерной дифракции на анализаторе частиц LaSca-T (Биомедицинские системы, СПб), адаптированном для цитологических исследований [34–36]. Изменение начальной скорости увеличения объема клеток (V_i) характеризовали по данным кинетики прямого светорассеяния в диапазоне угла 1°. Для количественного описания кинетики гемолиза использовали параметры T_{\max} (время достижения максимальной скорости гемолиза) и V_{\max} (максимальная скорость гемолиза). В основе метода — регистрация рассеянного излучения под разными углами с помощью многоэлементного детектора. По полученной зависимости интенсивности рассеянного излучения от угла рассеяния (индикатриса рассеяния) осуществляется расчет размеров частиц и распределения частиц по размерам, таким образом, в каждый момент времени считывается распределение всей популяции по объемам. Для оценки динамики изменения среднего объема клеток (MCV) использовали алгоритм оценки размеров частиц программного обеспечения LaSca_32 v.1498. Методические приемы, использованные в работе, подробно описаны ранее [34–38].

Модель аммонийного стресса. На основании уникального, присущего лишь эритроцитам (среди клеток крови), свойства при помещении в изотоническую аммонийную среду увеличивать клеточный объем до критических значений и лизировать [39–41], нами ранее был разработан аммонийный стресс-тест для характеристики деформационно-функциональных свойств эритроцитов [37, 38]. Для создания модели аммонийного стресса в 7 мл изотонического NH₄⁺-буфера (t 25°C) вносили 20 мкл суспензии эритроцитов (RBC = 0.5×10^6 кл/мл, НСТ = 5%, конечная концентрация 5×10^5 кл/мл), регистрацию показателей светорассеяния проводили до окончания лизиса (рис. 1).

Статистический анализ. Во всех экспериментах данные представлены как Me (25%, 75%). Статистическую значимость результатов определяли с помощью программы SPSS Statistics v.24 непараметрическими методами статистического анализа, используя критерии Манна–Уитни и Краскела–Уоллиса для несвязанных выборок (доноры vs. пациенты группы 1 и 2 до и после ГД; пациенты группы 1 до и после ГД vs. пациенты группы 2 до и после ГД), Уилкоксона для связанных выборок (пациенты до vs. после сеанса ГД). Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

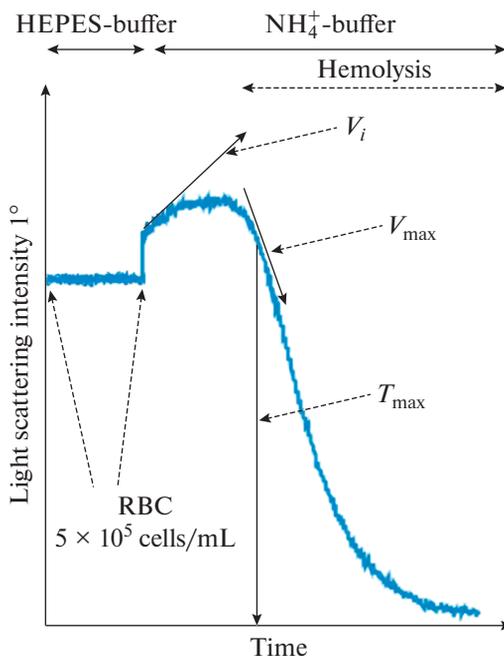


Рис. 1. Графическое определение скорости начального увеличения объема клеток (V_i), максимальной скорости гемолиза (V_{max}) и времени достижения максимальной скорости гемолиза (T_{max}) в модели аммонийного стресса в диапазоне угла 1° при 25°C . В 7 мл изотонического HEPES-буфера вносили суспензию эритроцитов ($\text{RBC } 5 \times 10^5$ кл/мл) в качестве контроля, затем заменяли буфер на NH_4^+ -буфер с добавкой 5×10^5 кл/мл эритроцитов. Регистрировали увеличение сигнала светорассеяния, соответствующее увеличению объема клеток, и последующее снижение сигнала, соответствующее гемолизу (пунктирная линия).

Fig. 1. Graphic determination of the initial velocity of cell swelling (V_i), maximal hemolysis rate (V_{max}) and time to peak hemolysis (T_{max}) in the ammonium stress model (forward scattering at 1° , 25°C). The intensity of scattering light was registered for RBCs (5×10^5 cells/mL) resuspended in 7 mL of isotonic HEPES-buffer and taken as control. Then, the buffer was changed to isotonic NH_4^+ -buffer with 5×10^5 cells/mL RBCs, and the intensity of scattering light was also registered. The initial increase of the light intensity with the following decrease in the light intensity corresponding to cell swelling and hemolysis (dashed line), respectively, are shown.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сеанс ГД не вызывает изменения деформационно-функциональных характеристик эритроцитов пациентов ХГД. Поскольку неизвестно, какой фактор вызывает изменение деформационно-функциональных характеристик эритроцитов пациентов ГД, сам сеанс ГД или уремический синдром, были исследованы V_{max} , T_{max} и V_i пациентов до и после сеанса ГД. Анализ показателей V_{max} , T_{max} и V_i не выявил значимых отличий до и после сеанса ГД как внутри группы 1, так и внутри группы 2 (рис. 2–5).

Уремический синдром, сопровождающий ХБП V, вызывает двухэтапное нарушение деформационно-функциональных свойств эритроцитов. Для выявления влияния ХБП V на деформационно-функциональные показатели эритроцитов исследовали

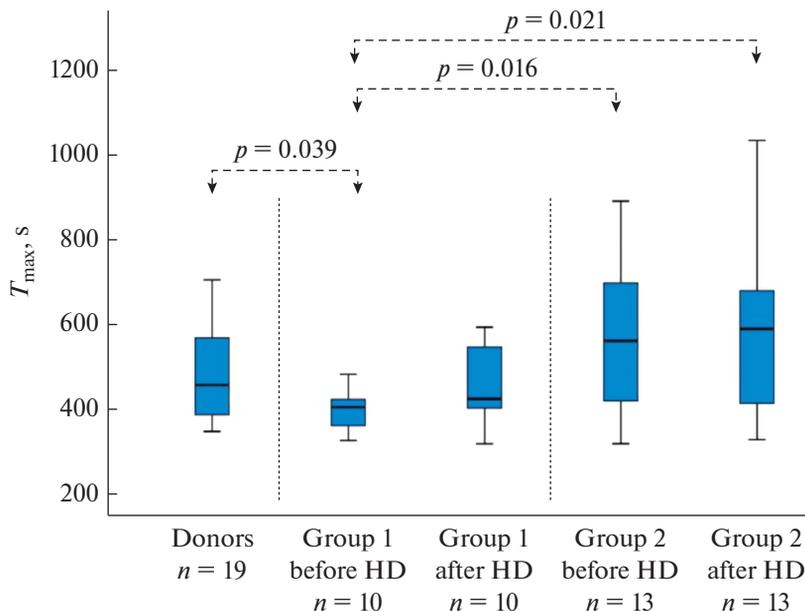


Рис. 2. Сеанс ГД не вызывает значимого изменения T_{max} у пациентов с ХБП V. Время достижения максимальной скорости гемолиза (T_{max}) до и после сеанса ГД не различается (критерий Вилкоксона для связанных выборок), однако, у доноров T_{max} выше, чем у пациентов группы 1 до ГД, при этом этот показатель у группы 1 до ГД значимо ниже, чем у пациентов группы 2 до и после ГД (критерий Манна–Уитни для несвязанных выборок).

Fig. 2. HD session does not affect significantly T_{max} in patients with CKD-V. Time to peak hemolysis rate (T_{max}) before and after the HD session had no differences (Wilcoxon matched pair test) between the groups. At the same time, T_{max} for donors was significantly higher than in patients of Group 1 before HD, and T_{max} for Group 2 before and after the HD session surpassed significantly that for Group №1 before HD (Mann–Whitney U-test).

эритроциты пациентов с ХБП V (группа 1 до/после ГД, группа 2 до/после ГД) в сравнении с эритроцитами контрольной группы без ренальной патологии – доноры.

T_{max} у доноров – 453.6 с (360, 586) была достоверно выше ($p = 0.039$), чем у пациентов группы 1 до ГД – 401.4 с (350.2, 427.5), при этом T_{max} у пациентов группы 1 до ГД – 401.4 с (350.2, 427.5) была достоверно ниже ($p = 0.016$), чем у пациентов группы 2 до ГД – 557.6 с (400.7, 702.0) и чем у пациентов группы 2 после ГД – 586 с (402; 721) (рис. 2).

V_{max} доноров – 0.202 отн.ед. (0.179, 0.240) была достоверно ($p = 0.020$) выше, чем у пациентов группы 2 после ГД – 0.160 отн. ед. (0.127, 0.206) (рис. 3). Сравнение с другими выборками не выявило достоверных отличий.

V_i у доноров – 0.518 отн. ед. (0.386, 0.601) была значимо ($p = 0.010$) ниже, чем у пациентов группы 1 до ГД – 0.611 отн. ед. (0.542, 0.876) и после ГД – 0.633 отн. ед. (0.533, 0.901) (рис. 4). Кроме того, V_i у пациентов группы 1 до ГД – 0.611 отн. ед. (0.542, 0.876) была значимо ($p = 0.047$) выше, чем у пациентов группы 2 до ГД – 0.453 отн. ед. (0.366, 0.760). После ГД V_i группы 1 – 0.633 отн. ед. (0.533, 0.901) была также значимо выше ($p = 0.047$), чем у пациентов группы 2 – 0.516 отн. ед. (0.341, 0.608) (рис. 4).

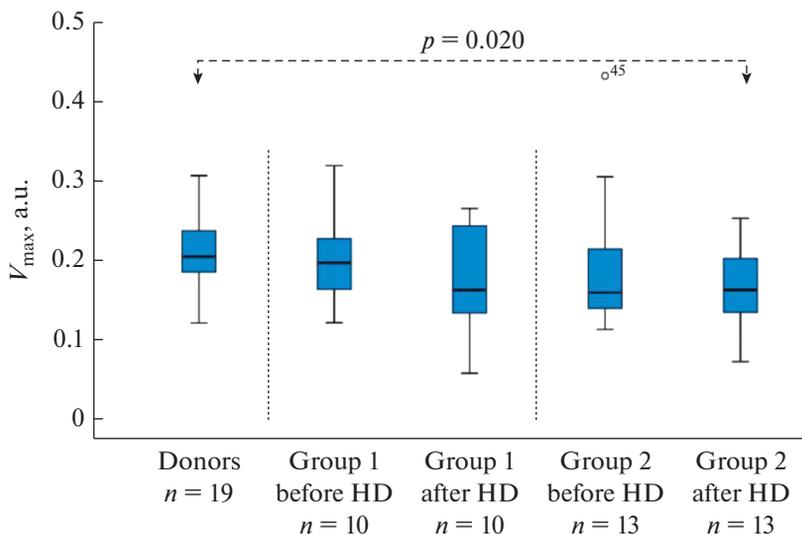


Рис. 3. Сеанс ГД не вызывает значимого изменения V_{\max} у пациентов с ХБП V. Максимальная скорость гемоллиза (V_{\max}) до и после ГД сессии не отличалась (критерий Вилкоксона для связанных выборок), однако, у доноров в сравнении с пациентами группы 2 после ГД V_{\max} достоверно выше (критерий Манна–Уитни для несвязанных выборок).

Fig. 3. HD session does not affect significantly V_{\max} in patients with CKD-V. Maximal rate of hemolysis (V_{\max}) did not differ before and after HD session (Wilcoxon matched pair test) whilst V_{\max} for donors was significantly higher than V_{\max} for patients of Group 2 after HD (Mann–Whitney U-test).

Исследование изменений среднего объема эритроцитов (MCV) не выявило достоверных отличий у пациентов группы 1 и группы 2 до и после сеанса ГД. Однако MCV у доноров – 84.43 фл (81.85, 87.3) был достоверно ($p = 0.017$) ниже, чем у пациентов группы 1 до ГД – 88.59 фл (85.85, 91.92). В аммонийном стресс-тесте объем эритроцитов в среднем увеличивался на 68% (от 84.43 до 129.15 фл) у доноров, на 72% (от 88.59 до 125.4 фл) у пациентов группы 1 до ГД. В остальных группах не наблюдалось значимых различий.

Показатели клинического и биохимического анализа крови пациентов групп 1 и 2 до и после ГД с референсными значениями нормы представлены в табл. 1.

Анализ этих показателей выявил, что концентрация мочевины в плазме группы 1 до ГД была значимо ниже ($p < 0.05$) концентрации мочевины в плазме группы 2 до ГД 29. Суммарная концентрация уремических токсинов (мочевины, мочевой кислоты, креатинина) до ГД поднималась до 30 мМ, что значительно увеличивало расчетную осмоляльность плазмы – до 330 (группа 1 до ГД) и до 340 (группа 2 до ГД) мОсм/кгН₂О при норме – 275–298 мОсм/кгН₂О. У пациентов не отмечалось ни гипернатремии (концентрации Na⁺ была в пределах нормы – 140 мМ в обеих группах), ни гипергликемии (концентрация глюкозы в группе 1 – 4.45 мМ (4.35, 5.08), в группе 2 – 4.3 мМ (3.90, 4.95)). Сеанс ГД снимал уремический синдром, однако показатель уровня мочевины превышал норму в обеих группах даже после ГД сессии.

