

СОДЕРЖАНИЕ

Том 58, номер 5, 2022

Все статьи журнала по соглашению авторов с компанией Pleiades Publishing, Ltd. публикуются на английском языке в "Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology" ISSN 0022-0930, ©Pleiades Publishing, Ltd.

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

- Регуляция концентраций ионов калия и хлорид-ионов в нервной ткани как метод противосудорожной терапии
Е. Ю. Проскурина, А. В. Зайцев 349
- Слуховая адаптация к характеристикам речевого сигнала
И. Г. Андреева, Е. А. Огородникова 365
-

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Воздействие системной гипотермии на реакции пиальных артерий при острой массивной кровопотере у наркотизированных крыс линии Wistar
Н. Н. Мельникова 380
- Инфаркт-лимитирующий эффект посткондиционирования с помощью L-лактата у молодых и старых крыс при блокаде М-холинорецепторов атропином
Ф. И. Висмонт, С. Н. Чепелев, С. В. Губкин 391
- Дифференциальная экспрессия мРНК титина и обскурина в поперечно-полосатых мышцах длиннохвостого суслика *Urocitellus undulatus*
Ю. В. Грицына, М. А. Грабарская, Г. З. Михайлова, С. С. Попова, Л. Г. Бобылева, А. М. Ермаков, Н. М. Захарова, И. М. Вихлянец 402
- Влияние донора оксида азота S-нитрозоглутатиона на экспрессию конститутивного андростанового рецептора
Ю. В. Абаленихина, Е. А. Судакова, А. А. Сеидкулиева, А. В. Шулькин, Е. Н. Якушева 410
- Сравнительная характеристика механических свойств капсулы брыжеечных лимфатических узлов молодых и стареющих быков
Г. И. Лобов, М. Е. Косарева 421
- Влияние Ni²⁺ на сердечный и дыхательный ритмы у новорожденных крысят
С. В. Кузнецов, Н. Н. Кузнецова 434
- Динамика двигательной активности и температуры тела у дальневосточных лесных и домашних котов в осенне-зимний период
В. М. Ковальзон, А. Д. Комарова, Г. С. Алексеева, М. Н. Ерофеева, С. В. Найденко 447
-
-

Contents

Vol. 58, No. 5, 2022

REVIEWS

Regulation of Potassium and Chloride Ion Concentrations
in Nervous Tissue as a Method of Anticonvulsant Therapy

E. Y. Proskurina, and A. V. Zaitsev

349

Auditory Adaptation to Speech signal Characteristics

I. G. Andreeva, and E. A. Ogorodnikova

365

EXPERIMENTAL ARTICLES

Effect of Systemic Hypothermia on Reactions of the Pial Arteries
after Acute Massive Blood Loss in Anesthetized Wistar Rats

N. N. Melnikova

380

Myocardial Infarct Size-limiting Effect of Postconditioning with l-lactate
in Young and Old Rats under Atropine-induced Blockade of M-cholinoreceptors

F. I. Vismont, S. N. Chepelev, and S. V. Goubkin

391

Differential Expression of Titin and Obscurin mRNA in Striated Muscles
of the Long-tailed Ground Squirrel *Urocitellus undulatus*

*Yu. V. Gritsyna, M. A. Grabarskaya, G. Z. Mikhailova, S. S. Popova,
L. G. Bobyleva, A. M. Ermakov, N. M. Zakharova, and I. M. Vikhlyantsev*

402

Effect of the Nitrogen Oxide Donor S-Nitrosoglutathione on Expression
of the Constitutive Androstane Receptor

*Yu. V. Abalenikhina, E. A. Sudakova, A. A. Seidkuliyeva,
A. V. Shchulkin, and E. N. Yakusheva*

410

Comparative Characterization of Capsule Mechanical Properties
in Mesenteric Lymph Nodes of Young and Aging Bulls

G. I. Lobov, and M. E. Kosareva

421

Effects of NI^{2+} on Cardiac and Respiratory Rhythms in Newborn Rats

S. V. Kuznetsov, and N. N. Kuznetsova

434

Motor Activity Dynamics and Body Temperature in Far Eastern Forest
and Domestic Cats in the Fall–Winter Period

*V. M. Kovalzon, A. D. Komarova, G. S. Alekseeva,
M. N. Erofeeva, and S. V. Naidenko*

447

РЕГУЛЯЦИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ ИОНОВ КАЛИЯ И ХЛОРИД-ИОНОВ В НЕРВНОЙ ТКАНИ КАК МЕТОД ПРОТИВОСУДОРОЖНОЙ ТЕРАПИИ

© 2022 г. Е. Ю. Проскурина^{1,2,*}, А. В. Зайцев²

¹ Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

² Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: elena.yu.proskurina@gmail.com

Поступила в редакцию 30.08.2021 г.

После доработки 05.08.2022 г.

Принята к публикации 09.08.2022 г.

При некоторых патологических состояниях, например, фармакорезистентной эпилепсии, эпилептическом статусе или определенных формах генетических аномалий спайковая активность ГАМКергических интернейронов может усиливать процессы возбуждения в нервной ткани и провоцировать генерацию икctalного разряда. В результате противосудорожные средства, действующие на ГАМКергическую систему, могут оказаться неэффективными или даже усиливать судорожную активность. Этот парадоксальный эффект работы тормозной системы обусловлен нарушением ионного баланса в нервной ткани. В данном обзоре рассмотрены механизмы инициации икctalного разряда в нейронных сетях из-за нарушения баланса хлорид-ионов и ионов калия, а также возможные методы воздействия на регуляцию ионных концентраций. Для подавления эпилептической активности, вызванной дисбалансом ионов, эффективным может оказаться как усиление (или ослабление) активности определенных транспортеров ионов и ионных насосов в нейронах, так и их дополнительная экспрессия с помощью генной терапии. В поддержании необходимых концентраций ионов калия и хлора в нервной ткани важное значение имеют NaK-помпа, NKCC1- и KCC2-котранспортеры, которые ранее неоднократно рассматривались в качестве фармакологических мишеней для противоэпилептического воздействия. Препятствием для работы в этом направлении является отсутствие достаточно селективных фармакологических инструментов для воздействия на них, а также методов доставки препаратов к эпилептическому очагу. Более перспективным направлением представляется использование методов генной терапии, таких как гиперэкспрессия транспортера KCC2 в эпилептическом очаге. Другим возможным направлением может стать применение оптогенетических инструментов: специально сконструированных светочувствительных ионных помп или каналов. В этом случае энергия фотонов может быть использована для создания требуемых градиентов хлорид-ионов и ионов калия, однако и у этих методов пока есть существенные ограничения, которые затрудняют их быстрое введение в практику.

Ключевые слова: эпилепсия, оптогенетика, генная терапия, KCC2-котранспортер, Kir4.1-канал

DOI: 10.31857/S0044452922050096

ВВЕДЕНИЕ

Эпилепсия – распространенное неврологическое заболевание, основным проявлением которого являются повторяющиеся судорожные приступы. Примерно у 30% больных эпилептические приступы плохо поддаются фармакологическому контролю [1]. Это подтверждает необходимость поиска новых методов лечения, воздействующих на альтернативные мишени и патофизиологические механизмы генерации судорожной активности. В настоящее время для лечения эпилепсии используют препараты, ключевой механизм действия которых заключается в модуляции работы потенциал-зависимых натриевых и кальциевых каналов, либо эти лекарства обеспечивают потенцирование

тормозных ГАМК-рецепторов или ингибирование возбуждающих глутаматных рецепторов [2].

Среди множества патологических изменений, наблюдаемых в эпилептическом очаге, в том числе при фармакорезистентной эпилепсии, следует отдельно выделить нарушение ионного баланса, приводящее к нарушению функций тормозной ГАМКергической системы и гипервозбудимости нейронов. К наиболее выраженному эпилептогенному эффекту приводят накопление внутриклеточных хлорид-ионов и повышение внеклеточной концентрации катионов калия. Подробный анализ ионной динамики в здоровой и эпилептической ткани можно найти в работе Raimondo и соавт. [3]. Дисбаланс хлорид-ионов в эпилептической ткани детально обсуждал-

ся в обзорах [4, 5]. Эпилептогенный эффект ионов калия описан de Curtis и соавт. [6]. Модельные исследования также указывают на критическую роль ионной динамики в ткани мозга для генерации как интериктальных, так и иктальных разрядов [7, 8].

Таким образом, снизить гипервозбудимость нейронов и восстановить функции ГАМКергической системы в эпилептическом очаге возможно, если направленно изменить ионный баланс в данной области мозга. Цель данного обзора — проанализировать и описать наиболее перспективные способы воздействия на ионный баланс в эпилептическом очаге, что может стать основой для разработки новых подходов лечения фармакорезистентной эпилепсии. Мы последовательно рассмотрим, какие изменения ионной динамики наблюдаются при эпилептической активности, к каким последствиям они приводят, а затем опишем возможные способы воздействия на ионную динамику.

ДИСБАЛАНС ИОНОВ КАЛИЯ ПРИ ЭПИЛЕПТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Потенциал покоя нейрона определяется в первую очередь градиентом ионов калия внутри и вне клетки. В норме концентрация ионов калия во внеклеточной среде мозга составляет 3 мМ, а в нейронах млекопитающих 140 мМ. Согласно уравнению Нернста, потенциал реверсии ионов калия E_{rev} зависит от концентрации этих ионов на внутренней стороне мембраны $[K^+]_i$ и наружной $[K^+]_o$ по следующей формуле (Ур. 1):

$$E_{\text{rev}} = \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{[K^+]_o}{[K^+]_i} \right), \quad (1)$$

где z — это заряд иона, F — постоянная Фарадея, R — универсальная газовая постоянная, T — температура.

Движущая сила электрохимического градиента ионов калия ΔV представляет собой разницу между мембранным потенциалом $V(t)$ и потенциалом реверсии ионов калия E_{rev} (Ур. 2):

$$\Delta V = V(t) - \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{[K^+]_o}{[K^+]_i} \right). \quad (2)$$

Согласно уравнению 2, повышение концентрации ионов калия во внеклеточной среде в два раза вызовет деполяризацию мембраны на 19 мВ.

Экспериментальную регистрацию внеклеточной концентрации ионов калия обычно производят с помощью калий-чувствительного электрода [9]. Метод изготовления калий-чувствительных электродов для нейрофизиологических экспериментов подробно описан в работах [10, 11].

Впервые повышение концентрации ионов калия во время генерации эпилептиформных разря-

дов *in vitro* было описано еще в 70-е годы прошлого столетия [12–14]. В дальнейшем это явление было независимо подтверждено в различных лабораториях. Пример записи регистрации внеклеточной концентрации ионов калия с помощью монополярного микроэлектрода одновременно с регистрацией спайковой активности или постсинаптических токов нейронов методом патч-кламп в срезах гиппокампа и энторинальной коры крысы в 4-аминопиридиновой модели эпилептиформной активности, проведенной в нашей лаборатории, показан на рис. 1 (приведено из [11]).

Внеклеточная концентрация ионов калия в каждый момент времени вычисляется по формуле (Ур. 3):

$$[K^+]_o(t) = [K^+]_{o, \text{baseline}} e^{SV(t)}, \quad (3)$$

где $[K^+]_{o, \text{baseline}}$ — концентрация ионов калия во внеклеточном растворе, S — калибровочный коэффициент, определяется экспериментально для каждого электрода путем измерения потенциала $V(t)$ на электроде в растворах с разными концентрациями $[K^+]$.

При отсутствии спайковой активности в нейронной сети внеклеточная концентрация ионов калия не изменяется и соответствует значению в омывающем срезу растворе (в приведенном примере 2.5 мМ). Во время эпилептических разрядов внеклеточная концентрация ионов калия повышается в разы, достигая в тоническую фазу иктального разряда около 10 мМ и деполяризуя мембрану, соответственно делая нейроны более возбудимыми.

ИЗБЫТОЧНАЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ ХЛОРИД-ИОНОВ ПРИ ЭПИЛЕПТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Функцию торможения в головном мозге выполняет ГАМКергическая система. Медиатор ГАМК оказывает быстрый и сильный гиперполяризующий эффект на постсинаптический нейрон при связывании с ГАМК_A-рецептором, являющимся ионотропным (хлорным) каналом. Как правило, при активации этих рецепторов хлорид-ионы по электрохимическому градиенту перемещаются внутрь клетки. Однако ток хлорид-ионов в клетку наблюдается только в том случае, когда потенциал реверсии, определяемый преимущественно равновесным хлорным потенциалом, ниже мембранного потенциала покоя клетки [15]. В противном случае ГАМК не будет оказывать торможения и может даже деполяризовать постсинаптический нейрон.

Так как потенциал реверсии в значительной степени определяется изменением внутриклеточной концентрации хлорид-ионов, то необходимо было разработать доступный способ регистрации.

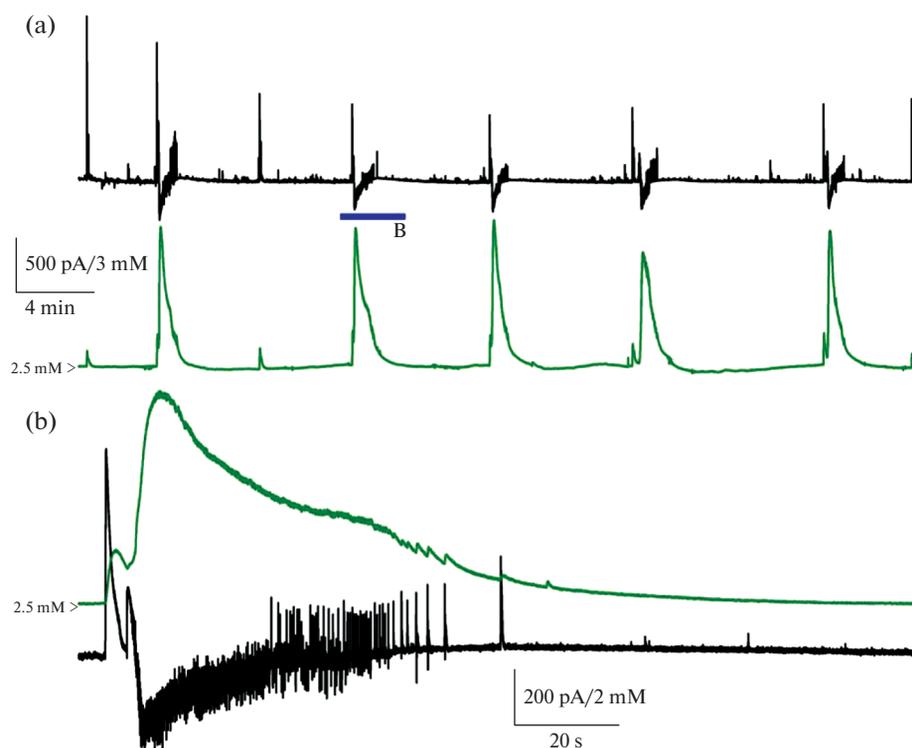


Рис. 1. Одновременная регистрация внеклеточной концентрации ионов калия с помощью калий-чувствительного электрода (зеленая кривая) и постсинаптических токов репрезентативного нейрона (черная кривая) в энторинальной коре крысы Вистар в 4-аминопиридиновой модели эпилептиформной активности *in vitro* (a). Потенциал для записи постсинаптических токов удерживался на -27 мВ. Иctalный разряд, отмеченный синей полосой, представлен в увеличенном масштабе на панели b. Воспроизведено из [11].

Нетоксичный метод измерения внутриклеточной концентрации хлорид-ионов был разработан в 2000 г. Kuner и Augustine [16] на основе физического явления “флуоресцентный резонансный перенос энергии”. Суть этого явления заключается в том, что между двумя хромофорами происходит безызлучательный перенос энергии от донора, находящегося в возбужденном состоянии, на акцептор через диполь-дипольное взаимодействие. Характерными чертами данного процесса являются тушение флуоресценции донора и возникновение более длинноволновой флуоресценции акцептора. Изучая межбелковые взаимодействия, эти исследователи заметили, что эффективность флуоресцентного резонансного переноса энергии между циановым и желтым флуоресцентными белками зависела от хлорид-ионов. Поэтому авторы предложили оптический индикатор хлорид-ионов в виде соединения желтого и цианового флуоресцентных белков Clomeleon и успешно апробировали его на первичной культуре нейронов гиппокампа [16].

Впервые измерили концентрацию хлорид-ионов во время генерации иctalного разряда Glykys и соавт в 2014 г., после экспрессии белка Clomeleon в органотипической культуре гиппокампа, совместив двухфотонную микроскопию и внеклеточные

отведения [17]. Если в состоянии покоя концентрация хлорид-ионов составила 25.4 ± 7.4 мМ, то во время генерации иctalного разряда она повышалась до 40.8 ± 13.8 мМ. Высокая внутриклеточная концентрация хлорид-ионов поддерживается на протяжении генерации эпилептиформной активности и восстанавливается до базового уровня только при продолжительном отсутствии синхронной популяционной активности (рис. 2).

Разработаны альтернативные способы оценки концентрации хлорид-ионов с помощью других сенсоров. Например, довольно широко используется ClorHensorN, чувствительный, кроме $[Cl^-]_i$, также и к pH [18–22]. Vurman и соавт. измерили динамику внутриклеточной концентрации хлорид-ионов во время генерации эпилептиформных разрядов в срезах органотипической культуры гиппокампа [22]. Было показано, что во время эпилептиформной активности внутриклеточная концентрация хлорид-ионов возрастает, соответственно во время генерации эпилептических разрядов потенциал реверсии повышается на 30–40 мВ, а по окончании эпилептиформной активности возвращается к базовому уровню.

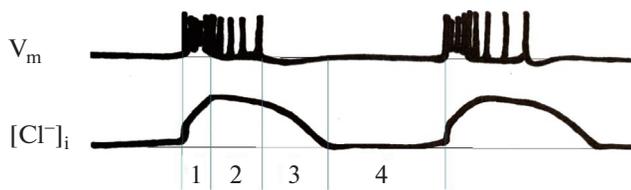


Рис. 2. Схематическое изображение динамики внутриклеточной концентрации хлорид-ионов $[Cl^-]_i$, во время икталных разрядов в модели эпилептиформной активности *in vitro*. Во время икталного разряда наблюдается спайковая активность репрезентативного нейрона коры, которая представлена записью мембранного потенциала V_m . Цифры на рисунке: 1 – тоническая фаза икталного разряда, 2 – клоническая фаза икталного разряда, 3 – гиперполяризация, 4 – состояние покоя (по материалам [17]).

ЭПИЛЕПТОГЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ ДИСБАЛАНСА ХЛОРИД-ИОНОВ И КАТИОНОВ КАЛИЯ

В норме в зрелых нейронах хлорид-ионы переносятся в межклеточное пространство за счет K^+ - Cl^- -котранспортера (KCC2-котранспортера): электрохимический градиент ионов калия способствует выведению хлорид-иона вместе с ионом калия [23]. Таким образом, KCC2-котранспортер препятствует накоплению хлорид-ионов внутри нейронов в результате работы тормозной системы и повышению потенциала реверсии ГАМК_A-рецепторов.

Функциональная активность KCC2-котранспортера регулируется рядом механизмов и при высокой активации нейронных сетей обычно резко снижается. Последние данные свидетельствуют о том, что скорость ионного транспорта, а также стабильность и перемещение KCC2 по клеточной поверхности и плазмалемме быстро и обратимо модулируются (де)фосфорилированием некоторых сериновых, треониновых и тирозиновых остатков в С-концевой части этого белка [24].

Этот механизм выведения хлорид-ионов из клеток довольно уязвим при различных повреждениях в нервной системе, что ведет к повышению возбудимости нейронных сетей и эпилептизации ткани мозга. Kaila и соавт. [25] в своем обзоре предлагают следующий механизм развития таких нарушений. В ходе повторяющихся судорожных припадков происходит, с одной стороны, прогрессирующая интернализация постсинаптических ГАМК_A-рецепторов [26], а с другой – быстрое снижение экспрессии KCC2 [27, 28], что совместно ведет к длительному накоплению хлорид-ионов в нейронах и последующему ослаблению торможения. Конкретный молекулярный механизм снижения экспрессии KCC2 до конца не выяснен, но наиболее известными на сегодняшний день патологическими ингибиторами функции KCC2 являются избыток

глутамата [29] и высокие уровни нейротрофического фактора мозга (BDNF) [30].

Кроме приобретенных нарушений хлорного баланса, могут встречаться и наследственные нарушения. Следует отметить, что при некоторых формах наследственной эпилепсии обнаружены мутации гена *SLC12A5*, кодирующего KCC2-котранспортер. Например, у австралийской семьи с наследственными фебрильными судорогами и во франко-канадской когорте с тяжелой генетической генерализованной эпилепсией (GGE) обнаружены гетерозиготные миссенс-полиморфизмы в *SLC12A5*, вызывающих снижение KCC2-зависимой способности к выведению хлорид-ионов [31]. У пациентов с тяжелым, рано проявляющимся заболеванием менделевского типа, названным “эпилепсией младенчества с мигрирующими фокальными припадками” (EIMFS), обнаружена рецессивная мутация в *SLC12A5*, ведущая к потере функции [32]. Также показано, что полиморфизм гена, кодирующего KCC2 по rs2297201, может быть прогностическим генетическим маркером фебрильных судорог [33], более подробные сведения о мутациях гена KCC2-котранспортера, приводящих к эпилепсии, можно найти в обзорах [31, 34].

Проэпилептогенное действие высокой концентрации внеклеточного калия подтверждается многочисленными экспериментальными данными. Например, повышение концентрации хлорида калия в омывающем растворе с 2.5 до 10 мМ приводит к генерации эпилептиформной активности в переживающем срезе гиппокампа ювенильной мыши [35]. Во время пре- или интерикталных разрядов, обеспеченных в основном синхронной активностью интернейронов, происходит повышение внеклеточной концентрации ионов калия [11, 36], которое, в свою очередь, может спровоцировать генерацию икталного разряда. Основными источниками внеклеточного калия выступают различные типы калиевых каналов и уже описанный выше KCC2-котранспортер.

Так, во время генерации потенциалов действия ионы калия попадают в межклеточное пространство через потенциал-чувствительные калиевые каналы [37], а KCC2-котранспортер обеспечивает совместный выход ионов калия и хлорид-ионов в межклеточное пространство. В результате изменяется потенциал реверсии калиевого тока у всех нейронов, включая пирамидные клетки и соответственно мембранный потенциал становится более деполяризованным у всех нейронов. Это приводит к гипервозбудимости ткани мозга.

Эффективное удаление избыточного K^+ из внеклеточного пространства во время активности нейронов имеет первостепенное значение. В этом процессе ключевую роль играют астроциты. Нормализацию внеклеточной концентрации ионов калия обеспечивают NaK-помпа и калиевые каналы

внутреннего выпрямления (K_{IR}), а также быстрая пространственная буферизация, обеспеченная щелевыми контактами между астроцитами [38]. Нарушения в работе любого из этих механизмов могут вести к развитию эпилепсии. Есть данные о том, что мутации астроцитарных калиевых каналов внутреннего выпрямления $K_{IR4.1}$ обнаружены у пациентов, страдающих эпилепсией [39–41]. У больных эпилепсией описаны также мутации субъединиц NaK-помпы, совместимые с жизнью [42]. В случае ювенильной миоклонической эпилепсии описаны мутации гена коннексина 36, обеспечивающего щелевой контакт между астроцитами [43].

МЕХАНИЗМЫ ГЕНЕРАЦИИ ЭПИЛЕПТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ, ОБУСЛОВЛЕННЫЕ ГАМКЕРГИЧЕСКИМИ ИНТЕРНЕЙРОНАМИ

Нарушение ионного баланса может изменить функции ГАМКергических интернейронов. В норме ГАМКергическая система в головном мозге выполняет функцию торможения, поэтому оказывает выраженное противозепилептическое действие. Однако накоплено много экспериментальных и клинических свидетельств ее проэпилептического действия при некоторых патологических состояниях [4, 36, 44–49]. Механизмы генерации эпилептической активности за счет работы ГАМКергической системы подробно обсуждаются в ряде ранее опубликованных обзоров [4, 5], поэтому здесь мы только кратко опишем наиболее часто встречающиеся механизмы.