Полученные результаты указывают на ухудшение деформационно-функциональных свойств эритроцитов пациентов с ХБП V, при этом ухудшение является двухэтапным: стадия увеличения хрупкости эритроцитов (повышение V_i , снижение T_{\max}) пациентов, находящихся на ХГД до 25 месяцев, и стадия увеличения ригидности (снижение V_i , увеличение T_{\max}) у пациентов, находящихся на ХГД от 25

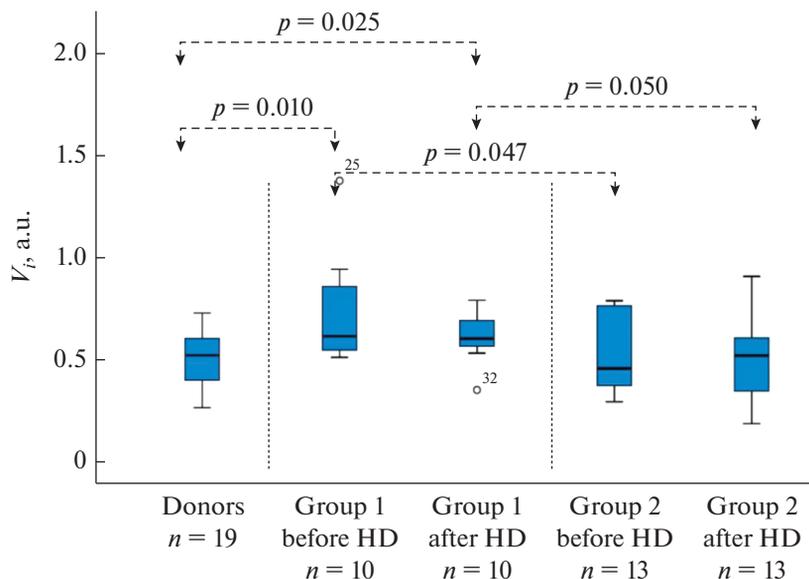


Рис. 4. Сеанс ГД не вызывает значимого изменения V_i у пациентов с ХБП V. Начальная скорость увеличения объема эритроцитов (V_i) не отличалась до и после ГД сессии (критерий Вилкоксона для связанных выборок), однако, у пациентов группы 1 до ГД и после ГД V_i была достоверно выше, чем у пациентов группы 2, кроме того, V_i доноров была достоверно выше, чем у пациентов группы 1 как до, так и после ГД (критерий Манна–Уитни для несвязанных выборок).

Fig. 4. HD session does not affect significantly V_i in patients with CKD-V. The initial rate of cell swelling (V_i) did not differ before and after HD session (Wilcoxon matched pair test), whilst V_i for patients of Group 1 both before and after HD were higher than those for patients of Group 2. Moreover, V_i was significantly higher in donors than in patients of Group 1 before and after HD session (Mann–Whitney U-test).

до 250 мес. Кроме того, гиперосмоляльность плазмы, вызванная повышением концентрации уремических токсинов, в совокупности с самим действием уремических токсинов может приводить к почечной анемии, преждевременно запуская апоптоз эритроцитов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Уремический синдром характеризуется задержкой и аккумуляцией ряда соединений — уремических токсинов, в норме экскретируемых почками. Уремические токсины показывают широкий спектр физико-химических характеристик, механизмов генерации и патофизиологического воздействия на клеточном и молекулярном уровнях [42, 43]. Пациенты с ХБП V подвержены большему риску сердечно-сосудистых осложнений, который увеличивается с ухудшением функции почек, приводя к высокой смертности [13].

У пациентов с ХБП V диагностируют анемию различной степени выраженности, при этом анемия имеет мультифакторное происхождение и преимущественно возникает вследствие недостаточной продукции эритропоэтина в почках наравне с сокращенным жизненным циклом эритроцитов и хроническим воспалением [44]. В норме срок жизни эритроцита составляет 100–120 дней [45], тогда как жизненный цикл эритроцитов у пациентов ХГД снижен до 73 (38, 116) дней [46]. В условиях уремии жизненный цикл эритроцита может быть снижен не только из-за уреми-

Таблица 1. Показатели клинического и биохимического анализа крови пациентов до и после сеанса ГД**Table 1.** Complete blood count and blood chemistry for patients before and after the HD session

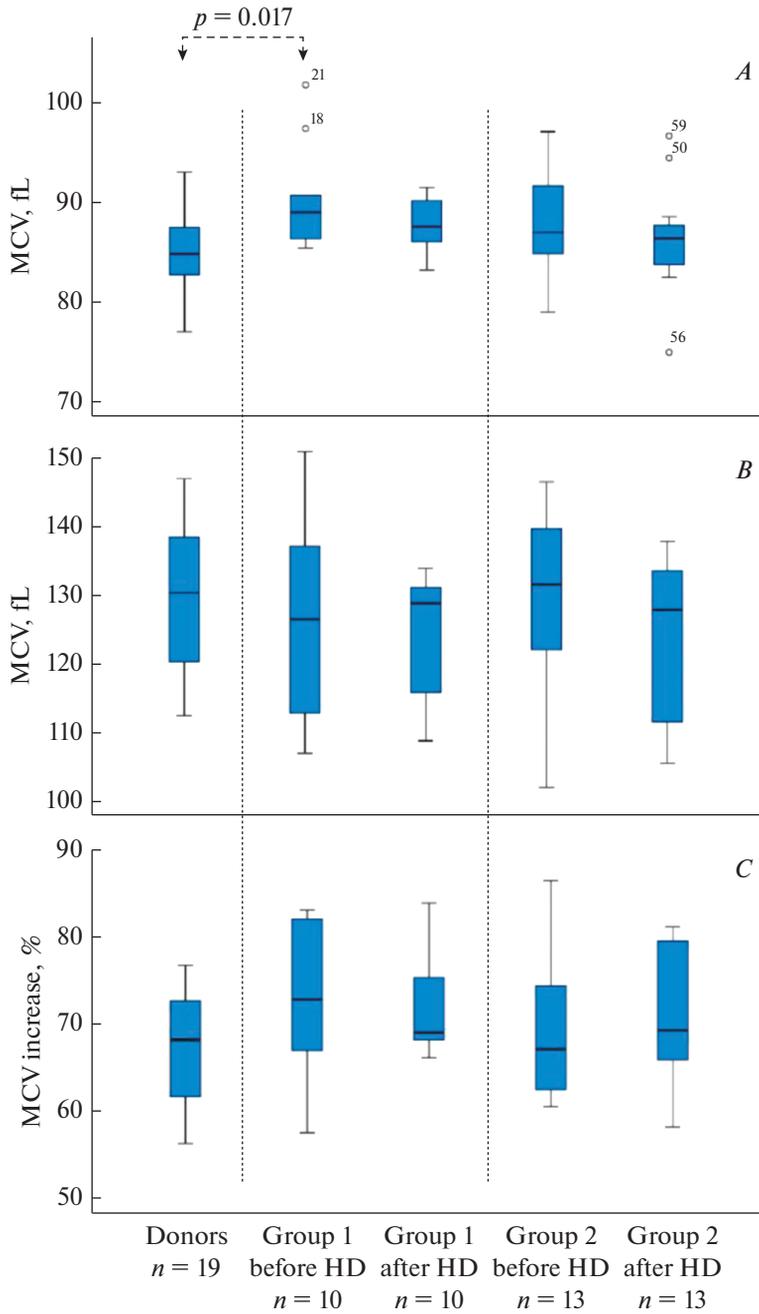
	Возраст, годы Age, years	Время на ГД, месяцы Time on HD, month	RBC*10 ¹² , кл/л RBC*10 ¹² , cells/L	WBC*10 ⁹ , кл/л WBC*10 ⁹ , cells/L	HGB, г/л HGB, g/L	Креатинин, мМ/л Creatinine, mM/L	Мочевина, мМ/л Urea, mM/L	Мочевая к-та, мМ/л Uric acid, mM/L	Натрий, мМ/л Sodium, mM/L	Фосфор, мМ/л Phosphorus, mM/L	Кальций, мМ/л Calcium, mM/L	Калий, мМ/л Potassium, mM/L
Группа 1 до ГД (n = 10) Group 1 before HD (n = 10)	49 (36, 61)	10.5 (5.3, 18.3)	3.09 (2.87, 3.57)	7.2 (6.70, 9.47)	106 (97.75, 113.75)	0.89 (0.67, 1.01)	21.85 (17.60, 25.55)	430 (368, 515)	138 (137, 145)	1.99 (1.83, 2.19)	2.20 (2.03, 2.26)	4.9 (4.70, 5.78)
Группа 1 после ГД (n = 10) Group 1 after HD (n = 10)						0.36** (0.29, 0.39)	7.9* (7.45, 11.18)	109* (108, 179)	140.9 (137.7, 143.5)	1.02* (0.94, 1.14)	2.44* (2.35, 2.51)	3.75** (3.45, 4.10)
Группа 2 до ГД (n = 13) Group 2 before HD (n = 13)	53 (36, 67)	105 (46, 134)	3.2 (2.85, 3.75)	6.5 (4.1, 8.1)	99 (91.5, 112.5)	0.97 (0.89, 1.17)	29.45 [§] (22.7, 36.3)	404 (328.5, 406.5)	138.8 (137.0, 140.8)	2.19 (1.72, 2.48)	2.14 (2.09, 2.44)	5.7 (4.9, 6.1)
Группа 2 после ГД (n = 13) Group 2 after HD (n = 13)						0.36 ^{##} (0.30, 0.47)	8.3 ^{##} (6.75, 12.00)	100.5 [#] (70.3, 154.3)	140 [#] (138.8, 142.7)	1 ^{##} (0.75, 1.08)	2.49 ^{##} (2.36, 2.61)	3.7 ^{##} (3.6, 4.0)
Референсные значения Reference range			3.8–5.7	4.5–11.0	117–173	0.53–1.15	2.1–7.1	208–476	136–145	0.78–1.42	2.10–2.55	3.5–5.1

* $p < 0.05$, критерий Уилкоксона для связанных выборок; ** $p < 0.005$, критерий Уилкоксона для связанных выборок – группа 1 после ГД по сравнению с группой 1 до ГД; [#] $p < 0.05$, критерий Уилкоксона для связанных выборок; ^{##} $p < 0.005$, критерий Уилкоксона для связанных выборок – группа 2 после ГД по сравнению с группой 2 до ГД; [§] $p < 0.05$, критерий Краскела–Уоллиса для независимых выборок – группа 2 до ГД по сравнению с группой 1 до ГД.

* $p < 0.05$, Wilcoxon matched pair test; ** $p < 0.005$, Wilcoxon matched pair test – group 1 after HD vs. group 1 before HD; [#] $p < 0.05$, Wilcoxon matched pair test; ^{##} $p < 0.005$, Wilcoxon matched pair test – group 2 after HD vs. group 2 before HD; [§] $p < 0.05$, Kruskal–Wallis test – group 2 before HD vs. group 1 before HD.

Рис. 5. Сеанс ГД не вызывает значимого изменения MCV у пациентов с ХБП V. *A* – исходные показатели MCV эритроцитов; *B* – показатели максимального увеличения MCV в аммонийном стресс-тесте; *C* – % увеличения объема в аммонийном стресс-тесте по сравнению с исходным MCV. Значимых изменений MCV до и после ГД сессии не выявлено (критерий Вилкоксона для связанных выборок), однако, исходные показатели MCV доноров были достоверно ниже, чем у пациентов группы 1 до ГД (критерий Манна–Уитни для несвязанных выборок).

Fig. 5. HD session does not affect significantly MCV in patients with CKD-V. *A* – control RBCs MCV values; *B* – MCV values of maximally swollen RBCs in ammonium stress-test; *C* – MCV increase of control RBCs in comparison with ammonium stress-test (in %). There were no significant differences in MCV before and after the HD session (Wilcoxon matched pair test), however the control values of MCV in donors were significantly lower than in patients of Group №1 before the HD session (Mann–Whitney U-test).



ческих токсинов (акролеин, метилглиоксаль, индоксил сульфат и др.), но и из-за стрессорных воздействий — осмотических сдвигов, окислительного стресса и энергетического истощения [46].

Средняя продолжительность жизни эритроцитов может снижаться из-за компрессий и деформаций клеток в экстракорпоральном круге кровообращения при лечении ХГД [12]. Способность эритроцитов к обратимым деформациям — деформируемость имеет решающее значение для микроциркуляции, таким образом, снижение деформируемости связано с многими патологиями [28]. В окружении уремической плазмы эритроциты предрасположены ко многим перестройкам, которые могут оказывать негативное влияние на сердечно-сосудистую систему [13]. Полученные нами результаты дополняют данные [12] и указывают на отсутствие непосредственного влияния сеанса ГД на функциональные параметры эритроцитов.

Уремия оказывает негативное влияние на ряд гематологических параметров, таких как продукция и деструкция эритроцитов, функция тромбоцитов, лимфоцитов и эритроцитов, и активация коагуляционной системы. Уремические токсины могут не только влиять на функцию клеток извне, но и аккумулироваться внутри клетки [1]. В пользу этого говорят результаты исследований, в которых была выявлена способность эритроцитов импортировать и экспортировать (в порядке возрастания): гиппуровую кислоту (НА) < индоксил сульфат (IS) < р-крезил сульфат (рCS) < индол-3-уксусную кислоту (IAA). Импорт и экспорт НА и импорт рCS ингибировались блокатором АЕ1 (белок полосы 3) — DIDS [43]. Таким образом, в импорте ряда уремических токсинов в эритроцит задействован один из главных структурных белков, основными функциями которого является поддержание структурной целостности мембраны эритроцита и внутриклеточного рН [37, 47, 48].

Структурная целостность сети цитоскелета — основной фактор, определяющий вязко-эластичные свойства эритроцита и его деформируемость [49]. Изменение/снижение экспрессии мембранных белков может быть причиной изменения вязко-эластичных свойств эритроцита и может воздействовать на молекулярные пути сигналинга в эритроцитах [1, 13]. Методами протеомного анализа было выявлено, что экспрессия белков в цитоплазматической мембране эритроцитов пациентов, страдающих от уремического синдрома, значительно отличается от здоровых людей. В уремических эритроцитах показаны: сниженная экспрессия спектрина, белка полосы 3 (АЕ1), палладина, актина, стоматина и CD47 (маркер, препятствующий фагоцитозу) [50, 51]; и изменения в экспрессии таких белков, как бета-адудин, тропомодулин-1, эзрин, радиксин [1, 5, 52, 53]. Описанные модификации, вероятно, вовлечены в патогенез нарушения способности эритроцитов к обратимым деформациям, которое наблюдается у пациентов с ХБП V [1, 13].

Характеристики, описывающие деформационную способность эритроцитов пациентов с ХБП V и, соответственно, функциональный статус эритроцитов, ранее не были описаны. Применение метода лазерной дифракции позволило охарактеризовать эритроциты с новой стороны — по изменению функционального статуса клеток в условиях ХБП V.

Наши данные, описывающие снижение деформационно-функциональных характеристик эритроцитов, являются серьезным дополнением к биохимическим и протеомным данным, полученным ранее [1, 5, 13, 43, 50–53], и вносят вклад в понимание процессов изменения/снижения функции эритроцитов в условиях ХБП V. Изменяемые параметры являются существенными для характеристики функционального статуса эритроцитов: начальная скорость увеличения объема эритроцитов (V_i) указывает на изменение функции АЕ1; максимальная скорость гемолиза (V_{\max}) и время достижения максимальной скорости гемолиза (T_{\max}) описывают скорость разрушения клеток и, соответственно, являются характеристикой хрупкости клеток. Патологические изменения выявлялись аммонийным стресс-тестом.

Сравнение V_i , V_{\max} , T_{\max} у пациентов ХГД с нормой (доноры) позволило выявить существенные различия.

Деформационные характеристики, начальная скорость увеличения объема эритроцитов (V_i) и время достижения максимальной скорости гемолиза (T_{\max}) эритроцитов пациентов ХГД значительно отличались от нормы (группа доноров) (рис. 2, 4). У пациентов с ХБП V, находящихся на ХГД до 25 мес., было выявлено повышение V_i и снижение T_{\max} по сравнению с группой доноров, что указывает на увеличение хрупкости эритроцитов. У пациентов, находящихся на ХГД от 25 до 250 мес., наблюдалось снижение V_i и увеличение T_{\max} по сравнению с контролем (рис. 2, 4), указывающие на увеличение ригидности клеток. Полученные результаты показали, что срок лечения программным ХГД и/или подверженность воздействию уремических токсинов приводят к двухстадийному ухудшению деформационно-функциональных свойств эритроцитов пациентов с ХБП V: (i) стадии увеличения хрупкости для пациентов, находящихся на ХГД до 25 мес., и (ii) стадии повышения ригидности для пациентов, находящихся на ХГД от 25 до 250 мес.

В норме в изоосмотической среде эритроциты человека имеют форму двояковогнутого диска, что придает им высокое соотношение поверхности к объему и возможность подвергаться широкому диапазону объемных изменений. В гипоосмотической среде эритроциты трансформируются в стоматоциты и увеличивают свой объем до 74%, в гиперосмотической среде – сжимаются на 34% и трансформируются в эхиноциты [54, 55]. Несмотря на способность подвергаться различным деформациям и находиться в растворах с широким диапазоном осмолярности, влияние циклического длительного нахождения в гиперосмолярной среде на транспортные характеристики эритроцитов изучено не в полной мере. Выявленное в наших экспериментах циклическое длительное (до 48 ч) нахождение в окружении гиперосмолярной (до 340 мОсм/кгН₂О) уремической плазмы также может влиять на изменение деформационно-функциональных показателей эритроцитов.

ХБП V ассоциирована с нарушениями артериального давления, химического состава крови и продукции эритроцитов, что может негативно влиять на функции мозга. Плейоморфные проявления уремии возникают параллельно с ухудшением работы почек и включают снижение когнитивной деятельности, нарушение нейромышечной функции с мышечной слабостью, эпилептиформные припадки [5, 56, 57]. Ранее было показано, что ХБП V сопровождается субкортикальными ишемическими поражениями, атрофией и нарушениями когнитивной деятельности [58, 59]. Однако механизмы воздействия ХБП V на функцию мозга и временная динамика остаются неизученными. Группа Liu [60] подтвердила систематические эффекты расчетной скорости клубочковой фильтрации, уровня гематокрита и артериального давления на мозговой кровоток, вызывающие нарушения регионального мозгового кровотока, что может отражать нарушенное функционирование мозга, обуславливающее нейрокогнитивные симптомы при ХБП V [60]. Описанные нейродегенеративные симптомы, сопутствующие ХБП V, могут быть также обусловлены гипераммониемией [61].

Ранее нами было показано, что эритроциты человека способны транспортировать и импортировать аммоний/аммиак [37, 41]. Эти клетки, по-видимому, играют важную роль в поддержании азотистого баланса в организме. Кроме того, эритроциты также могут являться маркерами патологических нарушений, происходящих в организме, поэтому контроль состояния эритроцитов крайне важен. В связи с этим, качество эритроцитов и их способность выполнять свою функцию приобретают существенное значение в группах риска гипераммониемии: пациенты отделения хронического гемодиализа (нарушение биохимического гомеостаза и постоянное агрессивное химическое и физическое воздействие на клетки), новорожденные с транзи-

торной гипераммониемией (нарушение функциональных свойств эритроцитов), взрослые с повышенной физической нагрузкой (неспособность организма справиться с избыточным потоком аммония/аммиака). Исследование данной области патофизиологии поможет в улучшении и своевременной коррекции терапевтических подходов, используемых для пациентов групп риска гипераммониемии, таким образом появится возможность улучшить качество диагностики и, что важнее, качество жизни пациентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ деформационно-функциональных параметров эритроцитов пациентов с ХБП V до и после сеанса гемодиализа не выявил значимых отличий, в то время как сравнение показателей V_f , T_{max} и V_{max} доноров, пациентов, находящихся на лечении ХГД до 25 мес. (группа 1) и пациентов, находящихся на лечении ХГД от 25 до 250 мес. (группа 2), выявило двухэтапное ухудшение деформационно-функциональных свойств эритроцитов пациентов с ХБП V: стадия увеличения хрупкости эритроцитов (повышение V_f , снижение T_{max}) пациентов группы 1 и стадия увеличения ригидности (снижение V_f , увеличение T_{max}) у пациентов группы 2. Кроме того, в междиализные промежутки концентрация уремических токсинов суммарно повышалась до 30 мМ при неизменной концентрации Na^+ 140 мМ и глюкозы <5 мМ, тем самым приводя к гиперосмоляльности плазмы (до 330 мОсм/кг H_2O в группе 1, до 340 мОсм/кг H_2O в группе 2), что также может способствовать ухудшению деформационных характеристик эритроцитов пациентов ХГД.

Полученные результаты указывают на то, что у пациентов отделения хронического гемодиализа уремическая интоксикация и постоянное нахождение эритроцитов в окружении гиперосмолярной плазмы/при воздействии уремических токсинов, а не сам сеанс гемодиализа, вызывают нарушение деформационно-функциональных характеристик эритроцитов, приводящее к анемическому синдрому.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-315-60015 (Юлия Судницына).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bonomini M., Pieroni L., Ronci M., Sirolli V., Urbani A.* Blood Cell Proteomics in Chronic Kidney Disease. *Open Urology and Nephrology*. 11: 28–38. 2018.
2. *Liu Z.Z., Bullen A., Li Y., Singh P.* Renal oxygenation in the pathophysiology of chronic kidney disease. *Front. Physiol.* 8: 385. 2017.
3. *Fishbane S., Spinowitz B.* Update on anemia in ESRD and earlier stages of CKD: Core Curriculum 2018. *Am. J. Kidney. Dis.* 71(3): 423–435. 2018.
4. *Bowry S.K., Gatti E.* Impact of hemodialysis therapy on anemia of chronic kidney disease: the potential mechanisms. *Blood Purif.* 32(3): 210–219. 2011.
5. *Scherer A., Günther O.P., Balshaw R.F., Hollander Z., Wilson-McManus J., Ng R., McMaster W.R., McManus B.M., Keown P.A.* Alteration of human blood cell transcriptome in uremia. *BMC Med. Genomics*. 6: 23. 2013.
6. *Sotirakopoulos N., Tsitsios T., Stambolidou M., Athanasiou G, Peiou M, Kokkinou V, Mavromatidis K.* The red blood cell deformability in patients suffering from end stage renal failure on hemodialysis or continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Ren. Fail.* 26(2): 179–183. 2004.
7. *Bae S.Y., Jeon J.W., Kim S.H., Baek C.H., Jang J.W., Yang W.S., Kim S.B., Park S.-K., Lee S.K., Kim H.* Usefulness of mid-week hemoglobin measurement for anemia management in patients undergoing hemodialysis: a retrospective cohort study. *BMC Nephrol.* 20(1): 295. 2019.
8. *Fuertinger D.H., Kappel F., Zhang H., Thijssen S., Kotanko P.* Prediction of hemoglobin levels in individual hemodialysis patients by means of a mathematical model of erythropoiesis. *PLoS One*. 13(4): e0195918. 2018.

9. *Bonomini M., Del Vecchio L., Sirolli V., Locatelli F.* New Treatment Approaches for the Anemia of CKD. *Am. J. Kidney Dis.* 67(1): 133–142. 2016.
10. *Cernaro V., Coppolino G., Visconti L., Rivoli L., Lacquaniti A., Santoro D., Buemi A., Loddo S., Buemi M.* Erythropoiesis and chronic kidney disease—related anemia: From physiology to new therapeutic advancements. *Med. Res. Rev.* 39: 427–460. 2019.
11. *Brenner N., Kommalapati A., Ahsan M., Ganguli A.* Red cell transfusion in chronic kidney disease in the United States in the current era of erythropoiesis stimulating agents. *J. Nephrol.* [published online ahead of print, 2019 Nov 28]. 2019.
12. *Luo J.F., Li J.H., Nie J.J., Li P.P., Zhang H.D., Ma Y.J.* Effect of hemodialysis on the red blood cell life span in patients with end-stage kidney disease. *Ther. Apher. Dial.* 23(4): 336–340. 2019.
13. *Bonomini M., Pandolfi A., Sirolli V., Arduini A., Liberato L.D., Di Pietro N.* Erythrocyte alterations and increased cardiovascular risk in chronic renal failure. *Nephro-Urol. Mon.* 9(3): e45866. 2017.
14. *Babitt J.L., Lin H.Y.* Mechanisms of anemia in CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* 23(10): 1631–1634. 2012.
15. *Ertan N.Z., Bozfakioğlu S., Ugurel E., Sinan M., Yalcin O.* Alterations of erythrocyte rheology and cellular susceptibility in end stage renal disease: Effects of peritoneal dialysis. *PLoS One.* 12(2): e0171371. 2017.
16. *Kuhn V., Diederich L., Keller T.C.S. 4th, Kramer C.M., Lückstädt W., Panknin C., Suvorava T., Isakson B.E., Kelm M., Cortese-Krott M.M.* Red blood cell function and dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia. *Antioxid. Redox. Signal.* 26(13): 718–742. 2017.
17. *Kruse A., Uehlinger D.E., Gotch F., Kotanko P., Levin N.W.* Red blood cell lifespan, erythropoiesis and hemoglobin control. *Contrib. Nephrol.* 161: 247–254. 2008.
18. *Ayala A., Muñoz M.F., Argüelles S.* Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2014: 360438. 2014
19. *Sindhu R.K., Eлдаie A., Farmand F., Dhaliwal K.K., Nguyen T., Zhan C.D., Roberts C.K., Vaziri N.D.* Expression of catalase and glutathione peroxidase in renal insufficiency. *Biochim. Biophys. Acta.* 1743(1–2): 86–92. 2005.
20. *Gao C., Xie R., Yu C., Ma R., Dong W., Meng H., Zhang Y., Si Y., Zhang Z., Novakovic V., Zhang Y., Kou J., Bi Y., Li B., Xie R., Gilbert G.E., Zhou J., Shi J.* Thrombotic Role of Blood and Endothelial Cells in Uremia through Phosphatidylserine Exposure and Microparticle Release. *PLoS One.* 10(11): e0142835. 2015.
21. *Bonomini M., Sirolli V., Mercurio G., Antidormi T., Di Liberato L., Brummer U., Papponetti M., Cappelli P., Di Gregorio P., Arduini A.* Red blood cells may contribute to hypercoagulability in uraemia via enhanced surface exposure of phosphatidylserine. *Nephrol. Dial. Transplant.* 20(2): 361–366. 2005.
22. *Liu L., Huang S., Xu X., Han J.* Study of individual erythrocyte deformability susceptibility to INFeD and ethanol using a microfluidic chip. *Sci. Rep.* 6: 22929. 2016.
23. *Huisjes R., Bogdanova A., van Solinge W.W., Schiffelers R.M., Kaestner L., van Wijk R.* Squeezing for Life - Properties of Red Blood Cell Deformability. *Front. Physiol.* 9:656. 2018.
24. *Kikuchi Y., Koyama T., Koyama Y., Tozawa S., Arai T., Horimoto M., Kakiuchi Y.* Red blood cell deformability in renal failure. *Nephron.* 30(1): 8–14. 1982.
25. *Pretini V., Koenen M.H., Kaestner L., Fens M.H.A.M., Schiffelers R.M., Bartels M., Van Wijk R.* Red Blood Cells: Chasing Interactions. *Front. Physiol.* 10: 945. 2019.
26. *Barns S., Balanant M.A., Sauret E., Flower R., Saha S., Gu Y.* Investigation of red blood cell mechanical properties using AFM indentation and coarse-grained particle method. *Biomed. Eng. Online.* 16(1): 140. 2017.
27. *Brown C.D., Ghali H.S., Zhao Z., Thomas L.L., Friedman E.A.* Association of reduced red blood cell deformability and diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 67(1): 295–300. 2005.
28. *Faustino V., Rodrigues R.O., Pinho D., Costa E., Santos-Silva A., Miranda V., Amaral J.S., Lima R.* A Microfluidic Deformability Assessment of Pathological Red Blood Cells Flowing in a Hyperbolic Converging Microchannel. *Micromachines (Basel).* 10(10): pii: E645. 2019.
29. *Mourikis P., Helten C., Dannenberg L., Hohfeld T., Stegbauer J., Petzold T., Levkau B., Zeus T., Kelm M., Polzin A.* Platelet reactivity in patients with chronic kidney disease and hemodialysis. *J. Thromb. Thrombolysis.* 49(1): 168–172. 2020.
30. *Dutka P.* Guarding against hidden hemolysis during dialysis: an overview. *Nephrol. Nurs. J.* 35:45. 2008.
31. *Medina A., Ellis C., Levitt M.D.* Use of alveolar carbon monoxide measurements to assess red blood cell survival in hemodialysis patients. *Am. J. Hematol.* 46: 91–4. 1994.
32. *Ahmadmehrabi S., Tang W.H.W.* Hemodialysis-induced cardiovascular disease. *Semin. Dial.* 31(3): 258–267. 2018.