Иктальный разряд может быть спровоцирован краткой синхронной активацией, а затем выключением тормозных интернейронов в условиях высокой эпилептической готовности. В этом случае сразу после выключения торможения наблюдается синхронизованная генерация потенциалов действия пирамидными нейронами (post-inhibitory rebound synchronization, PIRS). Такой эффект описан в оптогенетических экспериментах с кратковременной 30-миллисекундной фотостимуляцией ГАМКергических интернейронов верхних слоев соматосенсорной коры ювенильной мыши (линия VGAT-ChR2) в 4-аминопиридиновой модели *in vitro*. Фотостимуляция вызывает одновременную спайковую активность ГАМКергических интернейронов, а выключение света – синхронное прекращение их активности. Сразу после выключения фотостимуляции в срезе мозга генерировался иктальный (или интериктальный) разряд [47]. Используя перфорированный патч и мультиэлектродные отведения, исследователи показали, что во время фотостимуляции интернейронов наблюдается гиперполяризация пирамидных нейронов, а после выключения фотостимуляции возникает деполяризация пирамидных нейронов, и развивается эпилептическое событие. Таким образом, при од-

новременном выключении многих интернейронов происходит синхронная активация пирамидных нейронов, которая может реализоваться в иктальный или интериктальный разряд. Схожую картину наблюдали в ткани мозга человека, полученной из эпилептического очага, после локальной аппликации ГАМК (100 мМ), а также *in vivo* на анестезированной взрослой мыши VGAT-ChR2 при фотостимуляции интернейронов [47]. Аналогичный результат был продемонстрирован *in vitro* при стимуляции только парвальбумин-положительных быстроразряжающихся интернейронов [50].

Другой механизм может быть задействован при более длительной синхронизованной спайковой активности интернейронов (и опционально пирамидных нейронов). Такая активность нейронной сети повышает внеклеточную концентрацию ионов калия настолько, что приближает мембранный потенциал нейронов к порогу возникновения потенциала действия. В результате может активироваться достаточное число для генерации иктального разряда пирамидных нейронов. В пользу этого механизма свидетельствует ряд экспериментальных данных: во время генерации ГАМК-глутаматных интериктальных разрядов регистрируется существенный скачок внеклеточной концентрации ионов калия [36, 51]; в 4-аминопиридиновой модели эпилептиформной активности в срезах энторинальной коры иктальному разряду предшествуют ГАМК-глутаматные преиктальные разряды, зачастую внеклеточная концентрация ионов калия не успевает вернуться к базовому уровню в промежутке между преиктальными разрядами, поэтому обеспечивает больший скачок концентрации [11, 52]. Таким образом может быть достигнуто пороговое значение концентрации, достаточное для генерации иктального разряда.

Одновременно может происходить накопление хлорид-ионов в пирамидном нейроне за счет продолжительной активации ГАМК_A-рецепторов, что повышает потенциал реверсии ГАМК. Поэтому гиперполяризующее действие ГАМК может меняться на деполяризующее. Мы предполагаем, что в развитии эпилептогенного эффекта, обеспечиваемого ГАМКергическими интернейронами, важную роль может играть локальное изменение концентрации хлорид-ионов, а также некоторые специализированные тормозные синапсы вблизи начального сегмента аксона постсинаптического пирамидного нейрона. В пользу такого предположения свидетельствует ряд наших собственных и полученных в других лабораториях экспериментальных данных, а также модельные расчеты. Так, в 4-аминопиридиновой модели эпилептиформной активности в срезах гиппокампа и энторинальной коры ювенильной крысы, во время генерации преиктальных разрядов, мы неоднократно регистрировали низкопороговые потенциалы действия в

пирамидных нейронах [52], что может быть обусловлено тем, что они вызваны интернейронами.

Известно, что один из подтипов парвальбумин-содержащих интернейронов, клетки-канделябры, формируют особые аксо-аксональные синапсы, обеспечивая выброс ГАМК в области начального сегмента аксона пирамидных нейронов [53–55]. Было показано, что аппликация агониста ГАМК_A-рецепторов мусцимола в этой области аксона уменьшает вероятность генерации потенциала действия нейроном при низкой внутриклеточной концентрации хлорид-ионов и увеличивает эту вероятность при высокой концентрации [56]. Получены экспериментальные свидетельства того, что количество КСС2-котранспортера на аксоне нейрона значительно меньше, чем на дендритах и соме [57, 58], тогда как в этой области довольно высока экспрессия НКСС1-котранспортера. Эти особенности локальной экспрессии котранспортеров обеспечивают накопление хлорид-ионов в начальном сегменте аксона [59]. Поскольку объем аксона мал, то продолжительная ГАМКергическая активация приводит к локальному накоплению хлорид-ионов, обеспечивая деполяризующее действие ГАМК. В этом случае активность ГАМКергических клеток-канделябров может приводить к синхронизованному возбуждению пирамидных нейронов и инициации икталного разряда. Однако эта гипотеза требует дальнейших экспериментальных исследований.

Кроме клеток-канделябров важную роль в этих процессах может играть и другой подтип парвальбумин-содержащих интернейронов – корзинчатые интернейроны, образующие синаптические контакты в основном на теле и проксимальных дендритах пирамидных нейронов [60, 61]. Оптогенетическая деполяризация парвальбуминовых интернейронов в пилокарпиновой модели фокальной эпилепсии *in vivo* меняет эффект с анти- на проэпилептический в течение нескольких секунд [4]. Magloire и соавт. также отмечают, что проэпилептического действия нет при фотостимуляции SOM-интернейронов, синапсы которых расположены преимущественно на дендритах пирамидных нейронов, а также показывают, что проэпилептическое действие фотостимуляции парвальбуминовых интернейронов отсутствует при гиперэкспрессии КСС2-котранспортера [4].

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ РЕГУЛЯЦИИ ИОННОГО БАЛАНСА В ЦНС

Если нарушение ионного баланса ведет к эпилептизации нервной ткани, то фармакологическое воздействие с целью восстановления ионного баланса может стать одним из перспективных способов нормализации функций мозга.

Фармакологическая регуляция баланса хлорид-ионов

Важнейшую роль в естественной регуляции внутриклеточной концентрации хлорид-ионов осуществляют КСС2- и НКСС1-котранспортеры, действие которых прямо противоположно. КСС2-котранспортер выводит избытки хлорид-ионов из нейрона, тогда как НКСС1, наоборот, способствует их накоплению. В раннем онтогенезе преобладает НКСС1, но по мере созревания нейронов усиливается вклад КСС2 (рис. 3). Эти изменения связывают с ослаблением функций STE20/SPS1-связанной пролин-аланин-обогащенной протеинкиназы (СПАК), которая фосфорилирует как КСС2, так и НКСС1, но оказывает противоположное воздействие на их функции: снижает активность КСС2 и повышает активность НКСС1 [62]. При развитии эпилепсии активность НКСС1 может стать преобладающей [63]. Поэтому можно ожидать противоэпилептический эффект при ингибировании НКСС1 и проэпилептический при инактивации КСС2 [64], тогда как выраженный противоэпилептический эффект можно ожидать только при усилении функций КСС2.

В настоящее время набор фармакологических агентов, воздействующих на катион-хлорные котранспортеры, сильно ограничен и представлен в основном диуретиками (фуросемид и буметанид) и их производными. Для ингибирования НКСС1 обычно применяют буметанид. Буметанид имеет в ~500 раз большее сродство к НКСС1 ($K_i \sim 0.1$ мкМ), чем к КСС2 ($K_i \sim 25\text{--}50$ мкМ), и поэтому низкие концентрации буметанида (2–10 мкМ) могут быть легко использованы для ингибирования НКСС1 *in vitro* без существенного влияния на КСС2 [65]. Однако при более высоких концентрациях буметанид будет блокировать оба транспортера. Фуросемид еще менее специфичен и воздействует не только на катион-хлорные котранспортеры, но и Na^+ -независимый $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обменник (АЕ3), некоторые подтипы ГАМК-рецепторов, а также карбоновую ангидразу [66].

Несмотря на то что в ряде работ отмечались противоэпилептические свойства этих диуретиков (см. обзор [67]), применение их в качестве противоэпилептических препаратов затрудняется плохой проходимостью через гематоэнцефалический барьер и большим числом побочных воздействий, поскольку НКСС1-котранспортер экспрессируется во многих клетках организма.

Недавно были разработаны специфичные ингибиторы КСС2: VU0463271 [68] и VU0240551 [69]. Мы изучили действие ингибитора VU0463271 на эпилептиформную активность в срезах гиппокампа и энторинальной коры крысы в возрасте 3 и 8 нед. Несмотря на то что к возрасту 3 нед у крыс уже должен установиться максимальный уровень экспрессии КСС2, соответствующий уровню у взрослых животных, ингибирование КСС2 дей-

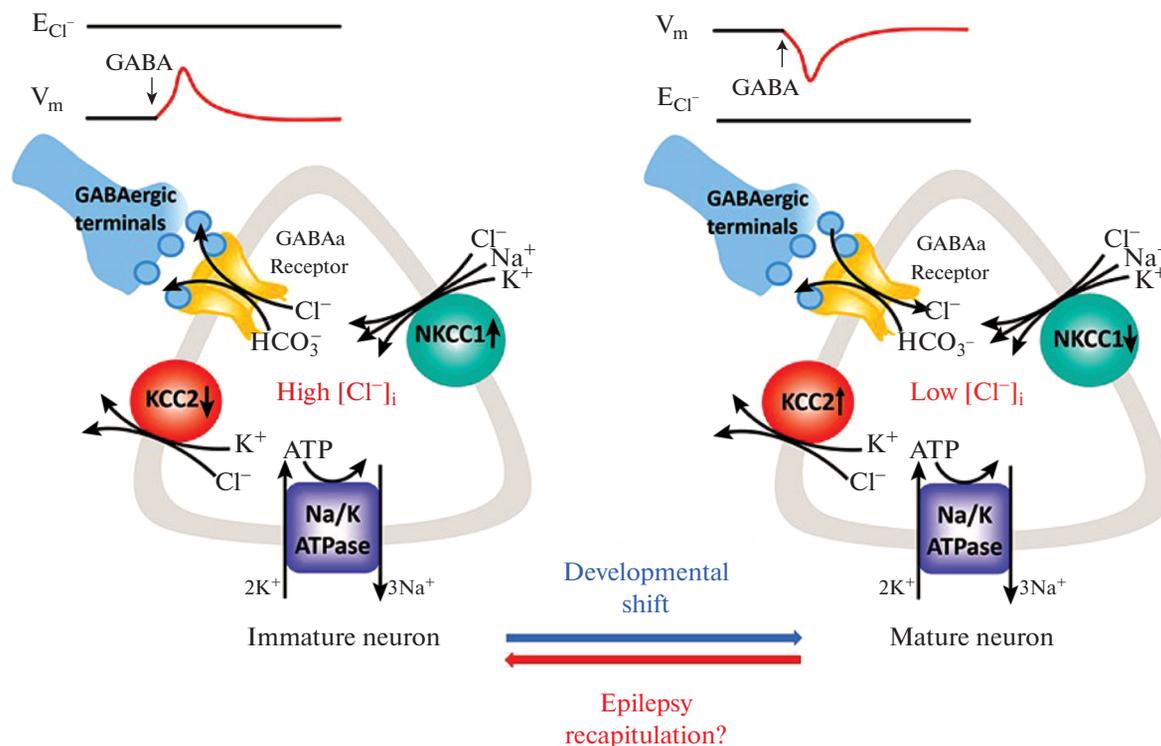


Рис. 3. Механизмы регуляции концентрации Cl^- , лежащие в основе действия ГАМК в незрелых (слева) и зрелых нейронах ЦНС (справа). NKCC1 является основным транспортером в незрелых нейронах ЦНС, который опосредует поступление Cl^- в клетку. KCC2 является основным K-Cl котранспортером в зрелых нейронах ЦНС и обеспечивает выведение Cl^- из клетки. При некоторых патофизиологических состояниях, таких как эпилепсия, нейроны испытывают “рекапитуляцию” и дедифференцировку на более ранние стадии развития. Остальные пояснения приведены в тексте. Схема воспроизведена из [63].

ствовало по-разному: если в возрасте 3 нед мы не обнаружили существенных изменений формы эпилепсии, то в возрасте 8 нед ингибирование KCC2 привело к замещению иконтальной активности на эпилептический статус [52]. Namidi и Avoli получили схожий результат в 4-аминопиридиновой модели в срезах энторинальной и периринальной коры, применив VU0240551 (10 μM) [70]. Таким образом, экспериментальные данные подтверждают важную роль KCC2-котранспортера в регуляции эпилептической активности.

Перспективной стратегией усиления функций KCC2, что потенциально будет иметь противоэпилептическое действие, может быть направленное фосфорилирование KCC2 прямо или косвенно через вышележащие регуляторные киназы по некоторым сайтам [24]. Например, выявлено РКС-зависимое усиление функции KCC2 благодаря фосфорилированию по S940 в С-концевом хвосте KCC2 [71]. К такому эффекту может приводить активация метаболитных глутаматных рецепторов (mGluR) группы I. В экспериментах с грамицидин-перфорированным патч-клеммом было показано, что одновременная тоническая активация mGluR1 и mGluR5 увеличивает силу тормозных синапсов

через активацию РКС-зависимого пути в пирамидных нейронах области СА3 гиппокампа [72]. Однако агонисты mGluR группы I являются проконвульсантами и ведут к эпилептогенезу, так как одновременно модулируют возбудимость нейронов и активность NMDA-рецепторов [73], поэтому терапевтический потенциал такого подхода на настоящий момент неочевиден.

Фармакологическая регуляция баланса катионов калия

Выведение ионов калия из межклеточного пространства на молекулярном уровне в основном обеспечивают NaK-помпа и K_{IR} -каналы. Если NaK-помпа отвечает за выведение избытков K^+ из внеклеточного пространства, то активация ее работы должна оказать противоэпилептический эффект и, наоборот, ингибирование помпы должно обладать проэпилептическим действием.

Так как активность NaK-помпы повышается при повышении концентрации Na^+ внутри клетки, то в качестве модулятора NaK-помпы в работах *in vitro* иногда применяют натриевый ионофор момензин [74, 75]. Однако мы не нашли работ, в кото-

рых монензин использовался бы в качестве экспериментального противоэпилептического средства. Наши собственные неопубликованные данные экспериментов показали, что монензин обладает очень узким терапевтическим окном. В 4-аминопиридиновой модели эпилептиформной активности в срезах гиппокампа и энторинальной коры мыши в некоторых случаях применение монензина (2–3 мкМ) препятствовало генерации икталных разрядов, однако увеличение концентрации монензина до 5 мкМ приводило к гибели нейронов.

В отличие от активирующего действия на NaK-помпу эффект ее ингибирования изучен лучше и хорошо согласуется с модельными расчетами [8]. Было показано, что внутрижелудочковая инъекция оубаина вызывает эпилептический приступ у крыс [76]. В моделях *in vitro* ослабление работы NaK-помпы с помощью оубаина тоже имеет выраженный проэпилептический эффект [52].

За выведение ионов калия из внеклеточного пространства отвечают также астроциты. Астроциты осуществляют пространственную калиевую буферизацию (*spatial potassium buffering*), они поглощают внеклеточный K^+ , секретируемый нейронами, и высвобождают K^+ в регионах с более низким уровнем K^+ (например, микрокапиллярах), соединяясь в синцитий через щелевые контакты [77]. Поступление K^+ в астроциты в основном опосредуется Kir-каналами, содержащими 4 субъединицы Kir4.1 (гиппокамп) или комбинацию Kir4.1/Kir5.1 субъединиц (неокортекс) [78–80].

Электрофизиологические исследования показали, что Kir-токи значительно снижены в образцах гиппокампа пациентов с рефрактерной височной эпилепсией [81], что может быть обусловлено снижением уровня экспрессии Kir4.1-каналов [82]. Нарушение функций Kir4.1-каналов выявлено при ряде наследственных форм неврологических расстройств, сопровождающихся эпилептическими судорогами, например, восточный синдром (EAST: эпилепсия, атаксия, сенсоневральная глухота и тубулопатия) и синдром SeSAME (судороги, сенсоневральная глухота, атаксия, умственная отсталость и электролитный дисбаланс) [83, 84]. Хотя исследования на моделях эпилепсии в некоторых случаях показывают, наоборот, усиление экспрессии: например, в литий-пилокарпиновой модели было найдено увеличение экспрессии Kir4.1 в коре головного мозга, стриатуме и гипоталамусе, это явление может носить компенсаторный характер [85]. Исследования же с использованием животных с условным нокаутом (*conditional knockout*), нацеленным на астроцитарный Kir4.1, выявили четкую связь между дисфункцией канала Kir4.1 и предрасположенностью к судорогам [86, 87].

Достаточно обоснованно поэтому можно предположить, что усиление Kir-токов благодаря применению положительных модуляторов или уве-

личению экспрессии Kir4.1-каналов в астроцитах будет обладать выраженным противоэпилептическим эффектом. Однако долгое время не было известно никаких специфических модуляторов Kir4.1-каналов. Сейчас идентифицировано только несколько антагонистов Kir4.1, таких как VU0134992 ($IC_{50} = 0.97$ мкМ) [88], пентамидин ($IC_{50} = 97$ нМ) [89] и некоторые другие, обзор которых можно найти у Ohno и соавт. [90]. Также выявлено, что многие препараты, применяемые в клинике, могут уменьшать Kir-токи при использовании их в терапевтических дозах. Например, такой побочный эффект описан у антидепрессантов [91], противоопухолевых препаратов на основе комплексов двухвалентной платины [92, 93].

К сожалению, мы не смогли найти данных о позитивных модуляторах работы Kir4.1-каналов. Зато целый ряд широко применяемых противоэпилептических препаратов (вальпроат, фенитоин и фенобарбитал) могут усиливать экспрессию астроцитарного Kir4.1 в лимбической области, что было показано в экспериментах на крысах [94], возможно, что этот эффект является одним из компонентов их противоэпилептического действия.

Таким образом, на сегодняшний день практически нет доступных фармакологических инструментов, которые позволили бы эффективно воздействовать на ионный баланс в нервной ткани. Кроме того, рассматриваемые нами транспортеры и каналы (или близкие аналоги) присутствуют не только в ЦНС, но и в других системах организма, обеспечивая целый ряд жизненно важных функций, поэтому можно ожидать широкий спектр побочных эффектов фармакологического воздействия на NaK-помпу, катион-хлорные котранспортеры и K_{IR} -каналы.

ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ, НАПРАВЛЕННАЯ НА РЕГУЛЯЦИЮ ИОННОГО БАЛАНСА

Экспериментальные генно-терапевтические подходы для лечения фармакорезистентной эпилепсии

Генно-терапевтические подходы подразделяют на четыре типа: (1) замена гена при моногенных заболеваниях, (2) добавление гена при сложных патологиях, (3) изменение уровня экспрессии генов и таргетинг РНК и (4) редактирование генома [95]. Применительно к эпилепсии первый подход практически не разрабатывается, так как идиопатические формы эпилепсии, вызванные мутацией какого-то одного гена и вследствие этого нарушенной функцией канала или рецептора, встречаются относительно редко. Кроме того, доставка генетического материала одновременно в обширные области мозга методически сложна. Третий и четвертый подходы также пока не реализуются для экспериментального лечения эпилепсии. Наиболее

перспективным считается второй подход, который может быть использован для лечения фармакорезистентных фокальных форм эпилепсии. В этом варианте необходимые гены доставляются в клетку-мишень с целью локального снижения активности нейронных сетей в эпилептическом очаге.

Для доставки генов наиболее часто используют вирусные конструкции. Среди различных вирусов, испытанных для генной терапии, наиболее перспективными кандидатами для применения в ЦНС являются конструкции на основе аденоассоциированных вирусов (AAV), лентивирусов и вирусов герпеса [96]. AAV-конструкции сейчас считаются наиболее безопасными: при сборке конструкции можно почти полностью удалить ДНК вируса, сам вирусный конструкт относительно нетоксичен для клеток и обладает низкой иммуногенностью. Однако значимым ограничением для широкого применения AAV-конструктов является их относительно небольшой размер [97]. Так как емкость AAV-конструктов не превышает 4.5–5 тысяч пар оснований, а размер кодирующей последовательности многих генов таргетных белков сопоставим по размерам или даже больше, то далеко не все гены могут быть доставлены в ЦНС таким способом. Поэтому в экспериментальных работах нередко применяют конструкции на основе лентивирусов или вирусов герпеса, имеющих большую емкость, но и больший риск побочных эффектов [96].

Сейчас основные способы генной терапии фармакорезистентной эпилепсии направлены на увеличение экспрессии ингибирующих пептидов, таких как галанин [98] и NPY [99, 100], или подавление возбудимости нейронов путем гиперэкспрессии в них калиевых каналов [101–103]. Среди близких подходов, направленных на снижение гиперактивации нейронных сетей, следует отметить хемо- и оптогенетические методы, обзор которых можно найти в статье Walker и Kullmann [104].

Генетические методы регуляции баланса хлорид-ионов в нейронах

Как было описано выше, накопление хлорид-ионов в нейронах при эпилептической активности ведет к нарушению функций ГАМКергической системы и самоподдержанию эпилептической активности. Усиление функций KCC2-транспортера может предотвратить нарушение функций торможения. Экспериментальных работ, в которых генная терапия была бы нацелена именно на модуляцию ионного баланса хлорид-ионов опубликовано относительно мало. Мы смогли найти всего несколько работ, в которых был изучен эффект гиперэкспрессии KCC2-транспортера на эпилептическую активность [105, 106].

Гиперэкспрессию KCC2-транспортера, доставленного с помощью лентивирусного конструкта под промотером CaMKII, осуществляли в коре трансгенной мыши PV-ChR2. У этой линии мышей каналородопсин-2 экспрессируется в парвалбумин-позитивных интернейронах и световая стимуляция вызывает их активацию [105]. Magloire и соавт. показали, что при пилокарпин-индуцированном эпилептическом статусе у PV-ChR2 мышей с нормальным уровнем KCC2-транспортера фото-стимуляция коры вместо противосудорожного эффекта обладает выраженным проиктальным действием, если начинается через 2 и более секунд с момента развития иктального разряда в коре. Это наблюдение полностью согласуется с представлениями о накоплении Cl⁻ в нейронах в ходе эпилептического приступа и переходу от тормозного к возбуждающему действию ГАМК. Гиперэкспрессия KCC2-котранспортера в пирамидных нейронах коры препятствовала развитию проиктального действия парвалбуминовых интернейронов и сохранила тормозное действие ГАМК. Однако гиперэкспрессия KCC2 не повлияла сама по себе на протекание эпилептических припадков [105].

Аналогичный вывод был сделан в другой экспериментальной работе, в которой у линии мышей с доксициклин-индуцибельной гиперэкспрессией KCC2-транспортера моделировали каинатные судороги. Гиперэкспрессия KCC2 также не повлияла на тяжесть эпилептических припадков, однако увеличила эффективность позитивного модулятора ГАМК-рецепторов диазепам в остановке судорожных припадков, регистрируемых на ЭЭГ [106]. Таким образом, одновременное воздействие на KCC2 и ГАМК-рецепторы может стать эффективной противосудорожной терапевтической стратегией.

Сейчас доступно несколько оптогенетических инструментов для направленного транспорта Cl⁻ в нейрон или из нейрона, например: галородопсин (хлорная помпа), который под воздействием одного кванта света 560 нм проводит один хлорид-ион в клетку [107]; хлорный канал, который под воздействием света 490 нм открывает пору для тока хлорид-ионов по электрохимическому градиенту [108, 109]; Cl-Out-комплекс, в котором протонная помпа обеспечивает движущую силу для тока хлорид-ионов из клетки по хлорному каналу [110].