33. Vos F.E., Schollum J.B., Coulter C.V., Doyle T.C., Duffull S.B., Walker R.J. Red blood cell survival in long-term dialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* 58(4): 591–598. 2011.
34. Mindukshev I.V., Senchenkova E.Y., Goncharov N.V., Vivulanets E.V., Krivoshlyk V.V. New methods for studying platelets and red blood cells, based upon the low-angle light scattering technique. In: *Handbook of hematology research*. Eds. Tondre R., Lebegue C. New York. Nova Biomed. Books. 2010.
35. Mindukshev I., Gambaryan S., Kehrer L., Schuetz C., Kobsar A., Rukoyatkina N., Nikolaev V.O., Krivchenko A., Watson S.P., Walter U., Geiger J. Low angle light scattering analysis: a novel quantitative method for functional characterization of human and murine platelet receptors. *Clin. Chem. Lab. Med.* 50. (7): 1253–62. 2012.
36. Mindukshev I., Kudryavtsev I., Serebriakova M., Trulioff A., Gambaryan S., Sudnitsyna J., Khmelevskoy D., Voitenko N., Avdonin P., Jenkins R., Goncharov N. Flow cytometry and light scattering technique in evaluation of nutraceuticals. In: *Neutraceuticals. Efficacy, Safety and Toxicity*. Elsevier. 319–332. 2016. ISBN 978-0-12-802147-7
37. Sudnitsyna J.S., Skvertchinskaya E.A., Dobrylko I.A., Nikitina E.R., Krivchenko A.I., Gambaryan S.P., Mindukshev I.V. Human Erythrocyte Ammonium Transport Is Mediated by Functional Interaction of Ammonium (RhAG) and Anion (AE1) Transporters. *Biochemistry (Moscow)*. Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology. 10 (4): 301–310. 2016.
38. Mindukshev I.V., Sudnitsyna J.S., Skverchinskaya E.A., Andreyeva A.Yu., Dobrylko I.A., Senchenkova E.Yu., Krivchenko A.I., Gambaryan S.P. Erythrocytes' reactions to osmotic, ammonium, and oxidative stress are inhibited under hypoxia. *Biochemistry (Moscow)*. Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology. 13(4): 352–364. 2019.
39. Jacobs M.H. Observation of the hemolytic actions of ammonium salts. *Am. J. Physiol.* 68: 134–135. 1924.
40. Chernyshev A.V., Tarasov P.A., Semianov K.A., Nekrasov V.M., Hoekstra A.G., Maltsev V.P. Erythrocyte lysis in isotonic solution of ammonium chloride: Theoretical modeling and experimental verification. *J. Theor. Biol.* 251: 93–107. 2008.
41. Sudnitsyna J.S., Gambaryan S.P., Krivchenko A.I., Mindukshev I.V. Ammonia/Ammonium Influx in Human Erythrocytes. *Biol. Membrany.* 35(5): 398–402. 2018.
42. Glassock R.J. Uremic toxins: what are they? An integrated overview of pathobiology and classification. *J. Ren. Nutr.* 18(1): 2–6. 2008.
43. Deltombe O., Van Biesen W., Glorieux G., Massy Z., Dhondt A., Eloit S. Exploring Protein Binding of Uremic Toxins in Patients with Different Stages of Chronic Kidney Disease and during Hemodialysis. *Toxins (Basel)*. 7(10): 3933–3946. 2015.
44. Bonan N.B., Steiner T.M., Kuntsevich V., Virzi G.M., Azevedo M., Nakao L.S., Barreto F.C., Ronco C., Thijssen S., Kotanko P., Pecoits-Filho R., Moreno-Amaral A.N. Uremic Toxicity-Induced Eryptosis and Monocyte Modulation: The Erythrophagocytosis as a Novel Pathway to Renal Anemia. *Blood Purif.* 41(4): 317–323. 2016.
45. Bosman G.J. Survival of red blood cells after transfusion: processes and consequences. *Front. Physiol.* 4: 376. 2013.
46. Tozoni S.S., Dias G.F., Bohnen G., Grobe N., Pecoits-Filho R., Kotanko P., Moreno-Amaral A.N. Uremia and Hypoxia Independently Induce Eryptosis and Erythrocyte Redox Imbalance. *Cell Physiol. Biochemistry*. 53: 794–804. 2019.
47. Swietach P., Tiffert T., Mauritz J.M., Seear R., Esposito A., Kaminski C.F., Lew V.L., Vaughan-Jones R.D. Hydrogen ion dynamics in human red blood cells. *J. Physiol.* 588(Pt 24): 4995–5014. 2010.
48. Bruce L.J., Beckmann R., Ribeiro M.L., Peters L.L., Chasis J.A., Delaunay J., Mohandas N., Anstee D.J., Tanner M.J. A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane. *Blood*. 101(10): 4180–4188. 2003.
49. Evans E.A., Hochmuth R.M. Membrane viscoelasticity. *Biophys. J.* 16(1): 1–11. 1976.
50. Oldenborg P.A., Zheleznyak A., Fang Y.F., Lagenaur C.F., Gresham H.D., Lindberg F.P. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science*. 288(5473): 2051–2054. 2000.
51. Costa E., Rocha S., Rocha-Pereira P., Castro E, Miranda V, do Sameiro Faria M., Loureiro A., Quintanilha A., Belo L., Santos-Silva A. Altered erythrocyte membrane protein composition in chronic kidney disease stage 5 patients under haemodialysis and recombinant human erythropoietin therapy. *Blood Purif.* 26(3): 267–273. 2008.
52. Alvarez-Llamas G., Zubiri I., Maroto A.S., de la Cuesta F., Posada-Ayala M., Martin-Lorenzo M., Barderas M.G., Fernandez-Fernandez B., Ramos A., Ortíz A., Vivanco F. A role for the membrane proteome in human chronic kidney disease erythrocytes. *Transl. Res.* 160(5): 374–383. 2012.
53. Antonelou M.H., Kriebardis A.G., Velentzas A.D., Kokkalis A.C., Georgakopoulou S.C., Papassideri I.S. Oxidative stress-associated shape transformation and membrane proteome remodeling in erythrocytes of end stage renal disease patients on hemodialysis. *J. Proteomics*. 74(11): 2441–2452. 2011.

54. Itano H.A., Keitel H.G., Thompson D. Hyposthenuria in sickle cell anemia: a reversible renal defect. *J. Clin. Invest.* 35(9): 998–1007. 1956.
55. Sugie J., Intaglietta M., Sung L.A. Water transport and homeostasis as a major function of erythrocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 314(5): H1098–H1107. 2018.
56. Moodalbil D.G., Reiser K.A., Detre J.A., Schultz R.T., Herrington J.D., Davatzikos C., Doshi J.J., Erus G., Liu H.S., Radcliffe J., Furth S.L., Hooper S.R. Systematic review of structural and functional neuroimaging findings in children and adults with CKD. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 8(8): 1429–1448. 2013.
57. Drew D.A., Weiner D.E., Sarnak M.J. Cognitive Impairment in CKD: Pathophysiology, Management, and Prevention. *Am. J. Kidney Dis.* 74(6): 782–790. 2019.
58. Hooper S.R., Gerson A.C., Butler R.W., Gipson D.S., Mendley S.R., Lande M.B., Shinnar S., Wentz A., Matheson M., Cox C., Furth S.L., Warady B.A. Neurocognitive functioning of children and adolescents with mild-to-moderate chronic kidney disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 6(8): 1824–1830. 2011.
59. Seidel U.K., Gronewold J., Volsek M., Todica O., Kribben A., Bruck H., Hermann D.M. The prevalence, severity, and association with HbA1c and fibrinogen of cognitive impairment in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 85(3): 693–702. 2014.
60. Liu H.S., Hartung E.A., Jawad A.F., Ware J.B., Laney N., Port A.M., Gur R.C., Hooper S.R., Radcliffe J., Furth S.L., Detre J.A. Regional Cerebral Blood Flow in Children and Young Adults with Chronic Kidney Disease. *Radiology.* 288(3): 849–858. 2018.
61. Gupta S., Fenves A.Z., Hootkins R. The Role of RRT in Hyperammonemic Patients. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 11(10): 1872–1878. 2016.

Uremic Syndrome Triggers Red Blood Cell Deformability Alteration in Hemodialysis Patients

Yu. A. Borisov^a, J. S. Sudnitsyna^{b, c, *}, T. D. Vlasov^a, L. V. Dulneva^a, V. O. Abolmasov^a,
I. V. Mindukshev^c, and A. V. Smirnov^a

^aPavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

^bCenter for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

^cSechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

*e-mail: julia.sudnitsyna@gmail.com

End stage of chronic kidney disease (CKD-V) is associated with alterations in erythrocyte structure and functions which are the potential risk factors to interrupt erythrocyte proper activity however the mechanisms of such changes remain understudied. We used laser diffraction approach for investigation of CKD and hemodialysis (HD) effects on deformability of CKD-V patients red blood cells. HD did not affect red blood cell (RBCs) deformability however we showed two-stage alteration in renal patients' RBCs deformability corresponding to the time of HD treatment or/and susceptibility to uremic syndrome. The first stage was characterized by increase in initial velocity of cell swelling (V_i) and decrease in the time to peak hemolysis rate (T_{max}), and indicated the increase in RBCs fragility in patients receiving HD treatment up to 25 months (Group 1). The second stage outlined the decrease in V_i and increase in T_{max} , that indicated the increase in rigidity of RBCs in patients receiving HD treatment from 25 months to 250 months (Group 2). In interdialytic periods the increase in concentration of uremic toxins (urea, uric acid) was detected, at the same time there were no changes in sodium and glucose concentrations. The increase in uremic toxins lead to osmolality accrual up to 330 mOsm/kg in patients of Group1 before HD, up to 340 mOsm/kg in patients of Group 2 before HD. In summary, HD did not affect the functional parameters of RBCs, however our data clearly indicated the two-stage deformability alteration in renal patients' RBCs that is triggered by uremic syndrome and potentially may lead to renal anemia and cardio-vascular complications specifically attributed to CKD-V patients.

Keywords: chronic hemodialysis, red blood cells, uremia, uremic syndrome, laser diffraction, nitrogen balance

ЦИТИРОВАТЬ:

Борисов Ю.А., Судницына Ю.С., Власов Т.Д., Дульнева Л.В., Аболмасов В.О., Миндукшев И.В., Смирнов А.В. Уремический синдром вызывает нарушение деформационно-функциональных характеристик эритроцитов у пациентов хронического гемодиализа. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(8): 1025–1040.

DOI: 10.31857/S0869813920080038

TO CITE THIS ARTICLE:

Borisov Yu.A., Sudnitsyna J.S., Vlasov T.D., Dulneva L.V., Abolmasov V.O., Mindukshev I.V., Smirnov A.V. Uremic Syndrome Triggers Red Blood Cell Deformability Alteration in Hemodialysis Patients. Russian Journal of Physiology. 106(8): 1025–1040.

DOI: 10.31857/S0869813920080038

ВЛИЯНИЕ ГЛЮКАГОНОПОДОБНЫХ ПЕПТИДОВ И ОКСИНТОМОДУЛИНА НА ЭКСКРЕЦИЮ ИОНОВ НАТРИЯ ПОЧКАМИ У КРЫС

© 2020 г. Е. В. Балботкина¹*, Т. А. Каравашкина¹, Т. В. Ковалева¹, А. В. Кутина¹

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

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

Поступила в редакцию 10.03.2020 г.

После доработки 04.05.2020 г.

Принята к публикации 30.05.2020 г.

Поддержание баланса натрия обеспечивается четким соответствием поступления соли через желудочно-кишечный тракт и ее выведением, преимущественно, почками. Представляет интерес оценка функциональной связи пищеварительной системы и почек и ее вклада в поддержание постоянства концентрации натрия во внутренней среде организма. Цель исследования — оценить участие пептидов кишечника, производных проглюкагона, в регуляции выведения натрия почками. Исследовано диуретическое и натрийуретическое действие внутрибрюшинного введения оксинтомодулина, глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1) и глюкагоноподобного пептида-2 (ГПП-2) в дозе 1.5 нмоль/кг в обычных и стандартизированных (на фоне напаивания 0.9%-ным раствором NaCl в объеме 50 мл/кг) условиях водно-солевого баланса. Показано повышение мочеотделения и экскреции натрия при действии ГПП-1 и снижение диуреза и натрийуреза после инъекции ГПП-2. Эффект оксинтомодулина на функции почек не выявлен. Оценен секреторный ответ исследуемых пептидов на пероральную нагрузку 2.5%-ным раствором NaCl (18 мл/кг), вызывающую гипернатриемию: через 5 мин наблюдалось повышение концентрации ГПП-1 и снижение ГПП-2 в крови, уровень оксинтомодулина не изменился. Изучено влияние пептидов на выведение почками избытка натрия и хлоридов при гипернатриемии после перорального и внутрибрюшинного введения 2.5%-ного раствора NaCl. Инъекция ГПП-1 усилила диурез, экскрецию натрия и хлоридов почками на фоне внутрибрюшинной нагрузки NaCl и ускорила выведение ионов после пероральной нагрузки. Выявлены антидиуретический и антинатрийуретический эффекты ГПП-2 при введении гормона на фоне пероральной нагрузки NaCl. Таким образом, производные проглюкагона, ГПП-1 и ГПП-2, участвуют в регуляции баланса натрия. При избыточном поступлении NaCl через желудочно-кишечный тракт как изменение секреции этих регуляторных пептидов, так и их эффекты на экскрецию натрия почками противоположно направлены.

Ключевые слова: глюкагоноподобный пептид-1, глюкагоноподобный пептид-2, оксинтомодулин, нагрузочная проба, натрийурез, гипернатриемия, почка

DOI: 10.31857/S0869813920080026

Баланс натрия поддерживается благодаря сложной многокомпонентной системе регуляции процессов поступления и выведения катиона из организма и строго контролируется интегрированными нейроэндокринными и поведенческими механизмами [1]. Патогенез различных заболеваний сопровождается нарушениями ба-

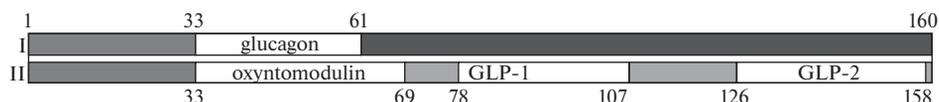


Рис. 1. Посттрансляционный процессинг проглюкагона: I – в α -клетках поджелудочной железы, II – в L-клетках кишечника. Белым цветом обозначены участки полипептида, соответствующие отдельным гормонам, номерами указаны позиции аминокислотных остатков в последовательности проглюкагона (1–160), соответствующие началу и концу каждого из пептидов. GLP-1 – глюкагоноподобный пептид-1, GLP-2 – глюкагоноподобный пептид-2.

Fig. 1. Post-translational processing of glucagon: I – in the pancreatic α -cells, II – in the intestinal L-cells. White areas indicate fragments of the polypeptide corresponding to individual hormones; the numbers indicate the amino acid positions in the proglucagon sequence (1–160), corresponding to the beginning and end of each of the peptides. GLP-1 – glucagon-like peptide-1, GLP-2 – glucagon-like peptide-2.

ланса натрия. Понимание системы его регуляции необходимо для правильного анализа механизмов соль-чувствительности, коррекции состояний, сопровождающихся задержкой натрия и жидкости в организме (при артериальной гипертензии, сердечной недостаточности, отежном синдроме различной этиологии и др.). При гиповолемии и гипонатриемии активируются центральные и периферические осмо- и натриевые рецепторы, вкусовые рецепторы, артериальные и сердечно-легочные барорецепторы и объемные рецепторы, ренин-ангиотензиновая система [2, 3]. При избыточном потреблении натрия снижается солевой аппетит [4], уменьшается реабсорбция натрия в почках и увеличивается его экскреция с мочой [5, 9]. Последнее является следствием не только снижения уровня ангиотензина II и альдостерона, но и действия различных натрийуретических факторов (предсердный натрийуретический пептид, нейрогипофизарные гормоны) [6–9]. При этом достаточно давно отмечено, что эффективность выведения избытка ионов натрия из организма зависит от пути их поступления. Натрийурез после пероральной солевой нагрузки в 2 раза выше, чем после внутривенной инфузии [10–12] или внутрибрюшинного введения гипертонического раствора NaCl [13]. В связи с этим представляла интерес оценка функциональной связи желудочно-кишечного тракта и почек, поиск биологически активных веществ, которые могут опосредовать описанные эффекты. В желудочно-кишечном тракте секретируется широкий спектр гормонов и регуляторных пептидов, среди которых особый интерес представляют инкретины – пептиды, стимулирующие глюкозозависимую секрецию инсулина поджелудочной железой в ответ на поступление пищи. Основной инсулинотропный эффект опосредован глюкагоноподобным пептидом-1 (ГПП-1), миметики которого используют в терапии пациентов с сахарным диабетом 2 типа. ГПП-1 является наиболее изученным продуктом ограниченного протеолиза проглюкагона. Посттрансляционный протеолиз проглюкагона тканеспецифичен (рис. 1). В α -клетках поджелудочной железы конвертаза 2 типа отщепляет от прогормона глюкагон; в энтероэндокринных клетках тонкой и толстой кишки при действии конвертаз 1–3 типов из прогормона образуется сразу несколько пептидов, родственных по аминокислотной последовательности, но имеющих различную биологическую активность: оксинтомодулин, ГПП-1, глюкагоноподобный пептид-2 (ГПП-2) и др. [14, 15].

Глюкозозависимая постпрандиальная секреция инсулина далеко не единственный эффект, который оказывает ГПП-1 [16]. Установлено, что рецепторы ГПП-1 кроме β -клеток поджелудочной железы также расположены в печени, сердце, головном мозге, почках. Выявлено натрийуретическое действие ГПП-1 и инкретиномиметиков [17, 18]. В нашей лаборатории было показано важное интегрирующее значение ГПП-1 в системе водно-солевого гомеостаза [13, 19]. Несмотря на то, что

оксинтомодулин и ГПП-2 секретируются совместно с ГПП-1, об их биологической активности *in vivo* известно гораздо меньше. Оксинтомодулин (27-аминокислотный пептид) регулирует секрецию соляной кислоты в желудке и транспорт гексоз в тонкой кишке. Его собственные рецепторы не выявлены [14], он рассматривается как агонист рецепторов ГПП-1 и глюкагона [20, 21]. По современным данным действие ГПП-2 (33-аминокислотный пептид) осуществляется в желудочно-кишечном тракте, в центральной нервной системе и в костной ткани. На многочисленных моделях повреждения кишки описано пролиферативное и антиапоптотическое действие ГПП-2, которое ведет к увеличению площади поверхности слизистой и повышению способности к абсорбции нутриентов. ГПП-2 оказывает свое действие через G-связанный рецептор в мембранах нейронов и энтероэндокринных клеток; он специфически распознает ГПП-2, но не другие родственные ему пептиды. Предполагают, что эффекты ГПП-2 преимущественно опосредованы изменением продукции других физиологически активных веществ [22]. ГПП-2 оказывает глюкагонотропное действие, но не влияет на секрецию инсулина β -клетками поджелудочной железы [14]. Влияние оксинтомодулина и ГПП-2 на функции почек не изучено.

Цель исследования – оценить участие регуляторных пептидов, производных проглюкагона, в регуляции выведения натрия почками. В задачи работы входила оценка диуретического и натрийуретического действия ГПП-1, ГПП-2 и оксинтомодулина, определение секреторного ответа производных проглюкагона на нагрузку NaCl и изучение влияния данных пептидов на скорость выведения избытка натрия и хлоридов почками в условиях положительного баланса NaCl.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на самках крыс линии Вистар массой 160–250 г. Крыс содержали в виварии в пластиковых клетках с древесно-стружечным наполнителем (5 особей в клетке) в комнате с контролируемой температурой. Животные получали стандартный гранулированный корм для грызунов (ПК-120, Лабораторкорм, Россия) и воду *ad libitum*. Вечером накануне эксперимента (в 17:00) у крыс забирали корм, сохраняя свободный доступ к воде. Исследование проводилось в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями этического комитета ИЭФБ РАН.

Кишечные регуляторные пептиды ГПП-1, ГПП-2 и оксинтомодулин (Bachem, Швейцария) в дозе 1.5 нмоль/кг массы тела или их растворитель (0.9%-ный раствор NaCl) инъецировали крысам внутрибрюшинно в объеме 1 мл/кг. В I серии экспериментов исследовали влияние экзогенных регуляторных пептидов на функции почек крыс в условиях обычного водно-солевого режима. Во II серии – в тех же условиях на фоне угнетения активности дипептидилпептидазы-4 внутрибрюшинным введением вилдаглиптина (Matrix Scientific, США) в дозе 1 мг/кг.

В III серии экспериментов проводили оценку диуретической и натрийуретической активности пептидов по методике Кау и соавт. [23] в модификации Lahlou и соавт. [24] с предварительным пероральным введением животным физиологического раствора в объеме 50 мл/кг (что соответствует 7.7 ммоль/кг натрия и хлоридов) через зонд в желудок для стандартизации водно-солевого баланса.

В IV серии опытов оценивали влияние регуляторных пептидов на функцию почек в условиях гипернатриемии, смоделированной пероральным введением того же количества натрия и хлоридов (7.7 ммоль/кг), что и в III серии, но в виде 2.5%-ного раствора NaCl в объеме 18 мл/кг. В V серии экспериментов использовали схожую с IV серией модель опыта, но раствор NaCl вводили внутрибрюшинно для исключения изменений секреции регуляторных пептидов. В III–V сериях эффект

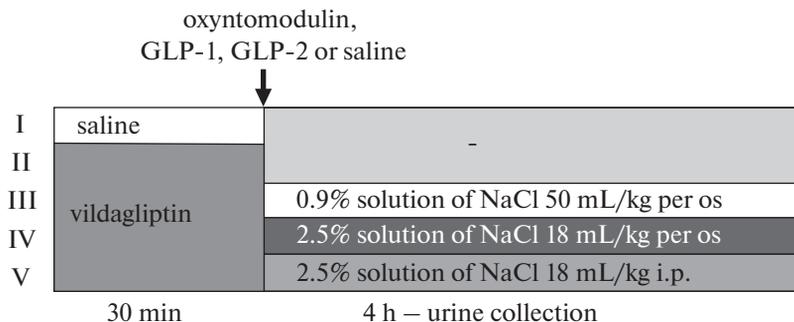


Рис. 2. Схема основных экспериментальных серий (I–V). Стрелка – введение оксинтомодулина, ГПП-1, ГПП-2 или их растворителя.

Fig. 2. Design of the main experimental series (I–V). Arrow – administration of oxyntomodulin, GLP-1, GLP-2 or saline.

пептидов оценивался на фоне предварительного введения вилдаглиптина. Схема I–V экспериментальных серий приведена на рис. 2. Каждая серия состояла из 3–4 опытных групп по 10 животных. После экспериментального воздействия животных помещали в индивидуальные клетки-пеналы с проволочным дном и мерной пробиркой для сбора проб мочи при спонтанных мочеиспусканиях в течение 4 ч, измеряли объем каждой пробы и фиксировали время ее накопления.

В VI серии (2 группы по 10 особей) определяли параметры сыворотки крови (осмоляльность, концентрация креатинина, общего белка, ионов натрия, калия и хлоридов) у крыс в контроле и через 30 мин после перорального введения 0.9%-ного раствора NaCl в объеме 50 мл/кг. В VII серии (3 группы по 10 особей) определяли гематокрит, в сыворотке крови – осмоляльность, концентрацию натрия, калия, хлоридов, общего белка и альбумина через 30 мин после перорального и внутривентрикулярного введения 2.5%-ного раствора NaCl в объеме 18 мл/кг и в контроле. В VIII серии (2 группы по 10 особей) в плазме крови определяли концентрацию ГПП-1, ГПП-2 и оксинтомодулина через 5 мин после перорального введения 2.5%-ного раствора NaCl в объеме 18 мл/кг и в контроле. Контролем в каждой серии служила группа интактных животных из вивария. В VI–VIII сериях экспериментов кровь забирали из сосудов шеи под наркозом (Золетил, Virbac, 50 мг/кг или Телазол, Zoetis, 40 мг/кг, внутримышечно), после чего животных декапитировали. Пробы крови в чистых пластиковых пробирках центрифугировали при 8000 оборотах в течение 15 мин при комнатной температуре на центрифуге MIKRO 20 (Hettich, Германия) для получения сыворотки. Кровь для гематологического и иммуноферментного анализа собирали в охлажденные пробирки с КЗ-ЭДТА (Sarstedt, Германия). Для получения плазмы крови ее немедленно центрифугировали при 2000 оборотах и 4°C в течение 15 мин на центрифуге MIKRO 22R (Hettich, Германия), полученные пробы хранили при –20°C. Концентрацию пептидов в плазме крови определяли колориметрическим методом с помощью наборов для иммуноферментного анализа: ГПП-1 (GLP1 Total ELISA, Millipore, США), ГПП-2 (Rat GLP-2 EIA, Yanaihara, Япония), оксинтомодулин (Rat and Mouse Oxyntomodulin ELISA, Ansh Labs, США). Измерение оптической плотности и расчет концентрации пептидов проводили на микропланшетном ридере ELx808 (Bio-Tek Instruments, США).