Аналогично работе ГАМКергической системы, в условиях патологической эпилептической активности хлорные помпа и канал могут оказать про-эпилептическое действие из-за накопления хлорид-ионов в нейронах. Поэтому оптогенетическая активация светочувствительных хлорных каналов может вызывать как подавление, так и усиление нейронной активности [111, 112].

Применение комплекса Cl-out может оказаться полезным инструментом для нормализации

внутриклеточной концентрации хлорид-ионов в эпилептической ткани с нарушенным градиентом хлорид-ионов. Alfonsa и соавт. показали, что активация Cl-out-комплекса оказывает противоэпилептическое действие в том случае, когда причиной эпилептической активности является высокая концентрация хлорид-ионов в нейронах [110]. Эпилептическую активность в срезах гиппокампа мыши авторы вызывали с помощью блокады КСС2. Регистрацию сетевой активности производили с помощью внеклеточных отведений в пирамидном слое CA1, для мониторинга возбудимости нейронов проводилась электрическая стимуляция. Далее проводили фотостимуляцию серией одновременно светом 488 и 561 нм для активации хлорного каналородопсина и протонной помпы соответственно. Alfonsa и соавт. продемонстрировали, что активация Cl-out-комплекса уменьшает возбудимость и в целом оказывает противоэпилептическое действие [110].

Генетические методы регуляции концентрации катионов калия во внеклеточной среде

Разработано довольно много эффективных вариантов генной терапии эпилепсии, усиливающих функции различных типов нейронных калиевых каналов [101–103]. Хотя дополнительная активация калиевых каналов может влиять на повышение концентрации катионов калия во внеклеточной среде, этот эффект не является преобладающим. Поэтому в этой части обзора мы рассмотрим только подходы, направленные на нормализацию внеклеточной концентрации ионов калия. Эффективной стратегией для этого может стать усиление Kir-токов путем увеличения экспрессии Kir4.1-каналов в астроцитах.

Предпосылкой для этого подхода является снижение Kir-токов в образцах гиппокампа пациентов с рефрактерной височной эпилепсией [81]. Мы не смогли найти литературных данных об экспериментальной проверке данного метода для лечения эпилепсии, однако увеличение экспрессии Kir4.1-каналов в астроцитах стриатума оказалось эффективным при лечении болезни Хантингтона в модели на трансгенных линиях мышей R6/2 и Q175 HD [113]. Авторы показали, что дополнительная экспрессия каналов Kir4.1 с помощью вирусной доставки в астроциты стриатума восстановила Kir-токи в этих клетках, в результате чего снизилась концентрация внеклеточного K⁺, уменьшилась деполяризация мембраны и улучшились другие функциональные характеристики нейронов стриатума. Такое лечение позволило несколько ослабить двигательные нарушения и улучшить выживаемость R6/2 мышей [113].

Следует иметь в виду, что у этого подхода могут оказаться ограничения. Например, избыточное усиление Kir-токов может приводить к негатив-

ным последствиям. Выявлено, что мутации гена *KCNJ10*, приводящие к усилению функций Kir4.1-каналов (gain-of-function), могут способствовать формированию неврологических синдромов, объединяющих расстройства аутистического спектра и эпилепсию [114]. Можно предположить, что усиление Kir-токов в этом случае не допускает естественной деполяризации нейронов и инактивации натриевых каналов из-за накопления внеклеточного калия, вызывающих деполяризационный блок и прерывающих спайковую активность. Однако существующие модели иктальной активности прямо не подтверждают такой вариант развития [8]. Вероятно, что эпилептическая активность в этом случае может быть вызвана функциональными нарушениями в нейрон-глиальных взаимодействиях. Уменьшение концентрации внеклеточного K⁺ ведет к гиперполяризации астроцитов, что ослабляет глиотрансмиссию, которая обычно ингибирует выброс глутамата пирамидными нейронами [115].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В эпилептической ткани длительная избыточная нейронная активность приводит к нарушению функций ГАМКергической системы: вместо торможения она может оказывать проэпилептическое действие. В основе этих нарушений лежит дисбаланс концентраций хлорид-ионов и/или катионов калия во вне и внутриклеточной среде. Модельные и экспериментальные работы показывают, что восстановление баланса этих ионов может оказаться наиболее эффективным подходом для лечения таких форм эпилепсии. В большинстве случаев для этого необходимо восстановить или усилить ослабленную функцию каких-либо ионных каналов, транспортеров или насосов. К сожалению, имеющийся арсенал фармакологических инструментов крайне мал и недостаточно эффективен.

Мы полагаем, что для данных целей методы генной терапии, позволяющие усилить функции каких-либо белков путем их дополнительной экспрессии в целевых клетках, могут оказаться наиболее перспективными. Сейчас область генной терапии эпилепсии интенсивно развивается, однако инструменты, направленные на поддержание ионного баланса в эпилептической ткани, пока исследуются относительно мало. Среди доступных вариантов терапии особое внимание привлекают методы гиперэкспрессии КСС2-транспортера и Kir4.1-каналов, позволяющие восстановить концентрации хлорид-ионов и катионов калия. Однако требуется дополнительная экспериментальная проверка эффективности и безопасности данных инструментов в различных моделях эпилепсии и судорожных состояний.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-315-60016.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы внесли равный вклад в написание обзора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fattorusso A, Matricardi S, Mencaroni E, Dell'Isola GB, Di Cara G, Striano P, Verrotti A* (2021) The Pharmacoresistant Epilepsy: An Overview on Existant and New Emerging Therapies. *Front Neurol* 12: 1030. <https://doi.org/10.3389/FNEUR.2021.674483>
2. *Löscher W, Klitgaard H, Twyman RE, Schmidt D* (2013) New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 12: 757–776. <https://doi.org/10.1038/nrd4126>
3. *Raimondo JV, Burman RJ, Katz AA, Akerman CJ* (2015) Ion dynamics during seizures. *Front Cell Neurosci* 9: 1–14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00419>
4. *Magloire V, Mercier MS, Kullmann DM, Pavlov I* (2019) GABAergic Interneurons in Seizures: Investigating Causality With Optogenetics. *Neuroscientist* 25: 344–358. <https://doi.org/10.1177/1073858418805002>
5. *Khazipov R* (2016) GABAergic Synchronization in Epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6: a022764. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A022764>
6. *de Curtis M, Uva L, Gnatkovsky V, Librizzi L* (2018) Potassium dynamics and seizures: Why is potassium ictogenic? *Epilepsy Res* 143: 50–59. <https://doi.org/10.1016/J.EPLEPSYRES.2018.04.005>
7. *Chizhov AV, Amakhin DV, Zaitsev AV* (2017) Computational model of interictal discharges triggered by interneurons. *PLoS One* 12: e0185752. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185752>
8. *Chizhov AV, Zefirov AV, Amakhin DV, Smirnova EY, Zaitsev AV* (2018) Minimal model of interictal and ictal discharges “Epileptor-2.” *PLOS Comput Biol* 14: e1006186. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006186>
9. *Ammann D, Chao P, Simon W* (1987) Valinomycin-based K⁺ selective microelectrodes with low electrical membrane resistance. *Neurosci Lett* 74: 221–226. [10.1016/0304-3940\(87\)90153-4](https://doi.org/10.1016/0304-3940(87)90153-4)
10. *Codadu NK, Parrish RR, Trevelyan AJ* (2019) Region-specific differences and areal interactions underlying transitions in epileptiform activity. *J Physiol* 597: 2079–2096. <https://doi.org/10.1113/JP277267>
11. *Chizhov AV, Amakhin DV, Smirnova EY, Zaitsev AV* (2022) Ictal wavefront propagation in slices and simulations with conductance-based refractory density model. *PLOS Comput Biol* 18: e1009782. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009782>
12. *Moody WJ, Futamachi KJ, Prince DA* (1974) Extracellular potassium activity during epileptogenesis. *Exp Neurol* 42: 248–263. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(74\)90023-5](https://doi.org/10.1016/0014-4886(74)90023-5)
13. *Prince DA, Lux HD, Neher E* (1973) Measurement of extracellular potassium activity in cat cortex. *Brain Res* 50: 489–495. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(73\)90758-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(73)90758-0)
14. *Heinemann U, Lux HD, Gutnick MJ* (1977) Extracellular free calcium and potassium during paroxysmal activity in the cerebral cortex of the cat. *Exp Brain Res* 27–27: 237–243. <https://doi.org/10.1007/BF00235500>
15. *Williams JR, Sharp JW, Kumari VG, Wilson M, Payne JA* (1999) The Neuron-specific K–Cl Cotransporter, KCC2. *J Biol Chem* 274: 12656–12664. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.18.12656>
16. *Kuner T, Augustine GJ* (2000) A Genetically Encoded Radiometric Indicator for Chloride. *Neuron* 27: 447–459. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00056-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00056-8)
17. *Glykys J, Dzhalal V, Egawa K, Balena T, Saponjian Y, Kuchibhotla KV, Bacskai BJ, Kahle KT, Zeuthen T, Staley KJ* (2014) Local impermeant anions establish the neuronal chloride concentration. *Science* 343: 670–675. <https://doi.org/10.1126/science.1245423>
18. *Arosio D, Ricci F, Marchetti L, Gualdani R, Albertazzi L, Beltram F* (2010) Simultaneous intracellular chloride and pH measurements using a GFP-based sensor. *Nat Methods* 7: 516–518. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1471>
19. *Raimondo J* (2013) A genetically-encoded chloride and pH sensor for dissociating ion dynamics in the nervous system. *Front Cell Neurosci* 7: 202. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00202>
20. *Sulis Sato S, Artoni P, Landi S, Cozzolino O, Parra R, Pracucci E, Trovato F, Szczurkowska J, Luin S, Arosio D, Beltram F, Cancedda L, Kaila K, Ratto GM* (2017) Simultaneous two-photon imaging of intracellular chloride concentration and pH in mouse pyramidal neurons in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: E8770–E8779. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702861114>
21. *Ponomareva D, Petukhova E, Bregestovski P* (2021) Simultaneous Monitoring of pH and Chloride (Cl⁻) in Brain Slices of Transgenic Mice. *Int J Mol Sci* 22: 13601. [10.3390/ijms222413601](https://doi.org/10.3390/ijms222413601)
22. *Burman RJ, Selfe JS, Lee JH, van den Berg M, Calin A, Codadu NK, Wright R, Newey SE, Parrish RR, Katz AA, Wilmshurst JM, Akerman CJ, Trevelyan AJ, Raimondo JV* (2019) Excitatory GABAergic signalling is associated with benzodiazepine resistance in status epilepticus. *Brain* 142: 3482–3501. <https://doi.org/10.1093/brain/awz283>
23. *Rahmati N, Hoebeek FE, Peter S, De Zeeuw CI* (2018) Chloride Homeostasis in Neurons With Special Emphasis on the Olivocerebellar System: Differential Roles for Transporters and Channels. *Front Cell Neurosci* 12: 101. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00101>
24. *Kahle KT, Deeb TZ, Puskarjov M, Silayeva L, Liang B, Kaila K, Moss SJ* (2013) Modulation of neuronal activity by phosphorylation of the K–Cl cotransporter KCC2. *Trends Neurosci* 36: 726–737. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.08.006>

25. *Kaila K, Ruusuvuori E, Seja P, Voipio J, Puskarjov M* (2014) GABA actions and ionic plasticity in epilepsy. *Curr Opin Neurobiol* 26: 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.11.004>
26. *Wasterlain CG, Liu H, Naylor DE, Thompson KW, Sutchomelova L, Niquet J, Mazarati AM, Baldwin RA* (2009) Molecular basis of self-sustaining seizures and pharmacoresistance during status epilepticus: The receptor trafficking hypothesis revisited. *Epilepsia* 50: 16–18. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02375.x>
27. *Puskarjov M, Ahmad F, Kaila K, Blaesse P* (2012) Activity-Dependent Cleavage of the K-Cl Cotransporter KCC2 Mediated by Calcium-Activated Protease Calpain. *J Neurosci* 32: 11356–11364. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6265-11.2012>
28. *Lee HHC, Jurd R, Moss SJ* (2010) Tyrosine phosphorylation regulates the membrane trafficking of the potassium chloride co-transporter KCC2. *Mol Cell Neurosci* 45: 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2010.06.008>
29. *Lee HHC, Deeb TZ, Walker JA, Davies PA, Moss SJ* (2011) NMDA receptor activity downregulates KCC2 resulting in depolarizing GABAA receptor-mediated currents. *Nat Neurosci* 14: 736–743. <https://doi.org/10.1038/nn.2806>
30. *Rivera C, Li H, Thomas-Crusells J, Lahtinen H, Viitanen T, Nanobashvili A, Kokaia Z, Airaksinen MS, Voipio J, Kaila K, Saarma M* (2002) BDNF-induced TrkB activation down-regulates the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 and impairs neuronal Cl⁻ extrusion. *J Cell Biol* 159: 747–752. <https://doi.org/10.1083/jcb.200209011>
31. *Kahle KT, Khanna AR, Duan J, Staley KJ, Delpire E, Poduri A* (2016) The KCC2 Cotransporter and Human Epilepsy. *Neuroscience* 22: 555–562. <https://doi.org/10.1177/1073858416645087>
32. *Stöðberg T, McTague A, Ruiz AJ, Hirata H, Zhen J, Long P, Farabella I, Meyer E, Kawahara A, Vassallo G, Stivaros SM, Bjursell MK, Stranneheim H, Tigerschiöld S, Persson B, Bangash I, Das K, Hughes D, Lesko N, Lundberg J, Scott RC, Poduri A, Scheffler IE, Smith H, Gissen P, Schorge S, Reith MEA, Topf M, Kullmann DM, Harvey RJ, Wedell A, Kurian MA* (2015) Mutations in SLC12A5 in epilepsy of infancy with migrating focal seizures. *Nat Commun* 6: 8038. <https://doi.org/10.1038/ncomms9038>
33. *Dimitrijevic S, Jekic B, Cvjeticanin S, Tucovic A, Filipovic T, Novaković I, Ivić B, Nikolic D* (2022) KCC2 rs2297201 Gene Polymorphism Might be a Predictive Genetic Marker of Febrile Seizures. *ASN Neuro* 14: 175909142210932. <https://doi.org/10.1177/17590914221093257>
34. *Duy PQ, David WB, Kahle KT* (2019) Identification of KCC2 Mutations in Human Epilepsy Suggests Strategies for Therapeutic Transporter Modulation. *Front Cell Neurosci* 13: 515. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/FNCEL.2019.00515/BIBTEX>
35. *Filatov G, Krishnan GP, Rulkov NF, Bazhenov M* (2011) Dynamics of epileptiform activity in mouse hippocampal slices. *J Biol Phys* 37: 347–360. <https://doi.org/10.1007/S10867-011-9216-X/FIGURES/5>
36. *Librizzi L, Losi G, Marcon I, Sessolo M, Scalmani P, Carmignoto G, de Curtis M* (2017) Interneuronal Network Activity at the Onset of Seizure-Like Events in Entorhinal Cortex Slices. *J Neurosci* 37: 10398–10407. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3906-16.2017>
37. *González OC, Krishnan GP, Timofeev I, Bazhenov M* (2019) Ionic and synaptic mechanisms of seizure generation and epileptogenesis. *Neurobiol Dis* 130: 104485. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2019.104485>
38. *Bellot-Saez A, Stevenson R, Kékesi O, Samokhina E, Ben-Abu Y, Morley JW, Buskila Y* (2021) Neuromodulation of Astrocytic K⁺ Clearance. *Int J Mol Sci* 22: 2520. <https://doi.org/10.3390/ijms22052520>
39. *Ferraro TN, Golden GT, Smith GG, Martin JF, Lohoff FW, Gieringer TA, Zamboni D, Schwebel CL, Press DM, Kratzer SO, Zhao H, Berrettini WH, Buono RJ* (2004) Fine mapping of a seizure susceptibility locus on mouse Chromosome 1: nomination of Kcnj10 as a causative gene. *Mamm Genome* 2004 15: 239–251. <https://doi.org/10.1007/S00335-003-2270-3>
40. *Olsen ML, Sontheimer H* (2008) Functional implications for Kir4.1 channels in glial biology: from K⁺ buffering to cell differentiation. *J Neurochem* 107: 589–601. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2008.05615.X>
41. *Köhling R, Wolfart J* (2016) Potassium Channels in Epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6: a022871. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022871>
42. *Gallanti A, Tonelli A, Cardin V, Bussone G, Bresolin N, Bassi MT* (2008) A novel de novo nonsense mutation in ATP1A2 associated with sporadic hemiplegic migraine and epileptic seizures. *J Neurol Sci* 273: 123–126. <https://doi.org/10.1016/J.JNS.2008.06.006>
43. *Hempelmann A, Heils A, Sander T* (2006) Confirmatory evidence for an association of the connexin-36 gene with juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsy Res* 71: 223–228. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2006.06.021>
44. *D'Antuono M, Louvel J, Köhling R, Mattia D, Bernasconi A, Olivier A, Turak B, Devaux A, Pumain R, Avoli M* (2004) GABAA receptor-dependent synchronization leads to ictogenesis in the human dysplastic cortex. *Brain* 127: 1626–1640. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWH181>
45. *Mattia D, Olivier A, Avoli M* (1995) Seizure-like discharges recorded in human dysplastic neocortex maintained in vitro. *Neurology* 45: 1391–1395. <https://doi.org/10.1212/WNL.45.7.1391>
46. *Avoli M, De Curtis M, Gnatkovsky V, Gotman J, Köhling R, Lévesque M, Manseau F, Shiri Z, Williams S* (2016) Specific imbalance of excitatory/inhibitory signaling establishes seizure onset pattern in temporal lobe epilepsy. *J Neurophysiol* 115: 3229–3237. <https://doi.org/10.1152/JN.01128.2015/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9K0071636960005.JPEG>
47. *Chang M, Dian JA, Dufour S, Wang L, Moradi Chameh H, Ramani M, Zhang L, Carlen PL, Womelsdorf T, Valiante TA* (2018) Brief activation of GABAergic interneurons initiates the transition to ictal events through post-inhibitory rebound excitation. *Neurobiol Dis* 109: 102–116. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2017.10.007>
48. *Elahian B, Lado NE, Mankin E, Vangala S, Misra A, Moxon K, Fried I, Sharan A, Yeasin M, Staba R, Bragin A, Avoli M, Sperling MR, Engel J, Weiss SA* (2018) Low-voltage fast seizures in humans begin with increased inter-

- neuron firing. *Ann Neurol* 84: 588–600.
<https://doi.org/10.1002/ANA.25325>
49. *Miri ML, Vinck M, Pant R, Cardin JA* (2018) Altered hippocampal interneuron activity precedes ictal onset. *Elife* 7: e40750.
<https://doi.org/10.7554/eLife.40750>
50. *Sessolo M, Marcon I, Bovetti S, Losi G, Cammarota M, Ratto GM, Fellin T, Carmignoto G* (2015) Parvalbumin-Positive Inhibitory Interneurons Oppose Propagation But Favor Generation of Focal Epileptiform Activity. *J Neurosci* 35: 9544–9557.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5117-14.2015>
51. *Yekhleif L, Breschi GL, Lagostena L, Russo G, Taverna S* (2015) Selective activation of parvalbumin- or somatostatin-expressing interneurons triggers epileptic seizure-like activity in mouse medial entorhinal cortex. *J Neurophysiol* 113: 1616–1630.
<https://doi.org/10.1152/jn.00841.2014>
52. *Smirnova EY, Sinyak DS, Chizhov AV, Zaitsev AV* (2021) Age-Dependent Generation of Epileptiform Activity in the 4-Aminopyridine Model with Slices of the Rat Entorhinal Cortex. *J Evol Biochem Physiol* 57: 230–240.
<https://doi.org/10.1134/S0022093021020058>
53. *Somogyi P, Freund TF, Hodgson AJ, Somogyi J, Beroukas D, Chubb IW* (1985) Identified axo-axonic cells are immunoreactive for GABA in the hippocampus visual cortex of the cat. *Brain Res* 332: 143–149.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)90397-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)90397-X)
54. *Zaitsev AV, Povysheva NV, Gonzalez-Burgos G, Rotaru D, Fish KN, Krimer LS, Lewis DA* (2009) Interneuron Diversity in Layers 2–3 of Monkey Prefrontal Cortex. *Cereb Cortex* 19: 1597–1615.
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhn198>
55. *Schneider-Mizell CM, Bodor AL, Collman F, Brittain D, Bleckert A, Dorkenwald S, Turner NL, Macrina T, Lee K, Lu R, Wu J, Zhuang J, Nandi A, Hu B, Buchanan J, Takeno MM, Torres R, Mahalingam G, Bumbarger DJ, Li Y, Chartrand T, Kemnitz N, Silversmith WM, Ih D, Zung J, Zlateski A, Tartavull I, Popovych S, Wong W, Castro M, Jordan CS, Froudarakis E, Becker L, Suckow S, Reimer J, Tolias AS, Anastassiou CA, Seung HS, Reid RC, Costa NM da* (2021) Structure and function of axo-axonic inhibition. *Elife* 10: e73783.
<https://doi.org/10.7554/eLife.73783>
56. *Ruiz A, Fabian-Fine R, Scott R, Walker MC, Rusakov DA, Kullmann DM* (2003) GABA_A Receptors at Hippocampal Mossy Fibers. *Neuron* 39: 961–973.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00559-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00559-2)
57. *Báldi R, Varga C, Tamás G* (2010) Differential distribution of KCC2 along the axo-somato-dendritic axis of hippocampal principal cells. *Eur J Neurosci* 32: 1319–1325.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07361.x>
58. *Szabadics J, Varga C, Molnár G, Oláh S, Barzó P, Tamás G* (2006) Excitatory effect of GABAergic axo-axonic cells in cortical microcircuits. *Science* 311: 233–235.
<https://doi.org/10.1126/science.1121325>
59. *Khiroug S, Yamada J, Afzalov R, Voipio J, Khiroug L, Kaila K* (2008) GABAergic Depolarization of the Axon Initial Segment in Cortical Principal Neurons Is Caused by the Na-K-2Cl Cotransporter NKCC1. *J Neurosci* 28: 4635–4639.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0908-08.2008>
60. *Dudok B, Klein PM, Soltesz I* (2022) Toward Understanding the Diverse Roles of Perisomatic Interneurons in Epilepsy. *Epilepsy Curr* 22: 54–60.
<https://doi.org/10.1177/15357597211053687>
61. *Jiang X, Lachance M, Rossignol E* (2016) Involvement of cortical fast-spiking parvalbumin-positive basket cells in epilepsy. *Prog Brain Res* 226: 81–126.
<https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2016.04.012>
62. *Moore YE, Kelley MR, Brandon NJ, Deeb TZ, Moss SJ* (2017) Seizing Control of KCC2: A New Therapeutic Target for Epilepsy. *Trends Neurosci* 40: 555–571.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.06.008>
63. *Liu R, Wang J, Liang S, Zhang G, Yang X* (2019) Role of NKCC1 and KCC2 in Epilepsy: From Expression to Function. *Front Neurol* 10: 1407.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2019.01407>
64. *Buchin A, Chizhov A, Huberfeld G, Miles R, Gutkin BS* (2016) Reduced efficacy of the KCC2 cotransporter promotes epileptic oscillations in a subiculum network model. *J Neurosci* 36: 11619–11633.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4228-15.2016>
65. *Payne JA, Rivera C, Voipio J, Kaila K* (2003) Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends Neurosci* 26: 199–206.
[https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(03\)00068-7](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00068-7)
66. *Uwera J, Nedergaard S, Andreassen M* (2015) A novel mechanism for the anticonvulsant effect of furosemide in rat hippocampus in vitro. *Brain Res* 1625: 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.08.014>
67. *Löscher W, Puskarjov M, Kaila K* (2013) Cation-chloride cotransporters NKCC1 and KCC2 as potential targets for novel antiepileptic and antiepileptogenic treatments. *Neuropharmacology* 69: 62–74.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.05.045>
68. *Delpire E, Baranczak A, Waterson AG, Kim K, Kett N, Morrison RD, Daniels JS, Weaver CD, Lindsley CW* (2012) Further optimization of the K-Cl cotransporter KCC2 antagonist ML077: Development of a highly selective and more potent in vitro probe. *Bioorg Med Chem Lett* 22: 4532–4535.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.05.126>
69. *Deisz RA, Wierschke S, Schneider UC, Dehnicke C* (2014) Effects of VU0240551, a novel KCC2 antagonist, and DIDS on chloride homeostasis of neocortical neurons from rats and humans. *Neuroscience* 277: 831–841.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.07.037>
70. *Hamidi S, Avoli M* (2015) KCC2 function modulates in vitro ictogenesis. *Neurobiol Dis* 79: 51–58.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.04.006>
71. *Lee HHC, Walker JA, Williams JR, Goodier RJ, Payne JA, Moss SJ* (2007) Direct Protein Kinase C-dependent Phosphorylation Regulates the Cell Surface Stability and Activity of the Potassium Chloride Cotransporter KCC2. *J Biol Chem* 282: 29777–29784.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M705053200>
72. *Banke TG, Gegelashvili G* (2008) Tonic activation of group I mGluRs modulates inhibitory synaptic strength by regulating KCC2 activity. *J Physiol* 586: 4925–4934.
<https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2008.157024>
73. *Ure J, Baudry M, Perassolo M* (2006) Metabotropic glutamate receptors and epilepsy. *J Neurol Sci* 247: 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.jns.2006.03.018>

74. *Kueh D, Barnett WH, Cymbalyuk GS, Calabrese RL* (2016) Na(+)/K(+) pump interacts with the h-current to control bursting activity in central pattern generator neurons of leeches. *Elife* 5: e19322. <https://doi.org/10.7554/eLife.19322>
75. *Picton LD, Nascimento F, Broadhead MJ, Sillar KT, Miles GB* (2017) Sodium Pumps Mediate Activity-Dependent Changes in Mammalian Motor Networks. *J Neurosci* 37: 906–921. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2005-16.2016>
76. *Donaldson J, Minnich JL, Barbeau A* (1972) Ouabain-induced Seizures in Rats: Regional and Subcellular Localization of 3 H-Ouabain Associated with Na⁺-K⁺ -ATPase in Brain. *Can J Biochem* 50: 888–896. <https://doi.org/10.1139/o72-124>
77. *Kinboshi M, Ikeda A, Ohno Y* (2020) Role of Astrocytic Inwardly Rectifying Potassium (Kir) 4.1 Channels in Epileptogenesis. *Front Neurol* 11: 1832. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.626658>
78. *Larsen BR, MacAulay N* (2014) Kir4.1-mediated spatial buffering of K⁺: Experimental challenges in determination of its temporal and quantitative contribution to K⁺ clearance in the brain. *Channels* 8: 544–550. <https://doi.org/10.4161/19336950.2014.970448>
79. *Moroni RF, Inverardi F, Regondi MC, Pennacchio P, Frasconi C* (2015) Developmental expression of Kir4.1 in astrocytes and oligodendrocytes of rat somatosensory cortex and hippocampus. *Int J Dev Neurosci* 47: 198–205. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2015.09.004>
80. *Hibino H, Fujita A, Iwai K, Yamada M, Kurachi Y* (2004) Differential Assembly of Inwardly Rectifying K⁺ Channel Subunits, Kir4.1 and Kir5.1, in Brain Astrocytes. *J Biol Chem* 279: 44065–44073. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405985200>
81. *Steinhäuser C, Seifert G, Bedner P* (2012) Astrocyte dysfunction in temporal lobe epilepsy: K⁺ channels and gap junction coupling. *Glia* 60: 1192–1202. <https://doi.org/10.1002/glia.22313>
82. *Heuser K, Eid T, Lauritzen F, Thoren AE, Vindedal GF, Taubøll E, Gjerstad L, Spencer DD, Ottersen OP, Nagelhus EA, Lanerolle NC de* (2012) Loss of Perivascular Kir4.1 Potassium Channels in the Sclerotic Hippocampus of Patients With Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *J Neuropathol Exp Neurol* 71: 814–825. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e318267b5af>
83. *Reichold M, Zdebik AA, Lieberer E, Rapedius M, Schmidt K, Bandulik S, Sterner C, Tegmeier I, Penton D, Baukrowitz T, Hulton S-A, Witzgall R, Ben-Zeev B, Howie AJ, Kleta R, Bockenhauer D, Warth R* (2010) KCNJ10 gene mutations causing EAST syndrome (epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, and tubulopathy) disrupt channel function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 14490–14495. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003072107>
84. *Sala-Rabanal M, Kucheryavykh LY, Skatchkov SN, Eaton MJ, Nichols CG* (2010) Molecular Mechanisms of EAST/SeSAME Syndrome Mutations in Kir4.1 (KCNJ10). *J Biol Chem* 285: 36040–36048. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.163170>
85. *Nagao Y, Harada Y, Mukai T, Shimizu S, Okuda A, Fujimoto M, Ono A, Sakagami Y, Ohno Y* (2013) Expressional analysis of the astrocytic Kir4.1 channel in a pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy model. *Front Cell Neurosci* 7: 104. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00104>
86. *Chever O, Djukic B, McCarthy KD, Amzica F* (2010) Implication of Kir4.1 Channel in Excess Potassium Clearance: An In Vivo Study on Anesthetized Glial-Conditional Kir4.1 Knock-Out Mice. *J Neurosci* 30: 15769–15777. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2078-10.2010>
87. *Kucheryavykh YV, Kucheryavykh LY, Nichols CG, Maldonado HM, Baksi K, Reichenbach A, Skatchkov SN, Eaton MJ* (2007) Downregulation of Kir4.1 inward rectifying potassium channel subunits by RNAi impairs potassium transfer and glutamate uptake by cultured cortical astrocytes. *Glia* 55: 274–281. <https://doi.org/10.1002/glia.20455>
88. *Kharade SV, Kurata H, Bender AM, Blobaum AL, Figueroa EE, Duran A, Kramer M, Days E, Vinson P, Flores D, Satlin LM, Meiler J, Weaver CD, Lindsley CW, Hopkins CR, Denton JS* (2018) Discovery, Characterization, and Effects on Renal Fluid and Electrolyte Excretion of the Kir4.1 Potassium Channel Pore Blocker, VU0134992. *Mol Pharmacol* 94: 926–937. <https://doi.org/10.1124/mol.118.112359>
89. *Aréchiga-Figueroa IA, Marmolejo-Murillo LG, Cui M, Delgado-Ramírez M, van der Heyden MAG, Sánchez-Chapula JA, Rodríguez-Menchaca AA* (2017) High-potency block of Kir4.1 channels by pentamidine: Molecular basis. *Eur J Pharmacol* 815: 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.10.009>
90. *Ohno Y, Kunisawa N, Shimizu S* (2021) Emerging Roles of Astrocyte Kir4.1 Channels in the Pathogenesis and Treatment of Brain Diseases. *Int J Mol Sci* 22: 10236. <https://doi.org/10.3390/ijms221910236>
91. *Ohno Y, Hibino H, Lossin C, Inanobe A, Kurachi Y* (2007) Inhibition of astroglial Kir4.1 channels by selective serotonin reuptake inhibitors. *Brain Res* 1178: 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.08.018>
92. *Leo M, Schmitt L-I, Kutritz A, Kleinschnitz C, Hagenacker T* (2021) Cisplatin-induced activation and functional modulation of satellite glial cells lead to cytokine-mediated modulation of sensory neuron excitability. *Exp Neurol* 341: 113695. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113695>
93. *Leo M, Schmitt L-I, Steffen R, Kutritz A, Kleinschnitz C, Hagenacker T* (2021) Modulation of Glutamate Transporter EAAT1 and Inward-Rectifier Potassium Channel Kir4.1 Expression in Cultured Spinal Cord Astrocytes by Platinum-Based Chemotherapeutics. *Int J Mol Sci* 22: 6300. <https://doi.org/10.3390/ijms22126300>
94. *Mukai T, Kinboshi M, Nagao Y, Shimizu S, Ono A, Sakagami Y, Okuda A, Fujimoto M, Ito H, Ikeda A, Ohno Y* (2018) Antiepileptic Drugs Elevate Astrocytic Kir4.1 Expression in the Rat Limbic Region. *Front Pharmacol* 9: 845. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00845>
95. *Wang D, Gao G* (2014) State-of-the-art human gene therapy: part II. Gene therapy strategies and clinical applications. *Discov Med* 18: 151–161.
96. *Ingusci S, Cattaneo S, Verlengia G, Zucchini S, Simonato M* (2019) A Matter of Genes: The Hurdles of Gene Therapy for Epilepsy. *Epilepsy Curr* 19: 38–43. <https://doi.org/10.1177/1535759718822846>

97. Wang D, Tai PWL, Gao G (2019) Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov* 18: 358–378.
https://doi.org/10.1038/s41573-019-0012-9
98. McCown TJ (2006) Adeno-associated Virus-Mediated Expression and Constitutive Secretion of Galanin Suppresses Limbic Seizure Activity in Vivo. *Mol Ther* 14: 63–68.
https://doi.org/10.1016/J.YMTHE.2006.04.004
99. Noè F, Pool AH, Nissinen J, Gobbi M, Bland R, Rizzi M, Balducci C, Ferraguti F, Sperk G, During MJ, Pitkänen A, Vezzani A (2008) Neuropeptide Y gene therapy decreases chronic spontaneous seizures in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Brain* 131: 1506–1515.
https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWN079
100. Cattaneo S, Verlengia G, Marino P, Simonato M, Bettegazzi B (2021) NPY and Gene Therapy for Epilepsy: How, When, and Why. *Front Mol Neurosci* 13: 608001.
https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.608001
101. Bernard C (2012) Treating epilepsy with a light potassium diet. *Sci Transl Med* 4: 161fs40.
https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005297
102. Wykes RC, Heeroma JH, Mantoan L, Zheng K, Macdonald DC, Deisseroth K, Hashemi KS, Walker MC, Schorge S, Kullmann DM (2012) Optogenetic and potassium channel gene therapy in a rodent model of focal neocortical epilepsy. *Sci Transl Med* 4: 161ra152.
https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004190
103. Snowball A, Chabrol E, Wykes RC, Shekh-Ahmad T, Cornford JH, Lieb A, Hughes MP, Massaro G, Rahim AA, Hashemi KS, Kullmann DM, Walker MC, Schorge S (2019) Epilepsy Gene Therapy Using an Engineered Potassium Channel. *J Neurosci* 39: 3159–3169.
https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1143-18.2019
104. Walker MC, Kullmann DM (2020) Optogenetic and chemogenetic therapies for epilepsy. *Neuropharmacology* 168: 107751.
https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107751
105. Magloire V, Cornford J, Lieb A, Kullmann DM, Pavlov I (2019) KCC2 overexpression prevents the paradoxical seizure-promoting action of somatic inhibition. *Nat Commun* 10: 1225.
https://doi.org/10.1038/s41467-019-08933-4
106. Cheung DL, Cooke MJ, Goulton CS, Chaichim C, Cheung LF, Khoshaba A, Nabekura J, Moorhouse AJ (2022) Global transgenic upregulation of KCC2 confers enhanced diazepam efficacy in treating sustained seizures. *Epilepsia* 63: e15–e22.
https://doi.org/10.1111/epi.17097
107. Han X, Boyden ES (2007) Multiple-Color Optical Activation, Silencing, and Desynchronization of Neural Activity, with Single-Spike Temporal Resolution. *PLoS One* 2: e299.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000299
108. Berndt A, Lee SY, Ramakrishnan C, Deisseroth K (2014) Structure-guided transformation of channelrhodopsin into a light-activated chloride channel. *Science* 344: 420–424.
https://doi.org/10.1126/science.1252367
109. Berndt A, Lee SY, Wietek J, Ramakrishnan C, Steinberg EE, Rashid AJ, Kim H, Park S, Santoro A, Frankland PW, Iyer SM, Pak S, Åhrlund-Richter S, Delp SL, Malenka RC, Josselyn SA, Carlén M, Hegemann P, Deisseroth K (2016) Structural foundations of optogenetics: Determinants of channelrhodopsin ion selectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: 822–829.
https://doi.org/10.1073/pnas.1523341113
110. Alfonsa H, Lakey JH, Lightowers RN, Trevelyan AJ (2016) Cl-out is a novel cooperative optogenetic tool for extruding chloride from neurons. *Nat Commun* 7: 13495.
https://doi.org/10.1038/ncomms13495
111. Malyshev AY, Roshchin MV, Smirnova GR, Dolgikh DA, Balaban PM, Ostrovsky MA (2017) Chloride conducting light activated channel GtACR2 can produce both cessation of firing and generation of action potentials in cortical neurons in response to light. *Neurosci Lett* 640: 76–80.
https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.01.026
112. Messier JE, Chen H, Cai Z-L, Xue M (2018) Targeting light-gated chloride channels to neuronal somatodendritic domain reduces their excitatory effect in the axon. *Elife* 7: e38506.
https://doi.org/10.7554/eLife.38506
113. Tong X, Ao Y, Faas GC, Nwaobi SE, Xu J, Hausteiner MD, Anderson MA, Mody I, Olsen ML, Sofroniew MV, Khakh BS (2014) Astrocyte Kir4.1 ion channel deficits contribute to neuronal dysfunction in Huntington's disease model mice. *Nat Neurosci* 17: 694–703.
https://doi.org/10.1038/nn.3691
114. Sicca F, Ambrosini E, Marchese M, Sforza L, Servetini I, Valvo G, Brignone MS, Lanciotti A, Moro F, Grottesi A, Catacuzzeno L, Baldini S, Hasan S, D'Adamo MC, Franciolini F, Molinari P, Santorelli FM, Pessia M (2016) Gain-of-function defects of astrocytic Kir4.1 channels in children with autism spectrum disorders and epilepsy. *Sci Rep* 6: 34325.
https://doi.org/10.1038/srep34325
115. Niday Z, Tzingounis AV (2018) Potassium Channel Gain of Function in Epilepsy: An Unresolved Paradox. *Neurosci* 24: 368–380.
https://doi.org/10.1177/1073858418763752

Regulation of Potassium and Chloride Ion Concentrations in Nervous Tissue as a Method of Anticonvulsant Therapy

E. Y. Proskurina^{a,b,#}, and A. V. Zaitsev^b

^a Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia

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

[#] e-mail: elena.yu.proskurina@gmail.com

In some pathological conditions, such as pharmacoresistant epilepsy, epileptic status or certain forms of genetic abnormalities, spiking activity of GABAergic interneurons may enhance excitation processes in neuronal circuits and provoke generation of ictal discharge. As a result, anticonvulsants acting on the GABAergic system may be ineffective or even increase seizure activity. This paradoxical effect of the inhibitory system is due to the disturbed ionic balance in the nervous tissue. This review considers the mechanisms of ictal discharge initiation in neuronal networks due to the imbalance of chloride and potassium ions, as well as possible ways to regulate ionic concentrations. Both the enhancement (or weakening) of the activity of certain ion transporters and ion pumps in neurons and their additional expression by gene therapy can be effective in the suppression of epileptic activity caused by ion imbalance. NaK-pump, NKCC1 and KCC2 co-transporters are important in maintaining the proper concentrations of K^+ and Cl^- in the nervous tissue, and they have previously been repeatedly considered as pharmacological targets for antiepileptic effects. An important limitation to progress in this direction is the lack of sufficiently selective pharmacological tools and methods of drug delivery to the epileptic focus. A more promising approach seems to be the use of gene therapy methods, such as hyperexpression of the KCC2 transporter in the epileptic focus. Another possible direction could be the use of optogenetic tools: specially designed light-sensitive ion pumps or channels. In this case, photon energy can be used to create the required gradients of chloride and potassium ions, but these methods also have significant limitations, which complicate their rapid introduction into medicine.

Keywords: epilepsy, optogenetics, gene therapy, KCC2 co-transporter, Kir4.1 channel

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

СЛУХОВАЯ АДАПТАЦИЯ
К ХАРАКТЕРИСТИКАМ РЕЧЕВОГО СИГНАЛА© 2022 г. И. Г. Андреева^{1,*}, Е. А. Огородникова^{1,2}¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия² Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: ig-andreeva@mail.ru

Поступила в редакцию 12.06.2022 г.

После доработки 29.07.2022 г.

Принята к публикации 02.08.2022 г.

В обзоре представлены данные исследований слуховой адаптации к ключевым параметрам речи — временным (темпо-ритмическим) и спектральным характеристикам голосового речевого сигнала, включая частоту основного тона голоса, формантные частоты, особенности тембра. Рассмотрены проявления адаптации к лингвистическим характеристикам голоса — полу и возрасту диктора, его эмоциональному состоянию. Показано, как механизмы адаптации участвуют в разделении конкурирующих речевых потоков и в механизмах слухового внимания. Обсуждается роль слуховой адаптации в становлении речевого слуха и формировании голосовых прототипов в процессе онтогенеза. Приведены основные модели процесса восприятия речи и данные по изучению нейрофизиологических механизмов фонематического анализа, на основе которых они формировались. Представлены результаты экспериментальных и модельных исследований, которые свидетельствуют о том, что адаптационные процессы играют важную роль в усилении контраста сигнала с фоном и приводят к улучшению идентификации сигнала. Рассмотренные в обзоре особенности слуховой адаптации к речевому сигналу имеют практическое значение для организации реабилитационных мероприятий по восстановлению и развитию речевого слуха пациентов после слухопротезирования, а также для разработки технических систем распознавания речи.

Ключевые слова: слуховое восприятие речи, слуховая адаптация, речевой сигнал, экстралингвистические характеристики речи, эффект вечеринки, слуховое внимание

DOI: 10.31857/S0044452922050035

ВВЕДЕНИЕ

Повседневное общение людей происходит на фоне шумов различной временной и спектральной структуры. Поэтому даже доклинические нарушения слуховой функции могут вызывать затруднения в распознавании речевого сигнала. Значительная потеря слуха приводит, как правило, к невозможности эффективной коммуникации в большинстве общественных мест. Современный уровень слухопротезирования не способен полностью решить задачу выделения целевого сигнала в шуме при общении пациента — пользователя слухового аппарата или кохлеарного импланта. Разработка фундаментальных вопросов о слуховых механизмах распознавания речи и ориентации в пространстве на фоне нестационарной помехи относится к области физиологии слуха, условно обозначаемой как проблема вечеринки (“the cocktail-party problem”). Она является одной из наиболее актуальных проблем как в фундаментальном плане, так и в прикладных разработках по разви-

тию технологий слухопротезирования, распознавания речи диктора в реальной зашумленной среде [1, 2].

Пространственные аспекты проблемы вечеринки подробно рассмотрены нами в обзоре [3], где обсуждаются бинауральные механизмы освобождения от маскировки и роль пространственной избирательности слухового внимания в выделении речевого сигнала на фоне окружающего шума. Изучение бинауральных механизмов в решении задачи пространственной настройки на голос диктора и в пространственном освобождении от маскировки имело существенный практический выход. Оно позволило обосновать необходимость двухстороннего протезирования слуха и разработку слухопротезирующих систем нового поколения, ориентированных на реализацию механизмов бинаурального взаимодействия [4].

Помимо локализации источника речевого сигнала его выделению из шума способствуют спектральные характеристики голоса диктора, такие

как основная частота голоса, его тембр, звукопронизношение и другие пара- и экстралингвистические характеристики. Индивидуальные или ситуационные особенности речи диктора в отношении ее темпа и ритмической организации также могут являться признаками, на основе которых происходит выделение и распознавание его речи в шуме. Распознавание речевого сигнала предусматривает его сегментацию и, таким образом, включает аспекты временного слухового анализа в условиях зашумления нестационарным сигналом. На фоне разнообразных шумов особое значение имеют процессы слуховой адаптации, которые приводят к усилению контраста сигнала и фона и, тем самым, способствуют улучшению условий для выделения и распознавания целевых признаков речи. Процессы адаптации широко распространены в слуховой системе и проявляются на разных уровнях обработки акустического сигнала – от волокон слухового нерва до структур коры головного мозга, где они связаны с центральной обработкой характеристик окружающей среды и речевых последовательностей, а также процессами слухового внимания и разделения конкурирующих звуковых потоков [5, 6]. Проявления адаптации в отношении индивидуальных спектрально-временных характеристик речи диктора при анализе сложной сцены будут рассмотрены в данном обзоре.

МАСКИРОВАНИЕ РЕЧЕВОГО СИГНАЛА И СЛУХОВАЯ АДАПТАЦИЯ

При разделении звуковых потоков в ситуации акустической сцены с множеством источников звука определяющее значение имеет способность слушателя выделять индивидуальные характеристики речи диктора [1]. В такой ситуации речь диктора выступает как полезный или целевой сигнал от интересующего нас в данный момент источника звука. Остальные составляющие акустической сцены – как помехи, конкурирующие с ним, и маскиры. Их действие обычно описывают в терминах энергетической и информационной маскировки. Энергетическая маскировка характеризуется спектральным и временным взаимодействием целевого сигнала и маскира [7]. Этот вид маскировки объясняют как результат перекрывания паттернов возбуждения, возникающих в ответ на целевой сигнал и маскер на периферии слуховой системы [8]. В отличие от энергетической информационной маскировка влияет на центральные процессы в слуховой системе, связанные с вниманием и с анализом информации [9, 10]. Заметим, что в ситуации сложной акустической сцены, т.е. на фоне других акустических сигналов, величина информационной маскировки лингвистической информации (смысла речи) и экстралингвистических составляющих целевого речевого сообщения (пол, возраст, эмо-

циональное состояние диктора) могут быть различными.

При этом первой задачей в условиях сложной сцены оказывается обнаружение целевого сигнала. Обнаружению нового объекта в окружающей среде способствует адаптация слуховой системы к текущей информации. Считают, что адаптация к биологически значимым сигналам, в том числе речевым, в значительной степени обусловлена процессами в соответствующих областях коры больших полушарий головного мозга. В результате адаптации ограниченный диапазон реакции нейронов в процессе кодирования слуховых сигналов сдвигается в направлении расширения динамического диапазона этих реакций [11]. При изменении статистических свойств сигналов слуховая адаптация приводит к улучшению представления их информативных признаков, что позволяет рассматривать адаптационные процессы как эффективную стратегию кодирования [12–14]. Адаптивное кодирование определенных параметров стимулов было показано в нескольких подкорковых областях и областях коры [15, 16]. В частности, было выявлено, что слуховые кортикальные реакции у животных избирательно кодируют особенности вокализации в условиях шумов, имеющих разные спектральные характеристики [15–19].

Свойство слуховой системы обнаруживать новый источник информации (нового диктора) и разделять акустические потоки имеет высокую потенциальную ценность для развития технических систем распознавания речи, голосовых интерфейсов (voice user interface) и устройств голосового управления (voice command device) [20, 21]. Понимание и применение этого физиологического механизма способствуют решению технических вопросов распознавания речи на новом уровне.

СЛУХОВАЯ АДАПТАЦИЯ К ПАРАМЕТРАМ ЗВУКОВОГО СИГНАЛА

Слуховую адаптацию можно наблюдать при длительном предъявлении постоянного или повторяющегося стимула с одинаковыми характеристиками, которое вызывает временное изменение в восприятии последующих стимулов (слуховое последствие). Обычно отмечают негативный эффект слухового последствия, при котором наблюдается смещение перцептивной оценки в противоположном направлении относительно характеристик адаптирующего стимула. В основе механизма адаптации лежит изменение работы нейронных популяций, участвующих в анализе ключевых признаков последовательности сигналов. Одним из первых наблюдений слуховой адаптации является так называемый “тон Цвиккера”. Его появление связано с тем, что после прослушивания широкополосного шума, содержащего спектральную вырезку шириной около одной

трети октавы, у слушателя на несколько секунд возникает ощущение звучания тона, соответствующего ее характеристикам [22]. Потенциальные нейрональные корреляты для этой слуховой иллюзии были выявлены на уровне слуховой коры [23, 24]. По-видимому, ее проявление обусловлено временным усилением чувствительности, связанным с освобождением от торможения в центральных слуховых нейронах с частотой настроечной кривой в пределах спектральной вырезки. Эти нейроны были наименее стимулированы во время звучания адаптирующего шума. Тон Цвиккера демонстрирует особенность адаптации, которая отражает настройку анализатора на текущую структуру информационного потока. В результате воздействия сигналов настройка меняется, и адаптация непосредственно оказывает влияние на процесс сегрегации и группировки акустических потоков.