Осмоляльность сыворотки крови и мочи определяли криоскопическим методом на микроосмометре 3300 (Advanced Instruments, США), концентрацию креатинина – кинетическим методом по реакции Яффе без депротенинизации на автоматическом

биохимическом анализаторе Erba XL-200 (Erba-Lachema, Чехия), концентрацию ионов натрия, калия и хлоридов в сыворотке крови – с помощью ионоселективного блока автоматического биохимического анализатора Erba XL-200, ионов натрия в моче – на пламенном фотометре Sherwood-420 (Sherwood Scientific, Великобритания). Концентрацию общего белка сыворотки измеряли при помощи биуретового реактива, а альбумина сыворотки – бромкрезолового зеленого на автоматическом биохимическом анализаторе Erba XL-200. Гематокрит определяли на ветеринарном автоматическом гематологическом анализаторе МЕК-6550К (Nihon Kohden, Япония).

Диурез (V), экскрецию осмотически активных веществ ($U_{Osm}V$), ионов натрия ($U_{Na}V$) и хлоридов ($U_{Cl}V$), клиренс креатинина (C_{Cr}) рассчитывали по стандартным формулам и нормализовали на кг массы тела. Полученные данные представлены как среднее значение \pm ошибка среднего ($M \pm m$). Сравнения между группами проводили с помощью критерия Стьюдента с учетом поправки Бонферрони на число сравнений, различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. При корреляционном анализе рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона (r).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В обычных условиях водно-солевого режима (I серия) и функциональной активности дипептидилпептидазы-4 в крови исследуемые кишечные пептиды не оказали эффекта на диурез и экскрецию ионов натрия почками. Введение ГПП-1 на фоне предварительной блокады фермента вилдаглиптином (II серия) вызвало увеличение диуреза в 6.6 раз, экскреции ионов натрия – в 11.5 раз (табл. 1). Продолжительность натрийуретического эффекта ГПП-1 составила 30 мин с максимумом в первые 15 мин эксперимента (рис. 3). Вилдаглиптин сам по себе, а также оксинтомодулин и ГПП-2 в сочетании с вилдаглиптином не оказали эффекта на диуретическую и натрийуретическую функции почек крыс в обычных условиях водно-солевого баланса (табл. 1).

Для исследования веществ с предполагаемой диуретической и натрийуретической активностью принято использовать методики, исключающие влияние различного исходного состояния экспериментальных животных и позволяющие выявить возможные скрытые эффекты. Введение физиологического раствора для стандартизации водно-солевого баланса не повлияло на осмоляльность сыворотки крови, концентрацию ионов натрия и калия, наблюдался рост концентрации хлоридов (табл. 2). В стандартизованных условиях водно-солевого баланса при блокаде дипептидилпептидазы-4 вилдаглиптином (III серия) ГПП-1 вызвал значительный рост диуреза и экскреции натрия, оксинтомодулин не повлиял на функции почек, а ГПП-2 оказал антидиуретический и антинатрийуретический эффекты (табл. 1).

Представляло интерес оценить влияние производных проглюкагона на функции почек в измененных условиях водно-солевого баланса. Было смоделировано состояние гипернатриемии путем введения животным 2.5%-ного раствора NaCl. Как при внутрибрюшинном, так и при пероральном поступлении избытка NaCl в организм выявлен значительный рост концентрации ионов натрия и хлоридов в крови, гиперосмия (табл. 3). В данных экспериментальных условиях у животных не происходило существенного увеличения объема внеклеточной жидкости, о чем свидетельствовало отсутствие изменений гематокрита и содержания альбумина в сыворотке крови и лишь небольшое снижение концентрации общего белка в сыворотке крови после пероральной нагрузки (табл. 3). Изменение концентрации производных проглюкагона в крови оценивали в ответ на поступление 2.5%-ного раствора NaCl через желудочно-кишечный тракт. Выявлены разнонаправленные сдвиги уровня ГПП-1 (рост) и ГПП-2 (снижение) и стабильная концентрация оксинтомо-

Таблица 1. Влияние оксинтомодулина, ГПП-1 и ГПП-2 (1.5 нмоль/кг) на функции почек крыс в обычных и стандартизированных (введение *per os* 7.7 ммоль/кг NaCl в виде 0.9%-ного раствора в объеме 50 мл/кг) условиях

Table 1. The effect of oxynotomodulin, GLP-1 and GLP-2 (1.5 nmol/kg) on rat kidney function under normal and standardized conditions (oral administration of 7.7 mmol/kg NaCl as 0.9% solution in a volume of 50 ml/kg)

Экспериментальные группы Experimental groups	Диурез, мл Diuresis, ml	U_{NaV} , ммоль U_{NaV} , mmol	C_{Cr} , мл/мин C_{Cr} , ml/min
без 0.9%-ного раствора NaCl п.о. without 0.9% NaCl solution <i>per os</i>			
ГПП-1 + В GLP-1 + V	10.7 ± 1.6***	1.50 ± 0.20***	0.31 ± 0.02
ГПП-2 + В GLP-2 + V	0.9 ± 0.1	0.10 ± 0.01	0.27 ± 0.02
оксинтомодулин + В oxynotomodulin + V	1.3 ± 0.3	0.14 ± 0.03	0.30 ± 0.04
физиологический раствор + В saline + V	1.6 ± 0.4	0.13 ± 0.02	0.33 ± 0.01
0.9%-ный раствор NaCl п.о. 0.9% NaCl solution <i>per os</i>			
+ ГПП-1 + В + GLP-1 + V	21.8 ± 2.1*	3.27 ± 0.25**	0.31 ± 0.02
+ ГПП-2 + В + GLP-2 + V	7.1 ± 1.5*	1.16 ± 0.19*	0.36 ± 0.01
+ оксинтомодулин + В + oxynotomodulin + V	16.2 ± 2.1	2.20 ± 0.24	0.30 ± 0.01
+ физиологический раствор + В + saline + V	14.0 ± 2.0	1.93 ± 0.20	0.28 ± 0.02

Животные во всех экспериментальных группах за 30 мин до инъекции пептидов и нагрузочных проб получали вилдаглиптин (В) в дозе 1 мг/кг внутривенно. Каждая экспериментальная группа включала 10 животных. Величины указаны в виде $M \pm m$ за 1 ч на кг массы тела. Значимое отличие при сравнении с соответствующей группой без введения пептидов (применена поправка Бонферрони на 3 сравнения): * – при $p < 0.05$, ** – при $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$.

Animals received vildagliptin (V) at a dose of 1 mg/kg intraperitoneally in all experimental groups 30 min before the injection of peptides and loading tests. Each experimental group included 10 animals. Values are presented as $M \pm m$ for 1 h per kg of body weight. Significant difference compared with the corresponding group without peptide administration (Bonferroni correction for 3 comparisons was applied): * – at $p < 0.05$, ** – at $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$.

Таблица 2. Осмоляльность и концентрация ионов в сыворотке крови крыс через 30 мин после напаивания 0.9%-ным раствором NaCl для стандартизации водно-солевого баланса

Table 2. Osmolality and ion concentration in rat blood serum 30 min following drink with 0.9% NaCl solution to standardize the water-salt balance

Параметр Parameter	Контрольная группа Control group	0.9%-ный раствор NaCl 0.9% NaCl solution
Осмоляльность, мОсмоль/кг H ₂ O Osmolality, mOsmol/kg H ₂ O	300 ± 1	300 ± 1
Натрий, ммоль/л Sodium, mmol/l	145.9 ± 0.2	146.8 ± 0.4
Хлориды, ммоль/л Chlorides, mmol/l	105.0 ± 0.4	108.8 ± 0.6***
Калий, ммоль/л Potassium, mmol/l	4.0 ± 0.1	4.0 ± 0.1

Каждая экспериментальная группа включала 10 животных. Величины указаны в виде $M \pm m$. *** – значимое отличие по сравнению с контрольной группой при $p < 0.001$.

Each experimental group included 10 animals. Values are presented as $M \pm m$. *** – a significant difference compared with the control group at $p < 0.001$.

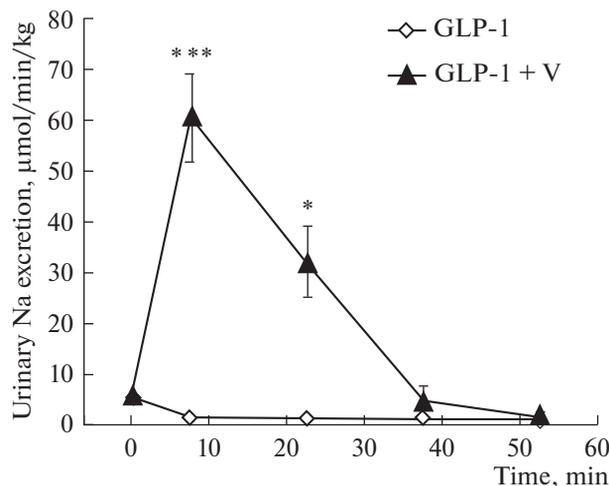


Рис. 3. Продолжительность натрийуретического эффекта ГПП-1, защищенного ингибитором дипептидилпептидазы-4. Каждая экспериментальная группа включала 10 животных. Данные представлены как $M \pm m$ на кг массы тела. Значимое отличие при сравнении с группой без введения вилдаглиптина (V) (применена поправка Бонферрони на 10 сравнений): * – при $p < 0.05$, *** – $p < 0.001$.

Fig. 3. Duration of the natriuretic effect of GLP-1 protected by a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor. Each experimental group included 10 animals. Data are presented as $M \pm m$ per kg of body weight. Significant difference compared with a group without vildagliptin (V) (Bonferroni correction for 10 comparisons was applied): * – at $p < 0.05$, *** – $p < 0.001$.

Таблица 3. Гематокрит и параметры сыворотки крови у крыс в контроле и через 30 мин после пероральной и внутривентриальной нагрузок 2.5%-ным раствором NaCl в объеме 18 мл/кг
Table 3. Hematocrit and blood serum parameters in rats in control group and 30 minutes after oral and intraperitoneal loads with 2.5% NaCl solution in a volume of 18 ml/kg

Параметр Parameter	Контроль Control	2.5%-ный раствор NaCl п.о. 2.5% NaCl solution <i>per os</i>	2.5%-ный раствор NaCl в/бр 2.5% solution of NaCl <i>i.p.</i>
Осмоляльность, мОсмоль/кг H ₂ O Osmolality, mOsmol/kg H ₂ O	302 ± 1	317 ± 1***	317 ± 1***
Натрий, ммоль/л Sodium, mmol/l	143.9 ± 0.3	151.0 ± 0.3***	151.9 ± 0.3***
Хлориды, ммоль/л Chlorides, mmol/l	102.9 ± 0.5	113.3 ± 0.5***	114.7 ± 0.4***
Калий, ммоль/л Potassium, mmol/l	4.1 ± 0.1	4.0 ± 0.1	4.4 ± 0.1*
Общий белок, г/л Total protein, g/l	63.4 ± 0.6	60.2 ± 0.6**	61.3 ± 0.8
Альбумин, г/л Albumin, g/l	29.5 ± 0.2	28.9 ± 0.3	29.2 ± 0.2
Гематокрит, % Hematocrit, %	42.7 ± 0.7	41.5 ± 0.4	41.3 ± 0.6

Каждая экспериментальная группа включала 10 животных. Величины указаны в виде $M \pm m$. Значимое отличие по сравнению с контрольной группой (применена поправка Бонферрони на 2 сравнения): * – при $p < 0.05$, ** – при $p < 0.01$, *** – при $p < 0.001$.

Each experimental group included 10 animals. Values are presented as $M \pm m$. Significant difference compared with the control group (Bonferroni correction for 2 comparisons was applied): * – at $p < 0.05$, ** – at $p < 0.01$, *** – at $p < 0.001$.

Таблица 4. Концентрация пептидов, производных проглюкагона, в плазме крови у крыс в контроле и через 5 мин после пероральной нагрузки 2.5%-ным раствором NaCl в объеме 18 мл/кг
Table 4. Concentration of proglucagon derived peptides in rat plasma in control group and 5 minutes after oral loading with 2.5% NaCl solution in a volume of 18 ml/kg

Параметр Parameter	Контроль Control	2.5%-ный раствор NaCl 2.5% NaCl solution
ГПП-1, пг/мл GLP-1, pg/ml	73 ± 4	108 ± 5***
ГПП-2, пг/мл GLP-2, pg/ml	520 ± 8	488 ± 10*
Оксинтомодулин, пг/мл Oxuntomodulin, pg/ml	161 ± 25	167 ± 40

Каждая экспериментальная группа включала 10 животных. Величины указаны в виде $M \pm m$. Значимое отличие по сравнению с контрольной группой: * – при $p < 0.05$, *** – при $p < 0.001$.
 Each experimental group included 10 animals. Values are presented as $M \pm m$. Significant difference compared with the control group: * – at $p < 0.05$, *** – at $p < 0.001$.