Исследования сегрегации акустических потоков показывают, что она определяется как обработкой сенсорных сигналов (обработка снизу вверх), так и когнитивным состоянием слушателя, например, фокусом внимания (обработка сверху вниз) [6, 25, 26]. Согласно представлению о слуховой адаптации последнее в значительной мере зависит от непосредственно предшествующей (текущей) информации. В ЭЭГ-исследовании [27] было обнаружено, что эффективность разделения потоков при условии фокусировании внимания вне этих потоков обратно пропорциональна сходству между их корковыми представительствами. Этот факт свидетельствует о том, что адаптация к текущей слуховой информации является универсальным процессом, который лишь отчасти, но не полностью определяется состоянием внимания слушателя.

Адаптация слуховой системы к нестационарному речевому или речеподобному сигналу происходит по ряду его параметров, в том числе, уровню звука, его спектральным составляющим, ритмической структуре, положению его источника, спектрально-временному контексту речевой последовательности [28]. В эксперименте, как правило, исследуют адаптацию к определенному признаку звукового стимула, например, к амплитудной модуляции [29–31], длительности [32], ритму [33], спектральным характеристикам [34, 35]. Наряду с адаптацией к простым или “одномерным” признакам известны эффекты для сложных признаков, таких как положение источника звука в пространстве [36–38] или его движение в определенном направлении и с определенной скоростью [39–41]. Такие признаки являются сложными или комбинированными, так как содержат монауральные и бинауральные признаки локализации.

Слуховое последствие было выявлено для многих характеристик слухового восприятия речевого сигнала: фонематическая категория [30, 42–

44], пол диктора [45], тембр голоса [46], вокальная эмоция [47]. Адаптация к биологически значимым сигналам, которые содержат большой комплекс признаков, оказывается более выраженной по сравнению с адаптацией к одному из них [48]. Таким образом, слуховую адаптацию можно рассматривать как общий принцип обработки акустических сигналов, включая голоса дикторов, адаптивное кодирование которых играет особую роль в слуховом анализе речи.

АДАПТАЦИЯ К РИТМУ. ТЕМПО-РИТМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РЕЧИ

Акустический речевой поток по своим физическим характеристикам очень неоднороден, так как образован не одним излучателем, а сложной системой источников звука разной природы при голосообразовании. В нем присутствуют квазипериодические элементы типа гласных и вокализованных согласных, шумовые сегменты разной длительности, паузы. В соответствии с известными закономерностями первичного слухового анализа сцен последовательность из подобных сегментов должна разделяться на отдельные потоки. Это подтверждается результатами экспериментов, в которых слушатели воспринимали последовательности гласных звуков, дополнительно разделенных встроенными паузами [49]. Слушатели разделяли предъявляемую последовательность на потоки, если гласные принадлежали к разным фонемным классам и имели разную форму спектральной огибающей. Это означает, что гласные звуки в такой ситуации воспринимались как сигналы из разных источников, несмотря на то, что их произносил один и тот же диктор. Предполагается, что единство (слитность) речевых потоков, произнесенных одним диктором (голосом), обеспечивается плавностью спектральных переходов между смежными речевыми звуками – фонемами, и интонационной (просодической) когерентностью [50].

Речевые сигналы являются квазиритмическими, причем интервалы между усилением звуков речи (выделение ударением) довольно изменчивы. Коэффициенты вариации составляют более 30% от среднего интервала между ударениями [51, 52]. Вместе с тем речевые паттерны могут вызывать субъективное впечатление изохронии [53]. Более высокая регулярность обнаруживается в метрической речи, такой как поэзия [54–56], и при групповой речепродукции – молитвах и хоровом пении [57]. Адаптация к ритмам была исследована в диапазоне 100–700 мс между ударами, что примерно соответствует ритмическому диапазону речи. После адаптации к быстрому слуховому ритму, умеренно быстрый тестовый ритм (400 мс между ударами) казался медленным и наоборот [33]. Таким образом, были получены данные о типичном нега-

тивном последствии при восприятии ритма. Величина этого эффекта уменьшалась по мере того, как расхождение ритмического рисунка или паттерна между адаптирующими звуковыми последовательностями и тестовыми последовательностями становилось больше. Результаты последней упомянутой работы подтверждают предположение, что сенсорная временная информация кодируется нейрональными единицами, настроенными на определенные временные интервалы с широкими перекрывающимися кривыми настройки. Последствие ритма не зависело от того, на какое из ушей подавали адаптирующий и тестовый стимулы, а также от того, было это одно или оба уха. Данные факты означают, что информация о ритме звукового сигнала от обоих ушей обрабатывается в слуховых центрах с общим механизмом анализа времени. Информация о пространственно-временных характеристиках кодируемых звуковых сигналов достигает таламуса и мозжечка на самых ранних стадиях слуховой обработки [58, 59]. Мозжечок проецирует важную информацию, закодированную в слуховом сигнале (начало, конец сигнала и резкие изменения уровня), через таламус непосредственно в лобную кору. Полученные в работе [33] экспериментальные данные подтверждают, что описываемые временные свойства формируют основу временного паттерна, обнаруживаемого в обработке простого и сложного ритма. Эта ритмическая основа опирается на ту же нейронную фронто-стриарную архитектуру, что и любая другая временная обработка. Таким образом, адаптация слуха к относительно простым — временным или, иначе, темпо-ритмическим характеристикам речи, демонстрирует сложную функциональную организацию процесса адаптации.

АДАПТАЦИЯ К НЕЛИНГВИСТИЧЕСКИМ ХАРАКТЕРИСТИКАМ ГОЛОСА — ПОЛУ ДИКТОРА И ЕГО ЭМОЦИОНАЛЬНОМУ СОСТОЯНИЮ

Темпо-ритмическая характеристика речи отчасти отражает эмоциональное состояние и может свидетельствовать о нарушении центральных механизмов формирования речи и эмоций [60]. Наибольшее значение для оценки нелингвистических составляющих речи диктора и, в особенности, его голоса имеют спектральные характеристики. К последним относятся частота основного тона голоса диктора, ее модуляция и тембр. Показано, что адаптация к нелингвистической информации голоса также вызывает слуховое последствие.

Так, в работе [45] были получены первые экспериментальные доказательства слуховой адаптации к качеству голоса, а точнее, к половой принадлежности диктора. Стимулы представляли собой высококачественные аудиозаписи голосов пяти женщин и пяти мужчин — носителей немецкого языка

(в возрасте 20–27 лет). Дикторы произносили четыре триграммы, содержащие гласный — согласный — гласный звуки (ГСГ), — /aba/, /aga/, /ibi/ и /igi/. Аудиозаписи составили пять пар женских и мужских голосов, которые были модифицированы с помощью особого алгоритма обработки голосовых характеристик — auditory morphing [61]. В итоге для каждой из пяти пар были созданы семь стимулов, в которых пропорции женского/мужского голоса соответствовали: 80/20%, 70/30%, 60/40%, 50/50%, 40/60%, 30/70% и 20/80%. Было показано, что предварительная адаптация к мужским голосам по контрасту определяет восприятие последующих голосов как более женских и наоборот. При использовании в качестве адаптирующих сигналов синусоидальных тонов с частотой, соответствующей частоте основного тона мужского или женского голоса, подобного последствия не наблюдалось. Эффект отсутствовал и в ситуациях кроссмодальной адаптации, когда предьявлялись фотографии мужских и женских лиц или текстовые варианты имен соответствующего рода. Предполагалось, что это связано с использованием статических (без артикуляции) изображений, нивелирующих проявления аудио-визуального взаимодействия (эффект Мак-Гурка). В целом результаты исключали объяснения слухового последствия голоса через адаптацию только к высоте звука и демонстрировали влияние процессов адаптации на голосовые репрезентации высокого уровня, аналогично контрастным эффектам при распознавании лиц. Области коры больших полушарий мозга, в которых реализуется нейрофизиологический механизм адаптации к гендерной принадлежности диктора, по предположениям Belin и Zatorre [62], а также Lattner и соавт. [63], находится в слуховой ассоциативной коре перед извилиной Гешля и/или в верхней височной борозде правого полушария. Таким образом, адаптация может рассматриваться как общее свойство высокоуровневого сенсорного кодирования при восприятии нелингвистической социально значимой информации от изображений лиц до голосовых характеристик дикторов. При этом адаптационные эффекты к характеристикам голоса зарегистрированы не только в отношении определения пола [45, 64], но и при оценке вокального возраста диктора [65].

Другим важным видом экстралингвистической информации, содержащейся в голосе, является эмоциональное состояние диктора. Восприятие эмоциональных состояний имеет решающее значение для адекватного социального взаимодействия. Известно, что эмоции отражаются в лице, но также и в голосе [66], жесте [67], движении тела [67–69]. В работе [70] впервые была показана слуховая адаптация при восприятии вокального аффекта. В этом исследовании адаптация к гневной вокализации (одиночные/а/-гласные) приводила к восприятию эмоционально неоднозначных голо-

сов (трансформированных в “гнев–испуг” континуум) как более испуганных и наоборот. В другом эксперименте этой же работы аналогичное последствие обнаружено для естественных и синтезированных адаптирующих голосов. Полученные эффекты интерпретировались авторами как указывающие на то, что эмоциональное последствие не является исключительно следствием низкоуровневой адаптации, а скорее может зависеть от более высокого уровня восприятия аффективной категории адаптирующего стимула. Негативное последствие адаптации к счастливым или гневным голосам приводило к тому, что тестовые голоса, трансформированные в континуум “счастье–гнев”, воспринимались как более счастливые после предшествующей адаптации к сердитым (гневным) голосам и наоборот [47]. Эти результаты демонстрируют контрастные механизмы при анализе аффективной информации и расширяют данные работы [70], где при адаптации к эмоциональной составляющей были выявлены гендерно-специфические различия. Эффект гендерной специфичности при адаптации к вокальным эмоциям особенно четко проявился для адаптирующих женских голосов. Для женских тестовых голосов адаптационные эффекты были более выражены на эмоционально-неоднозначных морфологических (стимульных) уровнях, в то время как для мужских тестовых голосов адаптационные эффекты были одинаковыми для всего континуума эмоций. Аналогичные гендерно-специфические эффекты были выявлены и при изучении последствия в условиях восприятия возраста диктора по голосу [71].

В одной из последних работ на эту тему [72] была предпринята попытка оценить относительную роль основной частоты (F0) и тембра в адаптации к вокальным эмоциям гнева и страха. В экспериментах применяли адаптацию к голосам, содержащим информацию об эмоциях либо в F0, либо в тембре. Остальные параметры оставались постоянными и не имели однозначно выраженной эмоциональной составляющей, что соответствовало пропорции 50%/50% согласно отмеченному ранее алгоритму (auditory morphing). Голоса с полностью выраженной эмоцией (100%/0%) и неоднозначные голоса использовали в качестве эталонных условий. Все адаптирующие стимулы были сформированы голосами дикторов либо того же пола, что и пол диктора в тестовых стимулах (Эксперимент 1), либо противоположного пола (Эксперимент 2). В Эксперименте 1 обнаружили устойчивое последствие при всех условиях адаптации. Однако последствие при адаптации к тембру было выражено намного больше, чем при адаптации к частоте основного тона голоса, и лишь незначительно меньше, чем в случае адаптации к исходному (не трансформированному) голосу. В Эксперименте 2 величина последствия была значительно меньше, а различия в величине последствия между адаптирующими

сигналами с разными типами обработки оказались незначимыми. Данные показывают, что в адаптации вокальных эмоций тембр играет большую роль, чем частота основного тона голоса, а также, что адаптация к вокальным эмоциям нарушается из-за устранения гендерного соответствия между адаптирующими сигналами и целевыми (тестовыми) стимулами. Эти результаты дополняют растущее количество свидетельств, указывающих на важную роль тембра в слуховой адаптации к речевому сигналу.

ПРОТОТИПНОЕ КОДИРОВАНИЕ И АДАПТАЦИЯ К ГОЛОСУ

При исследовании адаптации к голосам конкретных дикторов были получены экспериментальные данные, подтверждающие прототипное кодирование голосовой идентичности [73]. Оно состоит в следующем: индивидуальный голос с характерным для него тембром кодируется в многомерном перцептивном пространстве голосовых характеристик, и его идентичность определяется положением в этом пространстве [71, 74]. Два измерения перцептивного пространства, объясняющие большую часть дисперсии в суждениях о несходстве, хорошо аппроксимируются параметрами частоты основного тона голоса (F0) и формантными частотами [75]. Все пространство формируется относительно среднего голоса, который может выступать в качестве эталона (прототипа) для кодирования других голосовых идентичностей. Таким образом, прототип определяется как голос, относительно которого оцениваются все остальные. Он считается центром массы многомерного голосового пространства и может быть аппроксимирован экспериментально как трансформация на основе усреднения 16 мужских голосов [74, 75]. Важно отметить, что результаты моделирования пространства получены в упрощенном контексте восприятия голосовой идентичности из кратких гласных. Хотя этот контекст аналогичен упрощенному контексту восприятия лица из статических изображений лиц и дает сопоставимые выводы, их нельзя обобщить на более сложные, естественные ситуации. Как правило, другие речевые характеристики, выявляющиеся в течение более длительного времени, также способствуют распознаванию диктора, например, конкретные фонетические шаблоны, диалект, интонация, скорость речи и т.д.

Формирование индивидуальных особенностей речи в процессе раннего онтогенеза и дальнейшей жизнедеятельности также можно отнести к эффектам длительной речевой адаптации с прототипической настройкой в восприятии голосов [76–80]. К этим процессам относятся закрепление фонемных категорий и интонационных конструкций родной речи, влияние особенностей окружающей речевой среды, формирование психоэмоциональных реак-

ций на определенные характеристики голоса, особенно в отношении голоса матери. Известно, что младенцы изначально способны различать фонетические единицы по всему континууму звуков речи. По мере развития и адаптации к акустическим характеристикам родного языка, у них происходит закрепление его специфических контрастов, в то время как чувствительность к неродной фонетической информации постепенно снижается [76, 77]. Наиболее “сензитивным” периодом для фонетического обучения и формирования основы категориального восприятия речевых звуков является возраст от 6 до 12 месяцев. К 6 месяцам младенцы учатся выделять гласные фонемы родного языка, к 11–12 месяцам – осваивают контрасты согласных звуков [77, 81]. Предполагается, что в этот период развития закладываются нейронные связи и формируется система “native language neural commitment (NLNC)”, облегчающая дальнейшее языковое развитие [77, 79, 81, 82]. По завершении ее формирования освоение нового языка будет проходить без эффектов “облегчения”, т.е. аналогично обучению иностранному языку у взрослых.

В сензитивный период эти процессы пластичны и находятся в зависимости от сенсорного опыта. Это подтверждают исследования, связанные с возможностью “обогащения” акустической среды вокруг младенцев. Показано, что включение иностранной речи, в частности второго языка, ведет к расширению формируемого диапазона фонемных контрастов (категорий) и проявлению эффектов адаптации. Регулярное прослушивание музыкальных сигналов (ритм, высота) улучшает освоение просодических паттернов речи – структуры слогов, словесного ударения, интонационных конструкций, а также фонемного различения для ряда языков с высотной оппозицией речевых единиц, например, китайского мандаринского языка [78, 83]. Обучение звуковым категориям языка достигается, по мнению ряда исследователей, только посредством пассивного слушания (статистическое обучение) и может начинаться уже во внутриутробном периоде [84, 85]. Аргументом в пользу этого предположения выступают, в частности, данные о том, что уже в первый день после рождения младенцы способны выделять голос матери и реагировать на него поворотом головы [80]. В раннем постнатальном периоде фиксируются также и другие реакции – увеличение скорости сосания при появлении новых акустических сигналов и, наоборот, ее снижение до фоновых значений по мере “привыкания” ребенка к их звучанию [81, 84]. Наряду с элементами перцептивной предрасположенности и пассивного обучения, в процессе освоения речевой деятельности включаются и активные процессы – врожденные программы лепета, компоненты имитации воспринимаемых речевых сигналов и их просодических характеристик. Эти процессы базируются на развитии у ребенка меха-

низмов слухо-проприоцептивного и слухо-зрительного взаимодействия. При этом голос матери и адекватная коммуникация в диалоге “мать–дитя” оказываются важнейшими факторами не только языковой и социальной, но и биологической адаптации ребенка [86, 87]. Эффективное воздействие голоса матери на психофизиологический статус младенцев подтверждается результатами его терапевтического использования в клинической практике неонатальных центров [88–92]. Таким образом, голос матери играет особую роль и в освоении образцов родной речи, и в формировании прототипических голосовых характеристик (модели протодиктора).

Сходные процессы адаптации и обучения, связанные с освоением звукового строя языка, интонационных особенностей речи и формированием способности к распознаванию голосов дикторов (кодированию голосовой идентичности) на основе направленной тренировки, наблюдаются и при реабилитации ранооглохших пациентов после операции кохлеарной имплантации [93–99], а также в период адаптации к новым условиям “слушания” у постлингвальных пациентов с кохлеарными имплантами и у начинающих пользователей слуховых аппаратов, имеющих выраженную тугоухость [96, 100–103]. В этих условиях формируются или корректируются исходные протообразы как речевых единиц, так и голосовых характеристик [104]. При этом процесс адаптации затрагивает не только возможности гендерного различения дикторов, но и настройку собственного голоса (развитие слухового контроля) и узнавание голосов близких людей, перцептивные образцы которых находятся в долговременной памяти [96, 100, 105–107].

К перечисленным выше проявлениям долговременной слуховой адаптации близки результаты экспериментов по изучению эффектов адаптации к антиголосам (голосам, отличающимся от прототипа в противоположном направлении относительно конкретных). Эти эффекты можно считать подтверждением прототипного представления идентичности голоса [45, 61, 73]. Ограничение экспериментов по долговременной адаптации состоит в том, что в них использовали небольшие наборы голосов или простые (гласные) стимулы. Для рассмотрения прототипного кодирования идентичности голоса как единого принципа обработки речевой информации желательно получить подтверждение при применении больших наборов знакомых дикторов и произвольных образцов речи.

ПРИМЕНЕНИЕ АДАПТАЦИИ К ИЗУЧЕНИЮ НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ФОНЕМАТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Начальный анализ речевого сигнала основан на сегментации потока речи и выделении его звуковых единиц (фонем). Для доказательства действия

нейрофизиологических механизмов — детекторов признаков, которые опосредуют восприятие речи и отдельных речевых звуков, рассматривали результаты избирательной адаптации и различения стимулов вблизи фонемных границ [108]. В частности, чтобы выяснить, могут ли эффекты границы фонемы и ее сдвига после адаптации быть отнесены к изменениям предвзятости ответа (*response bias*) или к явлениям слуховой адаптации, была использована модель теории обнаружения. Эта модель была применена при анализе фонемной идентификации разных наборов стимулов (/ap—ab—/, /bd/, /bp/) до и после адаптации. Результаты показали, что изменения в идентификации фонемы после адаптации могут быть вызваны сдвигами в критериях оценки, а не изменениями на сенсорном уровне.

Влияние избирательной адаптации на восприятие контрастов языковых признаков исследовалось также в работе [109]. Тестовый стимул состоял из серии синтетических речевых звуков — 13 слогов согласный-гласный, которые варьировали по частоте основного тона и по направлению переходов второй и третьей формант. Изменения в формантных переходах были достаточными для восприятия разных согласных в слогах [b æ], [d æ] и [g æ]. Установлено, что значительный адаптационный эффект был получен как в задаче фонемной идентификации, так и в задаче различения согласных. Использование в качестве адаптирующего сигнала слога [bi], у которого переходы второй и третьей формант отличались от тестовых стимулов, позволило предположить, что последствие наблюдается на уровне фонетического анализа признака, а не отдельных акустических составляющих.

Сходные выводы были сделаны и при исследовании эффекта избирательной адаптации на материале русских взрывных согласных [30]. В работе сравнивали результаты адаптации к неречевым и речевым стимулам с близкими акустическими характеристиками — спектральный состав, изменения амплитудной огибающей (двухтоновый комплекс и фонемный ряд [a] — [ta] — [da]). Для неречевых звуков адаптацию выполняли путем многократного предъявления стимула с максимальным значением длительности между началом сигнала и моментом приращения интенсивности, для речевых — соответственно слогом [da]. При восприятии неречевых стимулов изменений в границе обнаружения амплитудной неравномерности после адаптации выявлено не было. При восприятии речевых стимулов граница между гласным и глухим согласным [ta] оставалась неизменной, а для слогов с глухим и звонким взрывным согласным значимо смещалась по принципу контраста — расширение категории [ta] и сокращение категории [da].

Результаты другой группы экспериментов по избирательной адаптации с использованием взрывных согласных были интерпретированы с точки зрения изменения состояния детекторов слуховых и фонетических признаков, а также контраста откликов [110]. В этих исследованиях использовали процедуры избирательной адаптации и парных сравнений между последовательно предъявляемыми стимулами — слогами с сочетанием разных категорий согласных. Один из стимулов представлял звукосочетание [spa], за которым следовал интервал тишины (75 мс) и слог [ba] (время начала голоса 10 мс). При предъявлении он воспринимался как слог [spa] с глухим согласным [p] (без голоса), несмотря на то, что спектральная структура ее конечного элемента сочетания “взрывной—гласный” внутри него была идентична слогу, оцениваемому как [ba] в тестовой серии [ba]-стимулу [pha]. Как адаптирующие стимулы, конечные слоги [spa] и [ba] имели одинаковые эффекты. В процедуре парного сравнения [spa] приводил к оценке неоднозначных тестовых стимулов как “b”, слог [ba] — как “p”. Результаты этих экспериментов показали, что ни контраст ответа, ни обнаружение фонетических признаков не участвовали в избирательных адаптационных эффектах, обнаруженных для ряда “гласный — взрывной согласный”. На основании полученных данных можно утверждать, что избирательные адаптационные эффекты возникают на раннем, слуховом, уровне обработки, который реагирует на спектральное перекрытие между адаптирующими и тестовыми стимулами.

Выводы работы [110] были позднее подтверждены в исследовании по избирательной адаптации к отдельным фонемам, в котором был использован синтезированный согласный-гласный континуум в диапазоне от [ba] до [da] [44]. В экспериментах участвовали дети в возрасте от пяти до шести лет и взрослые. В одном из условий избирательной адаптации внимание слушателей было сосредоточено на адаптационном стимуле [ba], который являлся конечной точкой синтезированного континуума. В другом случае внимание участников эксперимента было сосредоточено не на противоположной конечной точке континуума — [da], а на контралатерально и одновременно прослушиваемых слогах “she” и “see”. Результаты этих экспериментов, по сравнению с двумя более типичными условиями адаптации, показали, что внимание не усиливает избирательные эффекты адаптации. В группе детей данные демонстрировали меньшую величину эффекта при условии сосредоточения внимания на адаптирующем стимуле. В отличие от взрослых дети незначительно изменяли свои ответы после воздействия адаптирующих стимулов [ba]. Этот результат совпадал с данными работы [111]. Вместе с тем дети значительно изменили оценки после воздействия адаптирующего стимула [da]. Таким образом, результаты исследования по различению

стимулов “согласный-гласный” поддержали представление о важности акустической обработки для реализации избирательной адаптации. Совокупность этих данных подтверждает гипотезу о различиях в сенсорной обработке у нормально развивающихся детей по сравнению со взрослыми и демонстрирует, что способности к различению фонем связаны с навыками восприятия речи, т.е. удержания внимания на речевом стимуле.

Для изучения адаптации речевых континуумов в переходах слогов [ba]–[wa] и [cha]–[sha] были проведены три эксперимента с использованием неречевых стимулов (музыка и шум) [112]. Адаптирующие стимулы вызывали значительные сдвиги границ фонем на речевых континуумах только тогда, когда они совпадали по периодичности: музыкальные стимулы влияли на восприятие [ba]–[wa], а шумовые стимулы – на [cha]–[sha]. Причем такие эффекты возникали даже тогда, когда адаптирующие стимулы и тестовые континуумы не совпадали в других простых акустических признаках (время нарастания или длительность согласных). Спектральное перекрытие адаптирующих и тестовых стимулов также оказалось несущественным для результата адаптации. Эти данные подтверждают существование слуховой обработки избирательной к сложным акустическим сигналам, а также нейронно-детекторов, которые реагируют на более сложные признаки речи, характеризующие фонемы. Заметим, что в данном случае наблюдалась асимметричная адаптация, которая свидетельствовала против оппонентного процесса функционирования таких групп нейронов, т.е. против формирования контраста.

На основе данных, полученных в рассмотренных выше работах по избирательной адаптации к различным фонемным конструкциям, была предложена двухуровневая акустическая модель процесса восприятия речи. Ее первый уровень отражает процессы слухового анализа речевого сигнала, на основе которого производится преобразование следующего уровня и переход к более абстрактным признакам и их дальнейшей фонетической и лексической интерпретации. Однако пока не существует единой согласованной модели восприятия речевых сигналов. Разнообразие предложенных разными авторами моделей объясняется сложностью процесса и вовлечением в него не только процедур слуховой обработки, но и сенсорно-моторных программ речепродукции (артикуляция, просодика), а также когнитивных процессов – язык, память, мышление. Модели восприятия речи представлены моторной теорией [113], теориями “следов” [114], категориального восприятия [115], “двойного потока” [116] и другими.

Помимо выделения различных аспектов речевой функции, модельные подходы можно разделить на “пассивные”, т.е. ориентированные в ос-

новном на процессы восприятия, и “активные” – предполагающие взаимосвязь восприятия речи и речепродукции. Другой принцип разделения выбран по отношению к включению в работу моделей как восходящего, так и нисходящего путей обработки. Здесь можно выделить теории “следов” и “двойного потока”, допускающих реализацию стратегий влияния и “снизу–вверх” и “сверху–вниз” [117]. При этом вопросы моделирования процессов нормализации речевого сигнала и его адаптации к дикторской вариативности остаются пока не решенными [118].

НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ СЛУХОВОЙ АДАПТАЦИИ К ХАРАКТЕРИСТИКАМ РЕЧИ

В основе кодирования ключевых признаков речи и избирательного реагирования на определенный информационный поток (речь конкретного диктора) лежат нейрофизиологические механизмы, реализующиеся на разных уровнях слуховой системы – от стволовых структур до слуховых и мультисенсорных областей коры больших полушарий. Таким образом, в анализе акустической сцены задействована обширная нейронная сеть, которая реализует функции сегрегации речевых потоков. Инвариантное по отношению к шуму представление речи было показано в слуховой коре человека [6, 119, 120]. Вместе с тем пространственно-временное разрешение неинвазивных методов нейровизуализации ограничено, поэтому данные методы не позволяют четко выявить кодирование речевых характеристик у людей в шуме. Другой особенностью исследований нейронного представления речевого сигнала или вокализаций животных в шуме является использование постоянных фоновых шумов. Эти экспериментальные ограничения привели к тому, что наблюдали только результат адаптации и свойства нейронного представления речи после постоянного шумового воздействия. Остается неясным, каким образом, в какие временные периоды и в каких областях коры больших полушарий адаптация формируется, когда новый фоновый шум внезапно появляется в акустической сцене или, наоборот, исчезает из нее. По этой причине многие важные вопросы, касающиеся динамических свойств адаптации к речи на фоне шума в слуховой коре человека, остаются без ответа. Вместе с тем ответы на них имеют решающее значение для создания полной динамической модели обработки речи в слуховой коре человека.

В работе [121] были объединены методы инвазивной электрофизиологии и психоакустические эксперименты, что позволило исследовать динамические механизмы обработки речи на фоне шума в слуховой коре человека. Нейрональная запись производилась с помощью глубоких и поверхностных электродов высокого разрешения, им-

плантированных в слуховую кору нейрохирургических больных. На основе данных электрокортикографии, полученных при участии шести человек, анализировали нейрональную активность в гамма-диапазоне (75–150 Гц). Усредненная нейрональная реакция показала кратковременный переходный пик со средней длительностью 670 мс, который возникал сразу после изменения фона. Эта кратковременная реакция проявлялась во всех четырех условиях эксперимента (речь на фоне трех типов шума и контроль в тишине), даже при переходе от речи в шуме к речи в тишине. Наблюдали кратковременное и значительное снижение соотношения сигнал – шум (С/Ш) для представления речевого сигнала в слуховой коре в начальном процессе адаптации. По завершении адаптации к шуму соотношение С/Ш увеличивалось. Таким образом, когда новый фоновый шум появлялся на акустической сцене во время восприятия речи, слуховые нейроны мгновенно реагировали на его особенности, но затем быстро адаптировались, что приводило к подавлению нейронного кодирования шума и усилению нейронального кодирования речи, а также улучшению восприятия ее фонетических особенностей и разборчивости. Таким образом, методический подход, использованный в работе [121], позволил выявить специфические особенности нейронального кодирования речи и фонового шума во время развития адаптационного процесса. Было обнаружено, что величина эффектов адаптации к различным фоновым шумам различна в разных нейрональных областях. Данный результат можно рассматривать как вполне предсказуемый, учитывая особенности спектрально-временных характеристик настройки этих областей.

В дополнение к спектральному перекрытию выделение слухового объекта из фонового шума, имеющего временную структуру, требует интеграции сигнала во времени [122, 123]. Реконструктивный анализ нейрональной активности, выполненный в работе [121], выявил кодирование спектрально-временных особенностей стимула в реакциях нейронных популяций. Используя высокую гамма-активность, авторы работы исследовали относительные расстояния между нейронными представлениями фонем во время и после адаптации. Было обнаружено, что относительное расстояние фонем в реакциях нейронных популяций значительно уменьшается в начальный период адаптации, но затем существенно увеличивается. Различимость разных реконструированных фонетических признаков также снижается в начальный период адаптации к новому фоновому состоянию и далее увеличивается.

В психоакустических экспериментах распознавание фонем сходным образом ухудшалось в начальный период адаптации к новому типу шума [121]. При этом величина эффекта адаптации к фоновым шумам была больше при прослушивании

речи в шуме по сравнению с прослушиванием только шумовой помехи. Это означает, что наличие речевого сигнала было необходимым условием для наблюдаемого подавления реакций нейронных популяций на шум. Наблюдалось также снижение точности в восприятии фонем при переходе от прослушивания шумного фона к тишине. Эти проявления хорошо согласуются с психофизическими исследованиями прямой маскировки, где обнаружение целевого сигнала может быть нарушено предшествующим звуком [124], особенно когда акустические характеристики шума и цели перекрываются [125]. При этом повышается роль адаптационных процессов в усилении контраста сигнала и фона, а также в улучшении условий для выделения и распознавания признаков речи целевого диктора. Таким образом, адаптационные процессы играют важную роль в восприятии речевого сигнала при различных условиях, что приводит к улучшению его разборчивости и определения дикторской принадлежности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Слуховая адаптация – это полезный механизм, позволяющий гибко и быстро изменять чувствительность слуха к внешним акустическим раздражителям в соответствии с меняющейся окружающей средой. Универсальность процессов адаптации по отношению к различным динамическим характеристикам акустической сцены указывает на эффективность такого кратковременного подстраивания к параметрам информации о текущих событиях, что одновременно обеспечивает увеличение чувствительности к новым акустическим событиям [126]. Процессы адаптации развиваются уже в волокнах слухового нерва и проявляются по отношению к частоте при сохранении временной информации (начало, продолжительность звуков), при этом волокна с фазовой синхронизацией демонстрируют более слабую адаптацию [127]. Баланс адаптации к текущей слуховой информации и ее синхронизация слева и справа обеспечивают возможность обработки в ядрах ствола мозга таких акустических характеристик, как местоположение звука. На более высоких уровнях анализа проявляется адаптация к более сложным типам сигналов, которая может способствовать дальнейшей обработке информационных потоков. Она позволяет нейронным популяциям выделять комплексные характеристики слуховой среды, сложные последовательности сигналов, категориальные отношения и участвовать в таких процессах, как слуховое внимание и разделение акустических потоков. В результате выделение целевого речевого сигнала (целевого диктора) из нестационарного шума может быть обусловлено адаптацией к любому характерному для речи данного диктора признаку. В этом качестве может выступать какая-либо индивидуальная

особенность голоса или темпо-ритмическая организация речевого потока. Явление слухового последствия дает уникальный психофизический инструмент для подтверждения существования специфических детекторов различных признаков и соответствующих нейрональных популяций в слуховых центрах. Этот инструмент важен также для изучения того, как формируются нейросети, связанные с обработкой и выделением голосовых и речевых спектрально-временных характеристик в процессе онтогенеза. Особенности слуховой адаптации к спектрально-временным характеристикам голоса и речи следует учитывать и при организации реабилитационных мероприятий по восстановлению и развитию речевого слуха пациентов после слухопротезирования и, в первую очередь, после кохлеарной имплантации. Кроме того, важно подчеркнуть близкую нейрофизиологическую основу, которую демонстрируют механизмы зрительного восприятия лица собеседника и слуховой идентификации голоса диктора [128, 129].

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-25-00068).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

И.Г.А. — разработка концепции работы, анализ данных по проблематике исследования и написание рукописи; Е.А.О. — анализ данных литературы, написание раздела по онтогенетическому развитию речевой функции и редактирование рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bronkhorst AW* (2015) The cocktail-party problem revisited: early processing and selection of multi-talker speech. *Atten Percept Psychophys* 77 (5): 1465–1487. <https://doi.org/10.3758/s13414-015-0882-9>
2. *Qian Ym, Weng C, Chang Xk, Wang S, Yu D* (2018) Past review, current progress, and challenges ahead on the cocktail party problem. *Front Inf Technol Electronic Eng* 19 (1): 40–63. <https://doi.org/10.1631/FITEE.1700814>
3. *Andreeva IG* (2018) Spatial Selectivity of Hearing in Speech Recognition in Speech-shaped Noise Environment. *Human Physiol* 44 (2): 226–236. <https://doi.org/10.1134/S0362119718020020>
4. *Misurelli SM, Litovsky RY* (2012) Spatial release from masking in children with normal hearing and with bilateral cochlear implants: Effect of interferer asymmetry. *J Acoust Soc Am* 132 (1): 380–391. <https://doi.org/10.1177/1084713808325880>
5. *Pérez-González D, Malmierca MS* (2014) Adaptation in the auditory system: an overview. *Front Integr Neurosci* 8: 19. <https://doi.org/10.3389/fnint.2014.00019>
6. *Auerbach BD, Gritton HJ* (2022) Hearing in Complex Environments: Auditory Gain Control, Attention, and Hearing Loss. *Front Neurosci* 16: 799787. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.799787>
7. *Licklider JCR* (1948) The influence of interaural phase relations upon the masking of speech by white noise. *J Acoust Soc Am* 20: 150. <https://doi.org/10.1121/1.1906358>
8. *Durlach NI, Mason CR, Kidd JrG, Arbogast TL, Colburn HS, Shinn-Cunningham BG* (2003) Note on informational masking (L). *J Acoust Soc Am* 113 (6): 2984–2987. <https://doi.org/10.1121/1.1570435>
9. *Brungart DS* (2001) Informational and energetic masking effects in the perception of two simultaneous talkers. *J Acoust Soc Am* 109 (3): 1101–1109. <https://doi.org/10.1121/1.1345696>
10. *Freyman RL, Helfer KS, McCall DD, Clifton RK* (1999) The role of perceived spatial separation in the unmasking of speech. *J Acoust Soc Am* 106 (6): 3578–3588. <https://doi.org/10.1121/1.428211>
11. *Chung S, Li X, Nelson SB* (2002) Short-term depression at thalamocortical synapses contributes to rapid adaptation of cortical sensory responses *in vivo*. *Neuron* 34 (3): 437–446. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00659-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00659-1)
12. *Dean I, Harper NS, McAlpine D* (2005) Neural population coding of sound level adapts to stimulus statistics. *Nat Neurosci* 8: 1684–1689. <https://doi.org/10.1038/nn1541>
13. *Wark B, Lundstrom BN, Fairhall A* (2007) Sensory adaptation. *Curr Opin Neurobiol* 17: 423–429. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.07.001>
14. *Robinson BL, McAlpine D* (2009) Gain control mechanisms in the auditory pathway. *Curr Opin Neurobiol* 19: 402–407. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2009.07.006>
15. *Rabinowitz NC, Willmore BDB, King AJ, Schnupp JWH* (2013) Constructing noise-invariant representations of sound in the auditory pathway. *PLoS Biol* 11: e1001710. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001710>
16. *Mesgarani N, David SV, Fritz JB, Shamma SA* (2014) Mechanisms of noise robust representation of speech in primary auditory cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 6792–6797. <https://doi.org/10.1073/pnas.131801711>
17. *Narayan R, Best V, Ozmeral E, McClaine E, Dent M, Shinn-Cunningham B, Sen K* (2007) Cortical interference effects in the cocktail party problem. *Nat Neurosci* 10: 1601–1607. <https://doi.org/10.1038/nn2009>
18. *Moore RC, Lee T, Theunissen FE* (2013) Noise-invariant neurons in the avian auditory cortex: hearing the song in noise. *PLoS Comput Biol* 9: e1002942. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002942>

19. *Schneider DM, Woolley SMN* (2013) Sparse and background-invariant coding of vocalizations in auditory scenes. *Neuron* 79: 141–152.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.04.038>
20. *Kröger JL, Lutz OHM, Raschke P* (2020) Privacy Implications of Voice and Speech Analysis - Information Disclosure by Inference. In: Friedewald M, Önen M, Lievens E, Krenn S, Fricker S (eds) *Privacy and Identity Management. Data for Better Living: AI and Privacy. IFIP Advances in Information and Communication Technology*. Springer Cham 576: 242–258.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-42504-3_16
21. *Jin H, Wang S* (2018) Voice-based determination of physical and emotional characteristics of users U.S. Patent No. 10,096,319. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
<https://www.us.hsb.com/customer-service/voice>
22. *Zwicker E* (1964) ‘Negative afterimage’ in hearing. *J Acoust Soc Am* 36: 2413–2415.
<https://doi.org/10.1121/1.1919373>
23. *Hoke ES, Hoke M, Ross B* (1996) Neurophysiological correlate of the auditory after-image ‘Zwicker tone’. *Audiol Neuro-Otol* 1: 161–174.
<https://doi.org/10.1159/000259196>
24. *Noren AJ, Eggermont JJ* (2003) Neural correlates of an auditory afterimage in primary auditory cortex. *J Assoc Res Otolaryngol* 4: 312–328.
25. *Micheyl C, Carlyon RP, Gutschalk A, Melcher JR, Oxenham AJ, Rauschecker JP, Tian B, Courtenay WE* (2007) The role of auditory cortex in the formation of auditory streams. *Hear Res* 229: 116–131.
<https://doi.org/10.1016/j.heares.2007.01.007>
26. *Snyder JS, Alain C* (2007) Toward a neurophysiological theory of auditory stream segregation. *Psychol Bull* 133: 780–799.
<https://doi.org/10.1037/0033-2909.133.5.780>
27. *Hausfeld L, Riecke L, Valente G, Formisano E* (2018) Cortical tracking of multiple streams outside the focus of attention in naturalistic auditory scenes. *Neuroimage* 181: 617–626.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2018.07.052>
28. *Stilp CE* (2020) Acoustic context effects in speech perception. *Wiley interdisciplinary reviews. Cognit Sci* 11 (1): 1–8.
<https://doi.org/10.1002/wcs.1517>
29. *Rosenblith WA, Miller GA, Egan JP, Hirsh IJ, Thomas GJ* (1947) An auditory afterimage? *Science* 106: 333–335.
<https://doi.org/10.1126/science.106.2754.333>
30. *Огородникова ЕА* (1978) Эффект “селективной адаптации” при восприятии элементарных неречевых стимулов. *Физиол журн СССР* 64 (12): 1803–1808. [*Ogorodnikova EA* (1978) The effect of selective adaptation on perception of elementary non-speech stimuli. *Sechenov Physiol J USSR*. 64 (12): 1803–1807. (In Russ)].
31. *Gutschalk A, Micheyl C, Oxenham AJ* (2008) The pulse-train auditory aftereffect and the perception of rapid amplitude modulations. *J Acoust Soc Am* 123 (2): 935–945.
<https://doi.org/10.1121/1.2828057>
32. *Shima S, Murai Y, Hashimoto Y, Yotsumoto Y* (2016) Duration Adaptation Occurs Across the Sub- and Supra-Second Systems. *Front Psychol* 7: 114.
<https://doi.org/10.3389/fpsyg.2016.00114>
33. *Becker MW, Ian P, Rasmussen IP* (2007) The rhythm aftereffect: Support for time sensitive neurons with broad overlapping tuning curves. *Brain and Cognition* 64: 274–281.
<https://doi.org/10.1016/j.bandc.2007.03.009>
34. *Masutomi K, Kashino M* (2013) Frequency-change aftereffect produced by adaptation to real and illusory unidirectional frequency sweeps. *J Acoust Soc Am* 134 (1): EL14–EL18.
35. *Wang N, Oxenham AJ* (2014) Spectral motion contrast as a speech context effect. *J Acoust Soc Am* 136 (3): 1237–1245.
<https://doi.org/10.1121/1.4892771>
36. *Frissen I, Vroomen J, de Gelder B, Bertelson P* (2003) The aftereffects of ventriloquism: are they sound-frequency specific? *Acta Psychol (Amst)* 113 (3): 315–327.
[https://doi.org/10.1016/S0001-6918\(03\)00043-X](https://doi.org/10.1016/S0001-6918(03)00043-X)
37. *Phillips DP, Hall SE* (2005) Psychophysical evidence for adaptation of central auditory processors for interaural differences in time and level. *Hear Res* 202 (1–2): 188–199.
<https://doi.org/10.1016/j.heares.2004.11.001>
38. *Malinina ES* (2014) Perception of approaching and withdrawing sound sources following exposure to broadband noise. The effect of spatial domain. *Zh Evol Biokhim Fiziol* 50 (1): 59–68.
39. *Ehrenstein WH* (1978) Direction-specific acoustical aftereffects. *J Acoust Soc Am* 64 (Suppl. 1): S35.
<https://doi.org/10.1121/1.2004165>
40. *Grantham DW, Wightman FL* (1979) Detectability of a pulsed tone in the presence of a masker with time-varying interaural correlation. *J Acoust Soc Am* 65: 1509–1517.
<https://doi.org/10.1121/1.382915>
41. *Andreeva IG, Malinina ES* (2010) Auditory Motion Aftereffects of Approaching and Withdrawing Sound Sources. *Human Physiol* 36 (3): 290–294.
<https://doi.org/10.1134/S0362119710030060>
42. *Eimas PD, Corbit JD* (1973) Selective adaptation of linguistic feature detectors. *Cogn Psychol* 4: 99–109.
[https://doi.org/10.1016/0010-0285\(73\)90006-6](https://doi.org/10.1016/0010-0285(73)90006-6)
43. *Landahl KL, Blumstein SE* (1982) Acoustic invariance and the perception of place of articulation: a selective adaptation study. *J Acoust Soc Am* 71 (5): 1234–1241.
<https://doi.org/10.1121/1.387772>
44. *Sussman JE* (1993) Auditory processing in children’s speech perception: Results of selective adaptation and discrimination tasks. *J Speech Hear Res* 36 (2): 380–395.
<https://doi.org/10.1044/jshr.3602.380>
45. *Schweinberger SR, Casper C, Hauthal N, Kaufmann JM, Kawahara H, Kloth N, Robertson DMC, Simpson AP, Zäske R* (2008) Auditory Adaptation in Voice Perception. *Curr Biol* 18: 684–688.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.04.015>
46. *Latinus M, Belin P* (2011) Human voice perception. *Curr Biol* 21: R143–R145.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.12.033>

47. Skuk VG, Schweinberger SR (2013) Adaptation Aftereffects in Vocal Emotion Perception Elicited by Expressive Faces and Voices. *PLoS One* 8 (11): e81691. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081691>
48. Bestelmeyer PEG, Mühl C (2021) Individual differences in voice adaptability are specifically linked to voice perception skill. *Cognition* 210 (1): 104582. <https://doi.org/10.1016/j.cognition.2021.104582>
49. Lublinskaya VV, Ross J (1991) Perception of the temporal structure in speech-like sound sequence. *Proc XIIth Int Congress Phon Sci*: 318–321.
50. Darwin CJ, Bethell-Fox CE (1977) Pitch Continuity and Speech Source Attribution. *J Exp Psychol: Human Perception and Performance* 3 (4): 665–672. <https://doi.org/10.1037/0096-1523.3.4.665>
51. Dauer RM (1983) Stress-timing and syllable-timing reanalyzed. *J Phonet* 11: 51–62. [https://doi.org/10.1016/S0095-4470\(19\)30776-4](https://doi.org/10.1016/S0095-4470(19)30776-4)
52. Lidji P, Palmer C, Peretz I, Morningstar M (2011) Listeners feel the beat: entrainment to English and French speech rhythms. *Psychon Bull Rev* 18: 1035–1041. <https://doi.org/10.3758/s13423-011-0163-0>
53. Lehiste I (1977) Isochrony reconsidered. *J Phonet* 5: 253–263. [https://doi.org/10.1016/S0095-4470\(19\)31139-8](https://doi.org/10.1016/S0095-4470(19)31139-8)
54. Lerdahl F (2001) The sounds of poetry viewed as music. *Ann NY Acad Sci* 930: 337–354. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb05743.x>
55. Obermeier C, Menninghaus W, von Koppenfels M, Raettig T, Schmidt-Kassow M, Otterbein S, Kotz SA (2013) Aesthetic and emotional effects of meter and rhyme in poetry. *Front Psychol* 4: 10. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2013.00010>
56. Obermeier C, Kotz SA, Jessen S, Raettig T, Von Koppenfels M, Menninghaus W (2016) Aesthetic appreciation of poetry correlates with ease of processing in event-related potentials. *Cogn Affect Behav Neurosci* 16: 362–373. <https://doi.org/10.3758/s13415-015-0396-x>
57. Cummins F (2009) Rhythmas entrainment: the case of synchronous speech. *J Phonet* 37: 16–28. <https://doi.org/10.1016/j.wocn.2008.08.003>
58. Grahn JA (2009) The role of the basal ganglia in beat perception: neuroimaging and neuropsychological investigations. *Ann NY Acad Sci* 1169: 35–45. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04553.x>
59. Nozaradan S, Schwartze M, Obermeier C, Kotz SA (2017) Specific contributions of basal ganglia and cerebellum to the neural tracking of rhythm. *Cortex* 95: 156–168. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2017.08.015>
60. Bóna J (2016) Characteristics of pausing in normal, fast and cluttered speech. *Clin Linguist Phon* 30 (11): 888–898. <https://doi.org/10.1080/02699206.2016.1188421>
61. Kawahara H, Matsui H (2003) Auditory morphing based on an elastic perceptual distance metric in an interference-free time-frequency representation. *Proc 2003 IEEE Int Confer Acoustics, Speech, and Signal Processing (Piscataway, NJ: IEEE)*: 256–259. <https://doi.org/10.1109/ICASSP.2003.1198766>
62. Belin P, Zatorre RJ (2003) Adaptation to speaker's voice in right anterior temporal lobe. *Neuroreport* 14: 2105–2109. <https://doi.org/10.1097/01.wnr.0000091689.94870.85>
63. Lattner S, Meyer ME, Friederici AD (2005) Voice perception: Sex, pitch, and the right hemisphere. *Hum Brain Mapp* 24: 11–20. <https://doi.org/10.1002/hbm.20065>
64. Zäske R, Schweinberger SR, Kaufmann JM, Kawahara H (2009) In the ear of the beholder: neural correlates of adaptation to voice gender. *Eur J Neurosci* 30: 527–534. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06839.x>
65. Zäske R, Schweinberger SR (2011) You are only as old as you sound: Auditory aftereffects in vocal age perception. *Hear Res* 282: 283–288. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2011.06.008>
66. Banse R, Scherer KR (1996) Acoustic profiles in vocal emotion expression. *J Pers Soc Psychol* 70: 614–636. <https://doi.org/10.1037/0022-3514.70.3.614>
67. Montepare J, Koff E, Zaitchik D, Albert M (1999) The use of body movements and gestures as cues to emotions in younger and older adults. *J Nonverbal Behav* 23: 133–152. <https://doi.org/10.1021/1435526134>
68. Dael N, Mortillaro M, Scherer KR (2012) Emotion expression in body action and posture. *Emotion* 12: 1085–1101. <https://doi.org/10.1037/a0025737>
69. Grandjean D (2020) Brain networks of emotional prosody processing. *Emot Rev* 13(1): 34–43. <https://doi.org/10.1177/1754073919898522>
70. Bestelmeyer PE, Rouger J, DeBruine LM, Belin P (2010) Auditory adaptation in vocal affect perception. *Cognition* 117: 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.cognition.2010.08.008>
71. Zäske R, Schweinberger SR, Kawahara H (2010) Voice aftereffects of adaptation to speaker identity. *Hear Res* 268: 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2010.04.011>
72. Nussbaum C, von Eiff CI, Skuk VG, Schweinberger SR (2022) Vocal emotion adaptation aftereffects within and across speaker genders: Roles of timbre and fundamental frequency. *Cognition* 219 (7): 104967. <https://doi.org/10.1016/j.cognition.2021.104967>
73. Latinus M, Belin P (2011) Anti-voice adaptation suggests prototype-based coding of voice identity. *Front Psychol* 2: Article 175. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2011.00175>
74. Andics A, McQueen JM, Petersson KM, Gal V, Rudas G, Vidnyanszky Z (2010) Neural mechanisms for voice recognition. *Neuroimage* 52 (4): 1528–1540. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.05.048>
75. Baumann O, Belin P (2010) Perceptual scaling of voice identity: common dimensions for different vowels and speakers. *Psychol Res* 74: 110–120. <https://doi.org/10.1007/s00426-008-0185-z>
76. Kuhl PK (2004) Early language acquisition: cracking the speech code. *Nat Rev Neurosci* 5: 831–843. <https://doi.org/10.1038/nrn1533>
77. Kuhl PK, Stevens E, Hayashi A, Deguchi T, Kiritani S, Iverson P (2006) Infants show a facilitation effect for native language phonetic perception between 6 and 12