Таблица 5. Влияние ГПП-1 и ГПП-2 (1.5 нмоль/кг) на функции почек крыс при гипернатриемии, вызванной пероральной и внутрибрюшинной нагрузками 7.7 ммоль/кг NaCl (2.5%-ный раствор в объеме 18 мл/кг)
Table 5. The effect of GLP-1 and GLP-2 (1.5 nmol/kg) on the kidney function of rats with hypernatremia caused by oral and intraperitoneal loads of 7.7 mmol/kg NaCl (2.5% solution in a volume of 18 ml/kg)

Экспериментальные группы Experimental groups	Диурез, мл Diuresis, ml	U_{NaV} , ммоль U_{NaV} , mmol	U_{ClV} , ммоль U_{ClV} , mmol	C_{Cr} , мл/мин C_{Cr} , ml/min
2.5%-ный раствор NaCl п.о. 2.5% NaCl solution <i>per os</i>				
+ ГПП-1 + В + GLP-1 + V	13.2 ± 1.8	2.96 ± 0.36	2.09 ± 0.23	0.34 ± 0.03
+ ГПП-2 + В + GLP-2 + V	6.9 ± 0.6***	2.04 ± 0.14**	1.81 ± 0.12**	0.37 ± 0.01
+ физиологический раствор + В + saline + V	11.8 ± 0.9	3.26 ± 0.26	2.62 ± 0.20	0.37 ± 0.02
2.5%-ный раствор NaCl в/бр 2.5% solution of NaCl i.p.				
+ ГПП-1 + В + GLP-1 + V	11.1 ± 1.1**	3.25 ± 0.32*	2.46 ± 0.21*	0.35 ± 0.02
+ ГПП-2 + В + GLP-2 + V	4.7 ± 0.5	1.68 ± 0.16	1.54 ± 0.13	0.38 ± 0.02
+ физиологический раствор + В + saline + V	5.9 ± 0.4	2.07 ± 0.11	1.77 ± 0.11	0.37 ± 0.02

Животные во всех экспериментальных группах за 30 мин до инъекции пептидов и нагрузочных проб получали вилдаглиптин (В) в дозе 1 мг/кг внутрибрюшинно. Каждая экспериментальная группа включала 10 животных. Величины указаны в виде $M \pm m$ за 1 ч на кг массы тела. Значимость отличий от эффекта нагрузочной пробы без инъекции пептидов (применена поправка Бонферрони на 2 сравнения): * – при $p < 0.05$, ** – при $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$.

Animals received vildagliptin (V) at a dose of 1 mg/kg intraperitoneally in all experimental groups 30 minutes before the injection of peptides and loading tests. Each experimental group included 10 animals. Values are presented as $M \pm m$ for 1 h per kg of body weight. Significance of differences from the effect of a loading test without peptide injection (Bonferroni correction for 2 comparisons was applied): * – at $p < 0.05$, ** – at $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$.

дулина после пероальной нагрузочной пробы (табл. 4). Учитывая данные об изменении секреции ГПП-1 и ГПП-2 в ответ на пероральную нагрузку NaCl, эффекты этих регуляторных пептидов были изучены в условиях гипернатриемии.

При инъекции ГПП-1 на фоне гипернатриемии, развившейся вследствие перорального введения NaCl (IV серия), величина диуреза и экскреции натрия за 1 ч эксперимента не менялись (табл. 5), однако, ГПП-1 ускорил выведение нагрузки.

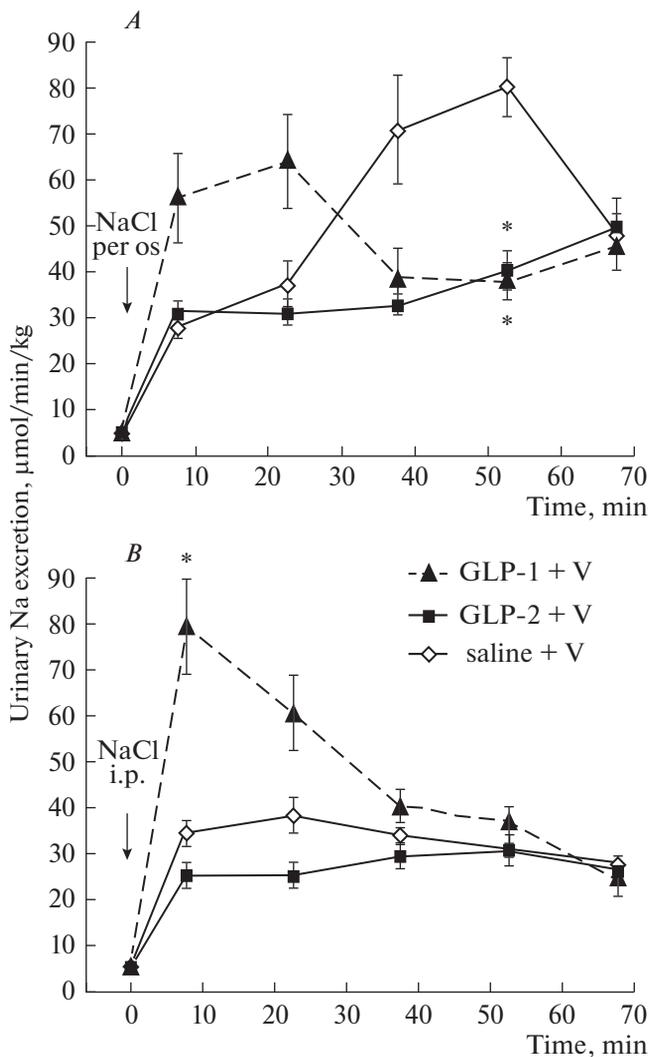


Рис. 4. Экскреция натрия почками после инъекции ГПП-1 и ГПП-2 (1.5 нмоль/кг) на фоне перорального (A) и внутривнутрибрюшинного (B) введения 2.5%-ного раствора NaCl.

Животные во всех экспериментальных группах за 30 мин до инъекции пептидов и нагрузочных проб получали вилдаглиптин (V) в дозе 1 мг/кг внутривнутрибрюшинно. Каждая экспериментальная группа включала 10 животных. Стрелка – момент введения пептида и нагрузки. Данные представлены как $M \pm m$ на кг массы тела. Значимое отличие при сравнении с группой без инъекции пептидов (применена поправка Бонферрони на 18 сравнений): * – при $p < 0.05$.

Fig. 4. Urinary sodium excretion after injection of GLP-1 and GLP-2 (1.5 nmol/kg) with oral (A) and intraperitoneal (B) administration of 2.5% NaCl solution.

Animals received vildagliptin (V) at a dose of 1 mg/kg intraperitoneal in all experimental groups 30 minutes before the injection of peptides and loading tests. Each experimental group included 10 animals. Arrow – the moment of peptide injection and loading tests. Data are presented as $M \pm m$ per kg of body weight. Significant difference compared with a group without peptide injection (Bonferroni correction for 18 comparisons was applied):

* – at $p < 0.05$.

Пик диуреза, экскреции натрия (рис. 4) и хлоридов наблюдался на 30 мин раньше. Введение ГПП-1 на фоне гипернатриемии, вызванной внутривенным введением NaCl (V серия) вызвало рост диуреза, экскреции натрия и хлоридов, значения показателей были сопоставимы с таковыми за 1 ч эксперимента при пероральном поступлении раствора хлорида натрия без введения пептида (табл. 5). Максимальный эффект наблюдался в течение 30 мин от момента инъекции препарата, пик выведения натрия отмечен в первые 15 мин эксперимента (рис. 4). ГПП-2 уменьшил рост диуреза, экскреции ионов натрия (табл. 5) и хлоридов с мочой в ответ на пероральное поступление NaCl, максимальный эффект наблюдался с 30-й по 60-ю мин от момента инъекции пептида (рис. 4). При внутривенном введении 2.5%-ного раствора NaCl ГПП-2 не вызвал изменений диуреза и выведения натрия (табл. 5). Скорость клубочковой фильтрации во всех экспериментальных сериях не менялась, а существенные изменения диуреза тесно коррелировали с величинами экскреции натрия и хлоридов ($r = 0.94-0.98$ для натрия, $r = 0.92-0.98$ для хлоридов). Полученные данные указывают на то, что во всех случаях изменения скорости мочеобразования являлись, главным образом, следствием различий в канальцевой реабсорбции электролитов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Поступление ионов натрия, а также их потеря с физиологическими жидкостями и при патологии могут приводить к серьезным нарушениям водно-солевого баланса, однако, незамедлительный ответ со стороны многих органов и систем способствует его нормализации. Предполагалось, что связь желудочно-кишечного тракта и почек вносит существенный вклад в поддержание постоянства концентрации натрия во внутренней среде организма, что является важным условием его оптимального функционирования. Пероральное поступление растворов солей является стимулом секреции регуляторных пептидов энтероэндокринными клетками при участии нервной и эндокринной системы. Это происходит еще до наступления изменений параметров водно-солевого баланса [25]. Почки, в свою очередь, в ответ на действие самих пептидов или других биологически активных веществ, секретирующихся под их влиянием, на клетки канальцев нефронов могут изменить процессы секреции и реабсорбции ионов. Нами экспериментально был оценен индивидуальный вклад каждого из ко-секретируемых L-клетками кишечника производных проглюкагона в изменение функций почек.

Установлено, что введение исследуемых пептидов животным, содержащимся в обычных условиях в виварии, не оказало влияния на экскрецию натрия почками. Это могло быть связано с быстрой деградацией кишечных пептидов дипептидилпептидазой-4 [26, 27]. Предварительная блокада дипептидилпептидазы-4 вилдаглиптином выявила диуретический и натрийуретический эффекты ГПП-1, но не ГПП-2 и оксинтодулина. В обычных условиях водно-солевого баланса выявить усиление обратного всасывания натрия в почках под влиянием биологически активных веществ затруднительно, так как практически весь профильтровавшийся натрий и так подвергается реабсорбции. Стандартизация водно-солевого баланса введением физиологического раствора позволила не только уменьшить влияние различий в исходном состоянии животных, но и оценить потенциальное антинатрийуретическое действие пептидов. Выявлено разнонаправленное влияние ко-секретирующихся продуктов проглюкагона. В отличие от ГПП-1, вызвавшего значительный рост диуреза и натрийуреза, оксинтодулин не повлиял на функции почек, а ГПП-2 оказал антидиуретическое и антинатрийуретическое действие.

Для понимания связи между изменением содержания регуляторных пептидов в плазме крови и их эффектами на выведение натрия и хлоридов почками смодели-

ровано состояние гипернатриемии. Введение ГПП-1 в условиях перорального поступления 2.5%-ного раствора NaCl не привело к какому-либо изменению в величине диуреза, экскреции ионов натрия и хлоридов. Полученные результаты можно считать закономерными, если предположить, что введение нагрузки в желудочно-кишечный тракт в необходимой степени стимулирует секрецию эндогенного пептида, а его дополнительное поступление извне не может усилить эффект на функции почек. Это подтверждается сопоставимыми величинами диуреза и экскреции ионов в ответ на пероральную нагрузку NaCl и при действии ГПП-1 на фоне внутрибрюшинной нагрузки, не вызывающей секрецию эндогенного пептида [28]. Небольшое ускорение выведения избытка хлорида натрия из организма при действии ГПП-1 на фоне пероральной нагрузки NaCl, вероятно, обусловлено отсутствием временной задержки, необходимой L-клеткам кишечника для секреции пептида в кровь, и защитой вилдаглиптином как эндогенного, так и инъецированного пептида от деградации дипептидилпептидазой-4.

ГПП-2 приводит к задержке выведения электролитов после пероральной нагрузки NaCl, снижая диурез и экскрецию натрия и хлоридов. То есть, он обладает противоположными с ГПП-1 регуляторными эффектами на функции почек в этих условиях. Ранее противоположные эффекты этих пептидов были описаны при изучении регуляции метаболизма хиломикрон в кишечнике [29]. В соответствии с данными литературы ГПП-1 и ГПП-2 взаимодействуют с разными рецепторами [14, 30], однако, отсутствуют свидетельства локализации рецепторов ГПП-2 в почке и способности пептида непосредственно влиять на секрецию ГПП-1. Можно предположить, что действие ГПП-2 реализуется опосредованно через секрецию других биологически активных веществ и гормонов или через изменение функционального состояния симпатической и парасимпатической нервной системы. Установлена локализация рецептора ГПП-2 на афферентных нейронах ганглиев блуждающего нерва [31], показан его гипотензивный эффект при периферическом и центральном введении [32]. Однако отсутствуют исследования, подтверждающие прямое или косвенное влияние ГПП-2 на нервную регуляцию функций почек. В работе Yusta и соавт. [14] описано глюкагонотропное действие ГПП-2, поэтому антинатрийуретический эффект ГПП-2 может быть следствием способности глюкагона усиливать реабсорбцию ионов натрия в восходящей части петли Генле [33, 34]. Дизайн проведенного нами исследования не позволяет исключить опосредованного влияния ГПП-2 на почечную гемодинамику. Однако результаты других исследований не выявляли эффектов ГПП-2 на кровоток в почках при значимом NO-зависимом усилении эндогенным и инъецированным ГПП-2 кровотока в мезентериальных и каротидных сосудах [35]. Необходимо продолжить анализ механизмов действия ГПП-2 на функции почек для более точного понимания системы регуляции баланса натрия в физиологическом состоянии и, что более важно, при различных формах патологии, сопровождающихся задержкой натрия и жидкости в организме.

Таким образом, производные проглюкагона, ГПП-1 и ГПП-2, оказывают влияние на выведение натрия почками как при его обычном, так и при избыточном содержании в организме животных. Несмотря на образование из общего предшественника в L-клетках кишечника, при избыточном поступлении NaCl через желудочно-кишечный тракт как изменение секреции этих регуляторных пептидов, так и их эффекты на экскрецию натрия почками противоположно направлены.