- months. *Development Sci* 9: F13–F21.
<https://doi.org/10.1111/j.1467-7687.2006.00468.x>
78. *Zhao TC, Kuhl P* (2016) Effects of enriched auditory experience on infants' speech perception during the first year of life. *Prospects* 46: 235–247.
<https://doi.org/10.1007/s11125-017-9397-6>
 79. *Bates E, Thal D, Finlay BL, Clancy B* (2002) Early language development and its neural correlates. In: F Boller, J Grafman (Series eds), SJ Segalowitz, I Rapin (Vol eds) *Handbook of Neuropsychol.* Amsterdam. 8 (Part II): 109–176.
 80. *DeCasper AJ, Fife WP* (1980) Of human bonding: newborns prefer their mothers' voice. *Science* 208: 1174–1176.
<https://doi.org/10.1126/science.7375928>
 81. *Minagawa-Kawai Y, Mori K, Naoi N, Kojima S* (2006) Neural Attunement Processes in Infants during the Acquisition of a Language-Specific Phonemic Contrast. *J Neurosci* 27 (2): 315–321.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1984-06.2007>
 82. *Kuhl PK, Conboy BT, Coffey-Corina S, Padden D, Rivera-Gaxiola M, Nelson T* (2008) Phonetic learning as a pathway to language: New data and native language magnet theory expanded (NLM-e). *Philosoph Transact Royal Society Biol Sci* 363 (1493): 979–1000.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2154>
 83. *Conboy BT, Kuhl PK* (2011) Impact of second-language experience in infancy: Brain measures of first- and second-language speech perception. *Development Sci* 14 (2): 242–248.
<https://doi.org/10.1111/j.1467-7687.2010.00973.x>
 84. *Crystal D* (2005) *The Cambridge Encyclopedia of Language.* Cambridge. CUP.
 85. *Webb A, Heller H, Benson C, Lahar A* (2015) Mother's voice and heartbeat sounds elicit auditory plasticity in the human brain before full gestation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 3152–3157.
<https://doi.org/10.1073/pnas.14149241>
 86. *DeCasper AJ, Spence MJ* (1986). Prenatal maternal speech influences newborns' perception of speech sounds. *Infant Behav Development* 9 (2): 133–150.
<https://doi.org/10.1126/science.737592>
 87. *Lam-Cassettari C, Peter V, Antonioua M* (2021) Babies detect when the timing is right: Evidence from event-related potentials to a contingent mother-infant conversation. *Dev Cogn Neurosci* 48: 100923.
<https://doi.org/10.1016/j.dcn.2021.100923>
 88. *Doheny L, Hurwitz S, Insoft R, Ringer S, Lahav A* (2012) Exposure to biological maternal sounds improves cardio-respiratory regulation in extremely preterm infants. *J Matern Fetal Neonatal Med* 25 (9): 1591–1594.
<https://doi.org/10.3109/14767058.2011.648237>
 89. *Randa K, Lahava A* (2014) Maternal sounds elicit lower heart rate in preterm newborns in the first month of life. *Early Hum Devel* 90 (10): 679–683.
<https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2014.07.016>
 90. *Chirico G, Cabano R, Villa G, Bigogno A, Ardesi M, Dioni E* (2017) Randomised study showed that recorded maternal voices reduced pain in preterm infants undergoing heel lance procedures in a neonatal intensive care unit. *Acta Paediatr* 106 (10): 1564–1568.
<https://doi.org/10.1111/apa.13944>
 91. *Best K, Bogossian F, New K* (2018) Language Exposure of Preterm Infants in the Neonatal Unit: A Systematic Review. *Neonatology* 114: 261–276.
<https://doi.org/10.1159/000489600>
 92. *Efendi D, Caswini N, Rustina Y, Iskandar ADP* (2018) Combination of Mother Therapeutic Touch (MTT) and Maternal Voice Stimulus (MVS) therapies stabilize sleep and physiological function in preterm infants receiving minor invasive procedures. *J Neonat Nursing* 24 (6): 318–324.
<https://doi.org/10.1016/j.jnn.2018.08.001>
 93. *Evans MK, Deliyski DD* (2007) Acoustic voice analysis of prelingually deaf adults before and after cochlear implantation. *J Voice* 21: 669–682.
<https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2006.07.005>
 94. *Ogorodnikova EA, Koroleva IV, Lublinskaja VV, Pak SP, Stoljarova EI, Baljakova AA* (2009) Computer in rehabilitation of patients with cochlear implants. Proc 13-th Int Confer "Speech and Computer–SPECOM'2009". Spb. SPIIRAS: 483–486.
 95. *Королева ИВ, Огородникова ЕА, Пак СП, Левин СВ, Бальякова АА, Шапорова АВ* (2013) Методические подходы к оценке динамики развития процессов слухоречевого восприятия у детей с кохлеарными имплантами. *Рос оториноларингол* 3: 75–85 [*Koroleva IV, Ogorodnikova EA, Pak SP, Levin SV, Balyakova AA, Shaporova AV* (2013) Methodological approaches to assessment of the progress of auditory and speech perception in children with cochlear implants. *Russ Otorinolaringol* 3: 75–85. (In Russ)].
 96. *Beier LO, Pedroso F, Costa-Ferreira MID* (2015) Auditory training benefits to the hearing aids users– a systematic review. *Rev CEFAC* 17 (4): 1327–1332.
<https://doi.org/10.1590/1982-0216201517422614>
 97. *Dettman SJ, Dowell R, Choo D, Arnott W, Abrahams Y, Davis A, Dornan D, Leigh J, Constantinescu G, Cowan R, Briggs RJ* (2016) Long-term communication outcomes for children receiving cochlear implants younger than 12 months: a multicenter study. *Otol Neurotol* 37: e82–e95.
<https://doi.org/10.1097/MAO.0000000000000915>
 98. *Hall ML, Hall WC, Caselli NK* (2019) Deaf children need language, not (Just) speech. *First Language* 39 (4): 367–395.
<https://doi.org/10.1177/0142723719834102>
 99. *Wie OB, Torkildsen JK, Schaubert S, Busch T, Litovsky R* (2020) Long-Term Language Development in Children With Early Simultaneous Bilateral Cochlear Implants. *Ear and Hearing* 41 (5): 1294–1305.
<https://doi.org/10.1097/AUD.0000000000000851>
 100. *Higgins MB, McCleary EA, Carney AE, Schulte L* (2003) Longitudinal changes in children's speech and voice physiology after cochlear implantation. *Ear Hear* 24 (1): 48–70.
<https://doi.org/10.1097/01.AUD.0000051846.71105.AF>
 101. *Miller JD, Watson CS, Dubno JR, Leek MR* (2015) Evaluation of Speech-Perception Training for Hearing Aid Users: A Multisite Study in Progress. *Semin Hear* 36 (4):

- 273–283.
<https://doi.org/10.1055/s-0035-1564453>
102. *Beyea JA, McMullen KP, Harris MS, Houston DM, Martin JM, Bolster VA, Adunka OF, Moberly AC* (2016) Cochlear Implants in Adults: Effects of Age and Duration of Deafness on Speech Recognition. *Otology & Neurotology* 37 (9): 1238–1245.
<https://doi.org/10.1097/MAO.0000000000001162>
 103. *Koroleva IV, Ogorodnikova EA* (2019) Modern achievements in cochlear and brainstem auditory implantation. In: *Shelepin Yu, Ogorodnikova E, Solovyev N, Yakimova E* (eds.) *Neural Networks and Neurotechnologies*. SPb. VVM. Chapt 30: 231–249.
 104. *Kovacic D, Balaban E* (2009) Voice gender perception by cochlear implantees. *J Acoust Soc Am* 126 (2): 762–775.
<https://doi.org/10.1121/1.3158855>
 105. *Horga D, Liker M* (2006) Voice and pronunciation of cochlear implant speakers. *Clini. Linguistics & Phonetics* 20 (2–3): 211–217.
<https://doi.org/10.1080/02699200400027015>
 106. *Vongpaisal T, Trehub S, Schellenberg EG, Lieshout P* (2010) Children With Cochlear Implants Recognize Their Mother's Voice. *Ear and Hearing* 31 (4): 555–566.
<https://doi.org/10.1097/AUD.0b013e3181daae5a>
 107. *Coelho AC, Brasolotto AG, Bevilacqua MC, Moret ALM, Bahmad JF* (2016) Hearing performance and voice acoustics of cochlear implanted children. *Braz J Otorhinolaryngol* 82: 70–75.
<https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2015.11.002>
 108. *Elman JL* (1979) Perceptual origins of the phoneme boundary effect and selective adaptation to speech: A signal detection theory analysis. *J Acoust Soc Am* 65: 190–207.
<https://doi.org/10.1121/1.382235>
 109. *Cooper WE* (1974) Adaptation of phonetic feature analyzers for place of articulation. *J Acoust Soc Am* 56: 617.
<https://doi.org/10.1121/1.1903300>
 110. *Sawusch JR, Jusczyk P* (1981) Adaptation and contrast in the perception of voicing. *J Exp Psychol Hum Percept Perform* 7 (2): 408–421.
<https://doi.org/10.1037/0096-1523.7.2.408>
 111. *Sussman JE, Carney AE* (1989) Effects of Transition Length on the Perception of Stop Consonants by Children and Adults. *J Speech, Language, and Hearing Res* 32 (1): 151–160.
<https://doi.org/10.1044/jshr.3201.151>
 112. *Samuel AG, Newport EL* (1979) Adaptation of speech by nonspeech: evidence for complex acoustic cue detectors. *J Exp Psychol: Hum Percept Perform* 5 (3): 563–578.
<https://doi.org/10.1037/h0078136>
 113. *Lieberman AM, Cooper FS, Shankweiler DP, Studdert-Kennedy M* (1967) Perception of the Speech Code. *Psychol Rev* 74: 431–461. <https://doi.org/https://doi.org/10.1037/h0020279>
 114. *McClelland J, Elman J* (1986) The TRACE Model of Speech Perception. *Cognit Psychol* 18: 1–86.
[https://doi.org/10.1016/0010-0285\(86\)90015-0](https://doi.org/10.1016/0010-0285(86)90015-0)
 115. *Goldstone L* (1994) Influences of categorization on perceptual discrimination. *J Exp Psychol* 123: 178–200.
<https://doi.org/10.1037/0096-3445.123.2.178>
 116. *Hickok G, Poeppel D* (2007) The cortical organization of speech processing. *Nat Rev Neurosci* 8 (5): 393–402.
<https://doi.org/10.1038/nrn2113>
 117. *Heald SLM, Nusbaum HC* (2014) Speech perception as an active cognitive process. *Front Systems Neurosci* 8: 35.
<https://doi.org/10.3389/fnsys.2014.00035>
 118. *Wilder RJ* (2018) Investigating Hybrid Models Of Speech Perception. *Publ Accessible Penn Dissertat*: 3202.
<https://repository.upenn.edu/edissertations/3202>
 119. *Ding N, Simon JZ* (2013) Adaptive temporal encoding leads to a background insensitive cortical representation of speech. *J Neurosci* 33: 5728–5735.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5297-12.2013>
 120. *Kell AJ, McDermott J* (2017) Robustness to real-world background noise increases between primary and non-primary human auditory cortex. *J Acoust Soc Am* 141: 3896.
<https://doi.org/10.1121/1.4988749>
 121. *Khalighinejad B, Herrero JL, Mehta AD, Mesgarani N* (2019) Adaptation of the human auditory cortex to changing background noise. *J Nature Communicat* 10: 2509.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-10611-4>
 122. *Chait M, Poeppel D, Simon JZ* (2005) Neural response correlates of detection of monaurally and binaurally created pitches in humans. *Cereb Cortex* 16: 835–848.
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhj027>
 123. *Teki S, Grube M, Kumar S, Griffiths TD* (2011) Distinct neural substrates of duration-based and beat-based auditory timing. *J Neurosci* 31: 3805–3812.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5561-10.2011>
 124. *Oxenham AJ* (2001) Forward masking: Adaptation or integration? *J Acoust Soc Am* 109: 732–741.
<https://doi.org/10.1121/1.1336501>
 125. *Jesteadt W, Bacon SP, Lehman JR* (1982) Forward masking as a function of frequency, masker level, and signal delay. *J Acoust Soc Am* 71: 950–962.
<https://doi.org/10.1121/1.387576>
 126. *Malmierca MS, Sanchez-Vives MV, Escera C, Bendixen A* (2014) Neuronal adaptation, novelty detection and regularity encoding in audition. *Front Syst Neurosci* 8.
<https://doi.org/10.3389/fnsys.2014.00111>
 127. *Sumner CJ, Palmer AR* (2012) Auditory nerve fibre responses in the ferret. *Eur J Neurosci* 36(4): 2428–2439.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08151.x>
 128. *Blank H, Anwander A, von Kriegstein K* (2011) Direct structural connections between voice- and face-recognition areas. *J Neurosci* 31 (36): 12906–12915.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2091-11.2011>
 129. *Von Kriegstein K, Giraud AL* (2006) Implicit multisensory associations influence voice recognition. *PLoS Biology* 4 (10): e326.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040326>

Auditory Adaptation to Speech Signal Characteristics

I. G. Andreeva^{a,#}, and E. A. Ogorodnikova^{a,b}

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

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

[#]*e-mail: ig-andreeva@mail.ru*

The review presents experimental data on auditory adaptation to specific speech parameters – temporal (tempo-rhythmic) and spectral characteristics of the speech signal, including the fundamental frequency, vowel formants, timbre features. The aftereffects of the non-linguistic characteristics of the voice – the gender and age of the speaker, his/her emotional state – are considered. It is shown how adaptation is involved in the separation of competing speech flows and in the mechanisms of auditory attention. The role of auditory adaptation in the development of speech processing and the occurrence of voice prototypes during ontogenesis are discussed. The main models of speech processing and experimental data on phonemic analysis are presented. The results of experimental and model studies indicate that adaptive processes play an important role in enhancing the signal-background contrast and improve signal identification. It is important to consider the auditory adaptation to specific speech parameters when developing rehabilitation procedures for patients with hearing aids and designing technical speech recognition systems.

Keywords: speech perception, auditory adaptation, speech signal, extralinguistic characteristics, the cocktail-party effect, auditory attention

ВОЗДЕЙСТВИЕ СИСТЕМНОЙ ГИПОТЕРМИИ НА РЕАКЦИИ ПИАЛЬНЫХ АРТЕРИЙ ПРИ ОСТРОЙ МАССИВНОЙ КРОВОПОТЕРЕ У НАРКОТИЗИРОВАННЫХ КРЫС ЛИНИИ WISTAR

© 2022 г. Н. Н. Мельникова^{1,*}

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

*e-mail: melnikovann@infran.ru

Поступила в редакцию 14.04.2022 г.

После доработки 20.05.2022 г.

Принята к публикации 16.06.2022 г.

Изучалось влияние снижения температуры тела на реакции церебральных артерий наркотизированных (уретан, 1000 мг/кг) самцов крыс линии Wistar в условиях гемодинамической стабильности и после предварительно вызванной острой массивной кровопотери. С использованием метода прижизненной микроскопии оценивали изменения диаметра пиальных артерий (исходный диаметр 10–40 мкм) в 4-экспериментальных группах – в отсутствие и на фоне предварительно вызванной кровопотери (35% объема циркулирующей крови) при комнатной температуре 22–23°C и при постепенно развивающейся иммерсионной гипотермии в воде с температурой 12–13°C до гипотермической остановки дыхания животных.

В группах с кровопотерей остановка дыхания у крыс при комнатной температуре происходила в среднем через 3 ч при снижении температуры тела до $32.4 \pm 0.5^\circ\text{C}$; при иммерсионном охлаждении – через 2.5 ч при $15.1 \pm 0.8^\circ\text{C}$. В группах животных без кровопотери остановки дыхания при комнатной температуре не происходило более, чем за 3.5 ч наблюдений, однако ректальная температура снижалась до $34.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$; при иммерсионном охлаждении остановка дыхания наблюдалась через 3 ч охлаждения крысы при $13.1 \pm 0.3^\circ\text{C}$.

В процессе снижения температуры тела у крыс всех экспериментальных групп происходит вазоконстрикция. В группах с кровопотерей непосредственно после забора крови уменьшение диаметра пиальных сосудов составляло 10–15% от нормы, а при последующем охлаждении в воде – более 30% от нормы. У крыс без кровопотери при охлаждении в воде сужение пиальных артерий было значительно меньше.

Проведенная экспериментальная работа показала, что системная гипотермия усугубляет микроциркуляторную дисфункцию, вызванную острой массивной кровопотерей, и можно говорить об аддитивном влиянии гипотермии и геморрагии на вазоконстрикторные реакции пиальных артерий у крыс.

Ключевые слова: иммерсионная гипотермия, острая кровопотеря, пиальная артерия, крыса, ректальная температура, вазоконстрикция, прижизненная микроскопия

DOI: 10.31857/S0044452922050084

Массивная кровопотеря ведет к прогрессирующему ухудшению состояния организма от регионарной гипоперфузии до тяжелой гипоксии с необратимыми повреждениями тканей и смертельным исходом. В большинстве случаев чрезмерное кровотечение сопряжено со снижением температуры тела [1, 2], причем роль гипотермии неоднозначна. Хотя самопроизвольное снижение температуры тела при травмах коррелирует с увеличением процента летальности, однако в ряде экспериментальных исследований [3, 4] было показано, что применение гипотермии является действенной стратегией сохранения тканей и улучшения выживаемости организма. В настоящее время

все еще актуальным является вопрос о положительном или отрицательном влиянии снижения температуры тела на состояние церебральной микроциркуляции при массивной кровопотере.

Бесспорно, что индуцированная терапевтическая гипотермия и самопроизвольная (аксидентальная) гипотермия в условиях геморрагии – два очень разных физиологических состояния. Индуцированное гипотермическое воздействие на организм активно используется в клинической практике при операциях на сердце, для лечения пациентов с гипоксическими, ишемическими повреждениями после черепно-мозговых травм, инсультов, при неонатальной энцефалопатии и повреждениях спинного

мозга [5–7]. При плановом хирургическом вмешательстве индукция гипотермии контролируемым образом может защитить ткани от ишемического поражения, снижая метаболическую потребность и потребность тканей в кислороде и ослабляя воспалительный и иммунный ответ. Напротив, пациенты с тяжелыми травмами, осложненными гипотермией, гемодинамически нестабильны. Было показано [8, 9], что снижение температуры тела ниже 35°C у пациентов с травматическими кровотечениями (политравмой) при поступлении в клинику является фактором, предрасполагающим к более тяжелым осложнениям и повышенной смертности. Политравма характеризуется звеньями патогенеза, получившими название “триада смерти”: переохлаждение, ацидоз и коагулопатия, и представляет собой сложный порочный круг, который наблюдается у пациентов с тяжелой травмой и геморрагическим шоком [6, 10, 11].

Компенсаторные механизмы, задействованные для поддержания перфузионного давления и кровотока к жизненно важным органам при острой кровопотере, обуславливают увеличение частоты сердечных сокращений и системную вазоконстрикцию [12]. Низкие температуры окружающей среды могут повлиять на способность сердечно-сосудистой системы организма адекватно реагировать на гиповолемию, в результате толерантность к геморрагии может быть усилена или ослаблена.

В значительной части экспериментальных работ с моделированием геморрагического шока показано повышение выживаемости животных при умеренной гипотермии, вероятно, за счет снижения потребности организма в кислороде [13–15]. Было показано [4], что, хотя геморрагия вызывает серьезные нарушения микроциркуляции в сублингвальной области, в ворсинках кишечника и в коре почек овец, но последующее снижение ректальной температуры до 33–34°C улучшает микроциркуляторное кровоснабжение этих областей. Другое исследование [16] выявило, что локальная гипотермия не оказывает неблагоприятного воздействия на собак во время геморрагии (–20% объема крови) и улучшает перфузию микрососудов желудка и полости рта и их оксигенацию.

Поскольку отсутствуют данные, посвященные влиянию системной гипотермии на церебральную гемодинамику при тяжелом геморрагическом шоке, была проведена данная экспериментальная работа. Целью исследования было проанализировать влияние прогрессирующей гипотермии на микрососудистое русло коры головного мозга крыс в условиях гемодинамической стабильности и при острой массивной кровопотере.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты были проведены на наркотизированных (уретан, в/б, 1000 мг/кг) крысах-самцах линии Wistar массой 300–320 г. Исследование проводили на животных из биокolleкции “Colleкция лабораторных млекопитающих разной таксономической принадлежности” Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Все процедуры, выполненные в данном исследовании, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН (Протокол № 05/10 от 10.05.2021 г.).

Животные подвергались следующим операционным процедурам: для исследования пиальных микрососудов мозга делали трепанационное отверстие в теменных костях размером 7 × 5 мм, в его пределах удаляли твердую мозговую оболочку. В левую бедренную артерию вставляли катетер для прямого измерения артериального давления, а в правую бедренную артерию – для отбора крови. Во время операций у крыс поддерживалась ректальная температура (Tr) 37–38°C с помощью грелки.

При проведении эксперимента животных случайным образом распределяли на 4 группы: первая ($n = 7$) – контрольная, в которой животные после операции находились при комнатной температуре порядка 22.5°C; вторая ($n = 10$) – с предварительным забором крови при комнатной температуре порядка 22.5°C; третья ($n = 6$) – охлаждение животных в условиях гемодинамической стабильности в воде с температурой 12–13°C, и четвертая ($n = 11$) – охлаждение животных с предварительно вызванной кровопотерей (особенности забора крови изложены ниже) в воде с температурой 12–13°C. После окончания экспериментов при комнатной температуре (1-я группа) животных усыпляли передозировкой раствора уретана.