Исследования выполнены с использованием оборудования ЦКП ИЭФБ РАН.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания (рег. № АААА-А18-118012290371-3) при частичной поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 18-315-00291 мол_а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Greenwood M. P., Greenwood M., Paton J. F., Murphy D. Salt appetite is reduced by a single experience of drinking hypertonic saline in the adult rat. *PLoS One*. 9(8): e104802. 2014.
2. Epstein A. N. Control of salt intake by steroids and cerebral peptides. *Pharmacol. Res.* 25: 113–124. 1992.
3. Vivas L., Godino A., Dalmaso C., Caeiro X.E., Macchione A.F., Cambiasso M.J. Neurochemical circuits subserving fluid balance and baroreflex: A role for serotonin, oxytocin, and gonadal steroids. In: De Luca L.A. Jr., Menani J.V., Johnson A.K. (Eds). *Neurobiology of body fluid homeostasis: Transduction and integration*. Boca Raton (FL). CRC Press/Taylor & Francis. 2014.
4. Godino A., De Luca L.A. Jr., Antunes-Rodrigues J., Vivas L. Oxytocinergic and serotonergic systems involvement in sodium intake regulation: Satiety or hypertonicity markers? *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293: R1027–R1036. 2007.
5. Bankir L., Perucca J., Norsk P., Bouby N., Damgaard M. Relationship between Sodium Intake and Water Intake: The False and the True. *Ann. Nutr. Metab.* 70(Suppl. 1): 51–61. 2017.
6. Balmert R.J., Brimble M.J., Forsling M.L., Musabayane C.T. Natriuretic response of the rat to plasma concentrations of arginine vasopressin within the physiological range. *J. Physiol.* 352: 517–526. 1984.
7. Park R.G., Congiu M., Denton D.A., McKinley M.J. Natriuresis induced by arginine vasopressin infusion in sheep. *Am. J. Physiol.* 249(6 Pt. 2): F799–F805. 1985.
8. Verbalis J.G., Mangione M.P., Stricker E.M. Oxytocin produces natriuresis in rats at physiological plasma concentrations. *Endocrinology*. 128(3): 1317–1322. 1991.
9. McCann S.M., Franci C.R., Favaretto A.L., Gutkowska J., Antunes-Rodrigues J. Neuroendocrine regulation of salt and water metabolism. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30(4): 427–441. 1997.
10. McKinley M.J., Lichardus B., McDougall J.G., Weisinger R.S. Periventricular lesions block natriuresis to hypertonic but not isotonic NaCl loads. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 262: F98–F107. 1992.
11. Singer D.R., Markandu N.D., Buckley M.G., Miller M.A., Sagnella G.A., MacGregor G.A. Contrasting endocrine responses to acute oral compared with intravenous sodium loading in normal humans. *Am. J. Physiol.* 274: F111–F119. 1998.
12. Andersen L.J., Andersen J.L., Pump B., Bie P. Natriuresis induced by mild hypernatremia in humans. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 282: R1754–R1761. 2002.
13. Kutina A.V., Golosova D.V., Marina A.S., Shakhmatova E.I., Natochin Y.V. Role of vasopressin in the regulation of renal sodium excretion: interaction with glucagon-like peptide-1. *J. Neuroendocrinol.* 28(4): 1–8. 2016.
14. Yusta B., Huang L., Munroe D., Wolff G., Fantaske R., Sharma S., Demchyshyn L., Asa S.L., Drucker D.J. Enteroendocrine localization of GLP-2 receptor expression in humans and rodents. *Gastroenterology*. 119(3): 744–755. 2000.
15. Holst J.J. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev.* 87(4): 1409–1439. 2007.
16. Nauck M.A., Meier J.J. Incretin hormones: Their role in health and disease. *Diabetes Obes. Metab.* 20(Suppl. 1): 5–21. 2018.
17. Crajoinas R.O., Oricchio F.T., Pessoa T.D., Pacheco B.P., Lessa L.M., Malnic G., Girardi A.C. Mechanisms mediating the diuretic and natriuretic actions of the incretin hormone glucagon-like peptide-1. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 301(2): F355–F363. 2011.
18. Thomson S.C., Kashkoui A., Singh P. Glucagon-like peptide-1 receptor stimulation increases GFR and suppresses proximal reabsorption in the rat. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 304(2): F137–F144. 2013.
19. Natochin Yu.V., Marina A.S., Kutina A.V. The role of incretin as an integrator of sodium and water balance regulation. *Dokl. Biol. Sci.* 458: 271–274. 2014.
20. Day J.W., Ottaway N., Patterson J.T., Gelfanov V., Smiley D., Gidda J., Findeisen H., Bruemmer D., Drucker D.J., Chaudhary N., Holland J., Hembree J., Ablanalp W., Grant E., Ruehl J., Wilson H., Kirchner H., Lockie S.H., Hofmann S., Woods S.C., Nogueiras R., Pfluger P.T., Perez-Tilve D., DiMarchi R., Tschop M. H. A new glucagon and GLP-1 co-agonist eliminates obesity in rodents. *Nat. Chem. Biol.* 5(10): 749–757. 2009.
21. Wynne K., Field B. C., Bloom S. R. The mechanism of action for oxyntomodulin in the regulation of obesity. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 11(10): 1151–1157. 2010.
22. Shin E.D., Drucker D.J., Brubaker P.L. Glucagon-like peptide 2: an update. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes.* 12: 63–71. 2005.
23. Kau S.T., Keddie J.R., Andrews D. A method for screening diuretic agents in the rat. *J. Pharmacol. Methods.* 11(1): 67–75. 1984.
24. Lahlou S., Tahraoui A., Israili Z., Lyoussi B. Diuretic activity of the aqueous extracts of *Carum carvi* and *Tanacetum vulgare* in normal rats. *J. Ethnopharmacol.* 110(3): 458–463. 2007.
25. Muskiet M.H.A., Tonneijck L., Smits M.M., van Baar M. J.B., Kramer M.H.H., Hoorn E.J., Joles J.A., van Raalte D.H. GLP-1 and the kidney: from physiology to pharmacology and outcomes in diabetes. *Nat. Rev. Nephrol.* 13(10): 605–628. 2017.

26. Hansen L., Deacon C.F., Orskov C., Holst J.J. Glucagon-like peptide-1-(7–36)amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9–36)amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine. *Endocrinology*. 140(11): 5356–5363. 1999.
27. Mentlein R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26) – role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul. Pept.* 85(1): 9–24. 1999.
28. Marina A.S., Kutina A.V., Shakhmatova E.I., Natochin Yu.V. Involvement of glucagon-like peptide-1 in the regulation of selective excretion of sodium or chloride ions by the kidneys. *Bull. Exp. Biol. Med.* 162(4): 436–440. 2017.
29. Lutz T.A., Osto E. Glucagon-like peptide-1, glucagon-like peptide-2, and lipid metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 27(3): 257–263. 2016.
30. Janssen P., Rotondo A., Mule F., Tack J. Review article: a comparison of glucagon-like peptides 1 and 2. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 37(1): 18–36. 2013.
31. Nelson D.W., Sharp J.W., Brownfield M.S., Raybould H.E., Ney D.M. Localization and activation of glucagon-like peptide-2 receptors on vagal afferents in the rat. *Endocrinology*. 148(5): 1954–1962. 2007.
32. Iwai T., Kaneko M., Sasaki-Hamada S., Oka J. Characterization of the hypotensive effects of glucagon-like peptide-2 in anesthetized rats. *Neurosci. Lett.* 550: 104–108. 2013.
33. Bailly C., Imbert-Teboul M., Chabardes D., Hus-Citharel A., Montegut M., Clique A., Morel F. The distal nephron of rat kidney: a target site for glucagon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 3422–3424. 1980.
34. Morel F. Sites of hormone action in the mammalian nephron. *Am. J. Physiol. Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 240: F159–F164. 1981.
35. Deniz M., Bozkurt A., Kurtel H. Mediators of glucagon-like peptide 2-induced blood flow: responses in different vascular sites. *Regul. Pept.* 142(1–2): 7–15. 2007.

Effect of Glucagon-Like Peptides and Oxyntomodulin on Urinary Sodium Excretion in Rats

E. V. Balbotkina^a, *, T. A. Karavashkina^a, T. V. Kovaleva^a, and A. V. Kutina^a

^a*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia*

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

Maintaining sodium balance is ensured by a clear correspondence of salt intake through the gastrointestinal tract and its excretion mainly by the kidneys. It is of interest to evaluate the functional relationship of the digestive system and the kidneys and its contribution to maintaining a constant sodium concentration in the internal environment of the body. The aim of the study was to evaluate the participation of gut peptides, proglucagon derivatives, in the regulation of urinary sodium excretion. The diuretic and natriuretic effects of the intraperitoneal administration of oxyntomodulin, glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and glucagon-like peptide-2 (GLP-2) at a dose of 1.5 nmol/kg were studied under normal and standardized (drink with 0.9% solution NaCl in a volume of 50 ml/kg) conditions of water-salt balance. An increase in urination and sodium excretion under the action of GLP-1 and a decrease in diuresis and natriuresis after injection of GLP-2 were shown. The effect of oxyntomodulin on kidney function has not been identified. The secretory response of the studied peptides to the load with oral administration of a 2.5% NaCl solution causing hypernatremia was evaluated: after 5 min an increase in GLP-1 concentration and a decrease in GLP-2 in the blood were observed, the level of oxyntomodulin did not change. The effect of peptides on the excretion of excess sodium and chloride by the kidneys during hypernatremia after oral and intraperitoneal administration of 2.5% NaCl solution (18 ml/kg) was studied. Injection of GLP-1 increased diuresis, excretion of sodium and chloride by the kidneys with an intraperitoneal NaCl load and accelerated the elimination of ions after oral loading. The anti-diuretic and anti-natriuretic effects of GLP-2 were revealed upon administration of the hormone with an oral NaCl load. Thus, derivatives of proglucagon, GLP-1 and GLP-2, are involved in the regulation of sodium balance. With an excessive intake of NaCl through the gastrointestinal tract, both the change of secretion of these regulatory peptides and their effects on urinary sodium excretion are oppositely directed.

Keywords: glucagon-like peptide-1, glucagon-like peptide-2, oxyntomodulin, loading test, natriuresis, hypernatremia, kidney

ЦИТИРОВАТЬ:

Балботкина Е.В., Каравашкина Т.А., Ковалева Т.В., Кутина А.В. Влияние глюкагоноподобных пептидов и оксинтомодулина на экскрецию ионов натрия почками у крыс. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(8): 1041–1054.

DOI: 10.31857/S0869813920080026

TO CITE THIS ARTICLE:

Balbotkina E.V., Karavashkina T.A., Kovaleva T.V., Kutina A.V. Effect of Glucagon-Like Peptides and Oxyntomodulin on Urinary Sodium Excretion in Rats. Russian Journal of Physiology. 106(8): 1041–1054.

DOI: 10.31857/S0869813920080026

ПАМЯТИ ВИКТОРА ИСАЕВИЧА ГОВАРДОВСКОГО



26 июня 2020 г. ушел из жизни замечательный человек и крупный ученый-физиолог, эволюционист, философ науки, доктор биологических наук профессор Виктор Исаевич Говардовский.

Всю свою жизнь Виктор Исаевич проработал в Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук. Классический “технар” по образованию, в 1962 г. он с отличием окончил Ленинградский электротехнический институт и был принят инженером по обслуживанию электронного микроскопа в Лабораторию эволюционной морфологии, руководимой профессором Я.А. Винниковым. Переход к исследовательской деятельности и к созданию собственного научного направления – сравнительному изучению зрительной рецепции – не занял у Виктора Исаевича много времени. В 1967 году он защитил кандидатскую, а в 1978 г. – докторскую диссертацию.

Обширный ряд животных: миноги, разные виды рыб, амфибий, птиц был привлечен им для сравнительного изучения систем цветового зрения. Для этого, при помощи электрофизиологических методов, иммуноцитохимии и микроспектрофотометрии исследовались функциональные свойства фоторецепторов и зрительных пигментов многих видов животных. Он создал уникальный прибор – скоростной поляризационный микроспектрофотометр, и разработал метод, позволяющий изучать зрительные циклы в одиночных интактных палочках и колбочках сетчатки, который и в настоящее время применяют в ведущих лабораториях мира.

В.И. Говардовский был разносторонним исследователем. Он многое сделал для выяснения механизмов электрической рецепции черноморских скатов. Институт медико-биологических проблем РАН привлек В.И. Говардовского совместно с Д.В. Лычаковым, Ф.Г. Грибакиным и другими сотрудниками лаборатории Я.А. Винникова, к изучению влияния невесомости на структуру и развитие

вестибулярного аппарата для медико-биологического обеспечения орбитальных полетов. В.И. Говардовский внес большой вклад в развитие космической биологии не только как ученый-морфолог, но и как инженер-проектировщик оригинальных биоконтейнеров, используемых для полетов на кораблях “Союз” и орбитальных станциях “Салют” в 60–80-е годы.

Виктора Исаевича всегда интересовала загадка сдвига чувствительности скотопического зрения в коротковолновую область (“сдвиг Пуркинье”), и он сделал огромный вклад в понимание основных закономерностей функциональной эволюции зрительной системы, фундаментальных принципов строения фоторецепторных клеток сетчатки и отбора зрительных пигментов в соответствии со световой средой обитания. В особенности, учитывая, что собственный шум зрительного пигмента может быть важным фактором, который ограничивает чувствительность зрения и контролирует выбор типа пигмента.

В этом номере Российского физиологического журнала им. И.М. Сеченова публикуется последняя статья Виктора Исаевича, посвященная биофотонике и зрительным феноменам. В ней он предлагает универсальный механизм, лежащий в основе многих, до сих являющихся загадочными, феноменов.

Уход Виктора Исаевича – невосполнимая потеря для всех нас, его сотрудников, друзей, коллег, для всех, кто хоть раз имел счастье общаться с ним. Всю свою жизнь В.И. Говардовский был не только успешным ученым, одним из наиболее цитируемых российских исследователей в области сенсорной физиологии, но и учителем и воспитателем нескольких поколений своих учеников, нравственным эталоном жизни в науке.

М.Л. Фирсов, директор ИЭФБ РАН