Крысы 3-й и 4-й групп подвергались постепенно развивающейся иммерсионной гипотермии до гипотермической остановки дыхания. За момент остановки дыхания принимали полное отсутствие дыхательных движений в течение 1 мин. Во время охлаждения животных фиксировали в специальном станке (зубные, ушные держатели, мягкая фиксация конечностей) в неглубокой ванне так, чтобы туловище было погружено в воду, а голова находилась над водой. У животных 2-й и 4-й групп производили отбор артериальной крови из расчета 2.1 мл на 100 г веса животного или 35% от объема циркулирующей крови (ОЦК), что приравливается к кровопотере тяжелой степени, т.е. у крысы с весом 300 г общий забор крови составлял 6.3 мл. Время забора крови составляло ~20 мин, средняя скорость забора 0.3 мл/мин, при этом до начала

Таблица 1. Ректальная температура и артериальное давление у крыс на различных этапах эксперимента, $M \pm SE$

Экспериментальные группы	Время эксперимента, мин	Время иммерсии животного, мин	Ректальная температура, °C			Среднее артериальное давление, мм рт.ст.		
			норма	окончание забора крови	окончание эксперимента	норма	окончание забора крови	окончание эксперимента
1 ($n = 7$)	222.6 ± 8.5		37.4 ± 0.1		$34.4 \pm 0.2^{\#}$	97.9 ± 3.9		$71.7 \pm 5.5^{###}$
2 ($n = 10$)	190.6 ± 18.3		37.3 ± 0.1	36.3 ± 0.1	32.4 ± 0.5	99.5 ± 5.2	38.9 ± 3.9	13.8 ± 2.8
3 ($n = 6$)	185.2 ± 2.1	183.3 ± 2.0	36.7 ± 0.1		$13.1 \pm 0.3^*$	99.7 ± 2.5		$28.3 \pm 1.8^{***}$
4 ($n = 11$)	186.6 ± 23.5	160.2 ± 22.1	37.1 ± 0.2	36.7 ± 0.2	15.1 ± 0.8	95.5 ± 5.6	38.7 ± 1.7	18.2 ± 1.4

Примечание: $^{\#} p < 0.05$ $^{###} p < 0.001$ между параметрами 1-й и 2-й групп;

$^* p < 0.05$ $^{***} p < 0.001$ между параметрами 3-й и 4-й групп (U – критерий Манна–Уитни).

микроскопирования среднее артериальное давление (САД) составляло порядка 40 мм рт.ст.

Визуализацию и мониторинг микрососудистого русла пиальной оболочки коры головного мозга осуществляли с помощью установки витальной микроскопии, в состав которой входили микроскоп ЛЮМАМ К-1 (ЛМО, Россия) с контактным темнопольным объективом и цветная видеокамера ACUMEN AiP-B84A (ACUMEN Int. Corp., Тайвань). Полученное изображение обрабатывалось на компьютере пакетом программ Pinnacle Studio. Калибровку измерений производили при помощи стандартного объект-микрометра ОШ-1 (цена деления 10 мкм).

В ходе эксперимента изучали реакции пиальных артериальных сосудов с исходным диаметром от 10 до 40 мкм, большинство артерий имели диаметр порядка 20–25 мкм. Изменения диаметра сосудов фиксировали по мере снижения температуры в ходе эксперимента с шагом 1°C до T_r животного 32°C , а затем в 3-й и 4-й группах с экспериментальным охлаждением с последующим шагом в 2°C , т.е. 30, 28, 26, 24, 22, 20, 18 и при гипотермической остановке дыхания животного. В каждой из серий эксперимента на каждом температурном отрезке делалось по 50–90 измерений на идентичных участках сосудов.

Непрерывно регистрировали частоту сердечных сокращений по ЭКГ, среднее артериальное давление (прямое измерение через катетер от бедренной артерии) и частоту дыхания (угольный датчик). С помощью АЦП Е-154 (L-Card, Россия) аналоговые сигналы оцифровывались и записывались в память компьютера.

При статистической обработке данных использовался пакет программ STATISTICA 6.0, достоверность различий внутри каждой группы оценивали с помощью непараметрического критерия Вилкоксона, для выявления различий между группами использовался непараметрический критерий

Манна–Уитни, уровень достоверности различий $p < 0.05$. Все экспериментальные данные представлены как средняя \pm ошибка средней ($M \pm SE$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Снижение объема циркулирующей крови на 35% и поддержание САД на уровне 40 мм рт.ст. в течение 20 мин и последующее нахождение животных 2-й группы в условиях комнатной температуры $22.3 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$ приводили к остановке дыхания через 190.6 ± 18.3 мин при ректальной температуре $32.4 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ (табл. 1). Скорость охлаждения крыс данной группы составила $0.026 \pm 0.003^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

Крыс 1-й группы без изменения ОЦК мы наблюдали более 220 мин при той же комнатной температуре, после чего эксперимент заканчивался, при этом T_r снижалась с $37.4 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ до $34.4 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$. Снижение T_r до 36°C происходило за 71 ± 8 мин, до 35°C за 138 ± 12 мин от момента регистрации исходных показателей. Общая скорость охлаждения составила $0.014 \pm 0.002^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, что практически в 2 раза медленнее, чем в группе с кровопотерей.

Все животные, подвергшиеся кровопотере, погибали за 3 ч эксперимента, тогда как в группе контроля все таким же образом прооперированные животные оставались живы на протяжении всего периода (более 3.5 ч) наблюдений.

В ходе эксперимента (рис. 1) у крыс 1-й группы по мере снижения T_r до $34.4 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ все измеряемые физиологические показатели равномерно снижались. Так, САД снизилось на 27.2% с 97.9 ± 3.9 мм рт.ст. до 71.3 ± 5.5 мм рт.ст. ($p < 0.05$), ЧСС на 22% с 426.3 ± 9.4 уд/мин до 332.6 ± 20.8 уд/мин ($p < 0.05$), ЧД на 12.2% с 108.0 ± 8.9 мин $^{-1}$ до 94.9 ± 6.8 мин $^{-1}$ ($p < 0.05$). Состояние животных на протяжении эксперимента оставалось довольно стабильным, среднее снижение ректальной температуры за 3.5 ч нахождения прооперированных жи-

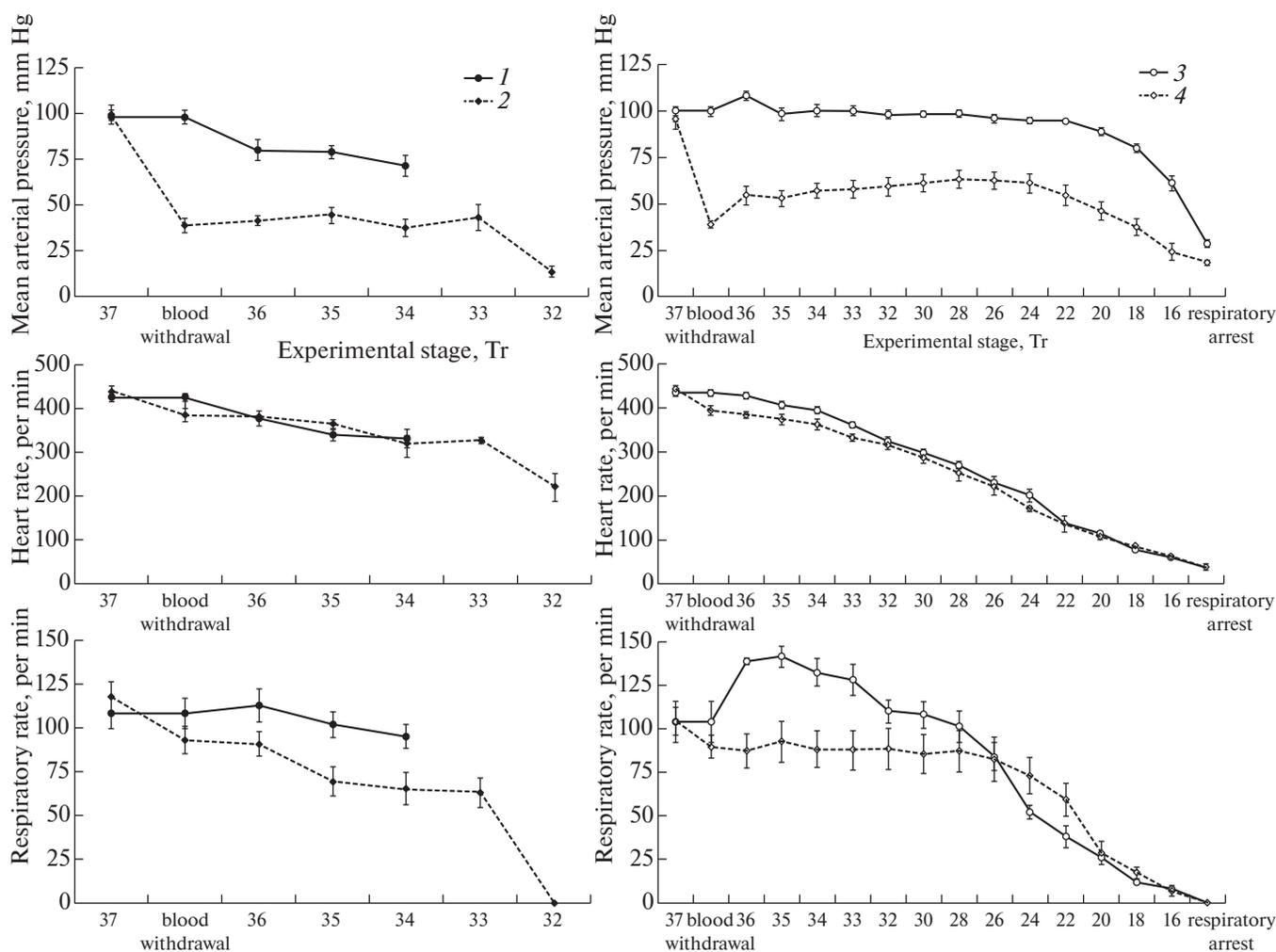


Рис. 1. Среднее артериальное давление, частота сердечных сокращений и частота дыхательных движений у крыс при нормо- и гипотермии.

Обозначения: 1 – без охлаждения; 2 – предварительный забор крови при комнатной температуре; 3 – иммерсионная гипотермия; 4 – иммерсионная гипотермия с предварительной кровопотерей.

вотных при комнатной температуре составляло порядка 3 градусов.

У крыс 2-й группы экспериментальная кровопотеря приводила к снижению САД до ~ 40 мм рт.ст., и в дальнейшем при понижении температуры до спонтанной остановки дыхания животного при $Tr\ 32.4 \pm 0.5^\circ C$ САД не менялось, находясь в пределах от 37.4 ± 4.5 до 44.3 ± 4.5 мм рт.ст. ($p > 0.05$). Показатели как ЧСС, так и ЧД снизились после забора крови. Так, ЧСС снизилась на 12% от 439.2 ± 13.1 до 385.6 ± 15.4 уд/мин ($p < 0.05$), ЧД – на 21% от 117.6 ± 8.3 до 93.0 ± 7.9 мин $^{-1}$ ($p < 0.05$). Продолжавшееся понижение температуры тела обуславливало дальнейшее уменьшение данных показателей. Остановка дыхания происходила через 190.6 ± 18.3 мин от начала эксперимента при САД 13.8 ± 2.8 мм рт.ст., ЧСС 221.2 ± 32.4 уд/мин.

Использование иммерсионной гипотермии позволило наблюдать изменения в работе сердечно-сосудистой и дыхательной систем во время быстрого охлаждения организма вплоть до гипотермической остановки дыхания. После операционного вмешательства до начала охлаждения Tr у крыс статистически не отличалась и составляла в 3-й группе $36.7 \pm 0.1^\circ C$, в 4-й группе до забора крови $37.1 \pm 0.2^\circ C$, после забора – $36.7 \pm 0.2^\circ C$. Таким образом, охлаждение животных начиналось практически с одинаковых величин Tr . Погружение животных в воду проводило к снижению температуры тела и, в конечном итоге, к гипотермической остановке дыхания. Время охлаждения крыс 3-й группы без изменения ОЦК составляло 183 ± 2 мин, прекращение дыхательных движений регистрировалось при $Tr\ 13.1 \pm 0.3^\circ C$. В 4-й группе время охлаждения составляло 160 ± 22 мин ($p > 0.05$), при этом остановка дыхания происходила

при $15.1 \pm 0.8^\circ\text{C}$ ($p < 0.05$). Средняя скорость иммерсионного охлаждения животных в рассматриваемых двух группах достоверно не отличалась: в 3-й группе — $0.128 \pm 0.01^\circ\text{C}/\text{мин}$, в 4-й группе с предварительным забором крови — $0.158 \pm 0.017^\circ\text{C}/\text{мин}$ ($p > 0.05$).

Охлаждение крыс во время иммерсионной гипотермии (рис. 1) сопровождалось развитием ответной реакции со стороны всех органов и систем. В начале воздействия гипотермии у крыс 3-й группы при нормоволемии наблюдалось небольшое повышение САД, при охлаждении животных ниже 34°C САД оставалось довольно высоким (на уровне нормы), снижаясь лишь после 20°C . ЧД также возрастала на 35% ($p < 0.001$) в начале охлаждения. Затем, по достижении степени умеренной гипотермии, наблюдалось последовательное угнетение функционального состояния организма, и ЧД постепенно снижалась вплоть до остановки дыхания. При температурах в диапазоне $32\text{--}20^\circ\text{C}$ ЧСС уменьшалась в 3 раза, а в момент остановки дыхания составляла 36.7 ± 1.8 уд/мин.

В результате экспериментальной кровопотери САД у крыс снижалось до 40 мм рт.ст., и этот уровень поддерживался до начала иммерсии. После начала охлаждения САД увеличивалось (до $55\text{--}63$ мм рт.ст.) и находилось на таком плато, снижаясь лишь при состоянии глубокой гипотермии. На протяжении всего охлаждения у животных 4-й группы наблюдались брадикардия и постепенное замедление ЧД до гипотермической остановки дыхания.

На рис. 2 показано изменение диаметра пиальных артерий на различных этапах эксперимента. За 100% принимали диаметр пиальных артерий в начале периода наблюдений. Изменение диаметра сосудов у контрольных крыс (1-я группа) было незначительно. При $T_r 36^\circ\text{C}$ диаметр уменьшился на 4.2% ($p > 0.05$), при $T_r 35^\circ\text{C}$ — на 3.6% ($p > 0.05$) от исходного. В конце опыта при $T_r 34.4^\circ\text{C}$ диаметр был близок к исходному и составлял $98.9 \pm 3.0\%$ ($p > 0.05$). Кровопотеря 35% от ОЦК у крыс 2-й группы приводила к сужению пиальных артерий на 10.1% ($p < 0.001$). Однако при дальнейшем нахождении на воздухе и спонтанном охлаждении животного диаметр сосудов изменялся статистически незначимо, вероятно, за счет разнонаправленных изменений диаметра сосудов: сужение показано лишь для 50–60% от общего количества измерений в данной серии в диапазоне температур от 36 до 33°C , расширение — для 21–40%, часть сосудов диаметра не меняла. К моменту остановки дыхания при $T_r 32.4^\circ\text{C}$ происходит наиболее значимая вазоконстрикция до уровня $85.9 \pm 2.9\%$ ($p < 0.001$) относительно исходной величины.

На протяжении всего периода охлаждения животных в воде мы наблюдали (рис. 2, б) статистически значимые различия ($p < 0.001$) в изменении диаметра пиальных сосудов у крыс с кровопотерей

(4-я группа) и без нее (3-я группа). В обеих группах от начала погружения животного в воду до достижения T_r отметки в 36°C проходило порядка 4–5 мин. За это время диаметр сосудов в 3-й группе существенно увеличивался (на $16.5 \pm 4.8\%$, $p < 0.001$), тогда как в 4-й группе после забора крови наблюдалась вазоконстрикция. Диаметр артерий в 4-й группе после забора крови составил $86.9 \pm 3.1\%$ от нормы, а после начала охлаждения — $81.0 \pm 2.8\%$.

Было обнаружено, что в 3-й группе после первоначальной вазодилатации наблюдалась последующая вазоконстрикция уже при температуре 35°C . На участке снижения температуры от 30 до 20°C диаметр сосудов достоверно не изменялся и составлял от 80 до 85% от нормы. В том же интервале температур в группе с предварительной кровопотерей диаметр артериол составлял от 71 до 65% от нормы. Остановка дыхания характеризуется расширением сосудов, практически сопоставимым с состоянием сосудов в начале охлаждения как для 3-й, так и для 4-й группы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При кровопотере из кровеносного русла по причине различного рода повреждений происходит утрата значительного количества крови, в результате которой развивается сложный комплекс приспособительных и патологических реакций организма. Показано, что биологический ответ на кровотечение в условиях нормотермии представляет собой сочетание сердечно-сосудистой компенсации и активации механизмов апоптоза клеток в жизненно важных органах, особенно в головном мозге [1, 7, 17]. Значительная кровопотеря снижает доставку кислорода, в то время как его поглощение остается довольно постоянным. В целом гипоксический стимул ведет к истощению запасов внутриклеточного АТФ (аденозинтрифосфата), что приводит к клеточной дисфункции и органной декомпенсации. Нарушения в системе микроциркуляции при стрессорном воздействии сопровождаются сужением сосудов за счет значительного повышения уровня катехоламинов в крови [18]. Тем не менее вопросы патогенетического влияния стресса на сердечно-сосудистую систему до конца не изучены.

В данной работе моделировалась острая массивная кровопотеря (~35% ОЦК) на мелких лабораторных животных — крысах линии Wistar, которая приводила к гипоксии, носящей как циркуляторный, так и гемический (анемический) характер. У всех групп животных были проведены анестезия и хирургическое вмешательство по поводу катетеризации бедренной артерии и трепанации черепа. Основной экспериментальной группой была 4-я группа животных с предварительным забором крови и последующим гипотермическим воздействием. Три другие группы, по сути, являлись кон-

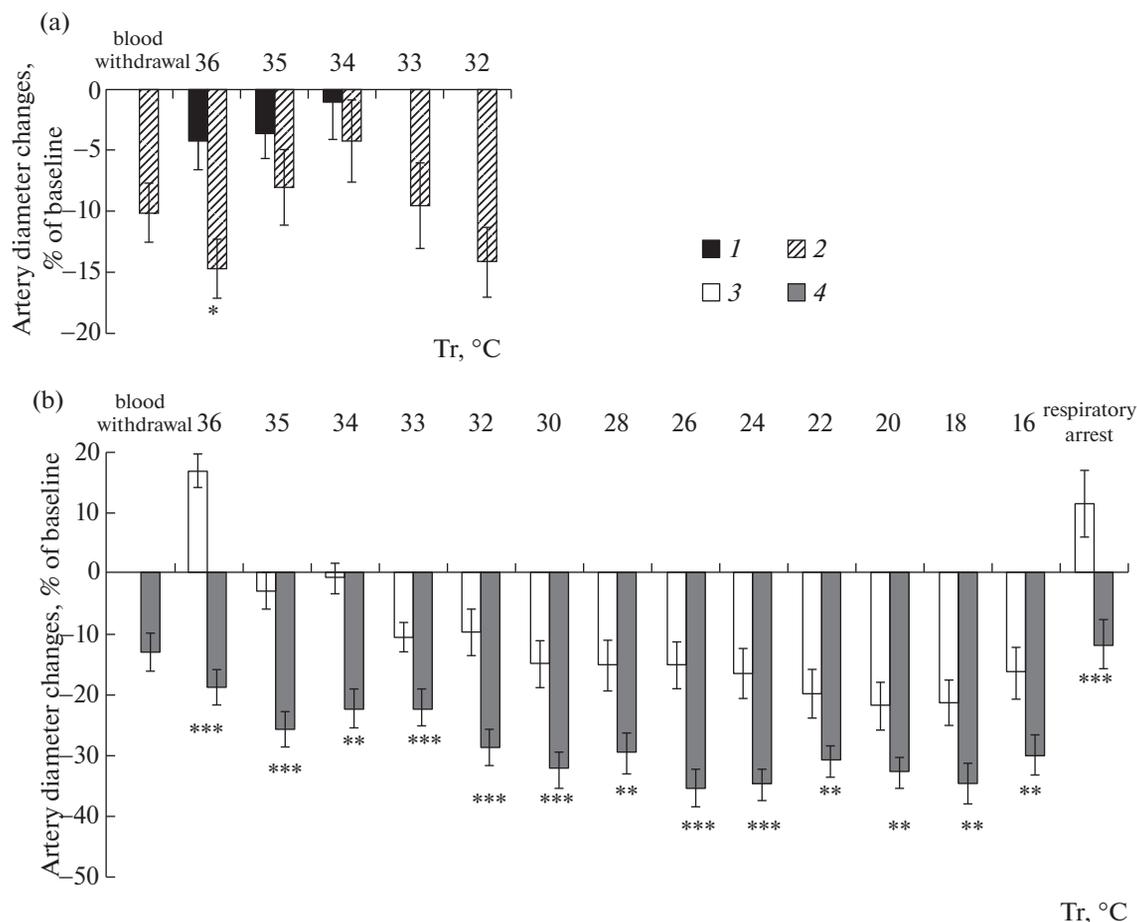


Рис. 2. Динамика изменений диаметров пиальных артерий крыс по отношению к исходному состоянию при соответствующих воздействиях в различных экспериментальных группах.

Обозначения: 1 – без охлаждения; 2 – предварительный забор крови при комнатной температуре; 3 – иммерсионная гипотермия; 4 – иммерсионная гипотермия с предварительной кровопотерей.

* – различия между 1-й и 2-й группой статистически значимы при $p < 0.05$ (U-критерий Манна–Уитни); ** – различия между 3-й и 4-й группой статистически значимы при $p < 0.01$; *** – различия между 3-й и 4-й группой статистически значимы при $p < 0.001$ (U-критерий Манна–Уитни).

трольными: 1-я группа – нормотермия, 2-я – геморрагия при нормотермии, 3-я – гипотермия. В ходе исследования показано снижение температуры у всех групп животных. Закономерно значительное снижение T_r у крыс 3-й и 4-й групп вследствие гипотермического иммерсионного воздействия, но достоверное понижение температуры наблюдалось и у животных 1-й и 2-й групп. Если в 1-й контрольной группе более чем за 3 ч наблюдений T_r достигала $34.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$, то при геморрагии (2-я группа) за сопоставимое время T_r снижалась до $32.4 \pm 0.5^\circ\text{C}$, и происходила остановка дыхания. Вероятно, при данном уровне кровопотери компенсаторные реакции оказались недостаточными, а вызванные ею метаболические, биохимические и enzymатические нарушения [19] привели к развитию полиорганной недостаточности и без восполнения утраченного ОЦК инфузионными растворами – к летальному исходу.

При сравнении температуры тела при остановке дыхания у групп животных с иммерсией было установлено, что воздействие геморрагии повышает температурный порог прекращения дыхания. Так, в 3-й группе остановка дыхания происходила при $T_r 13.1 \pm 0.3^\circ\text{C}$, а в 4-й группе – при $T_r 15.1 \pm 0.8^\circ\text{C}$ ($p < 0.05$). Температурный порог прекращения дыхания у крыс – величина довольно стабильная. Остановка дыхания у половозрелых крыс наступает при T_r в диапазоне $12\text{--}19^\circ\text{C}$ [20], а самопроизвольное восстановление дыхания в условиях глубокой гипотермии возможно лишь в случае извлечения животного из воды и его разогрева.

Важность коррекции температуры тела и поддержания нормотермии подчеркивается в современном протоколе лечения пациентов с политравмой [2, 21]. Однако большинство экспериментальных исследований [3, 10, 22] показали пользу терапевтической гипотермии при геморрагиче-

ском шоке. Доказано, что умеренная гипотермия при температуре 33°C ухудшает коагуляцию, но, тем не менее, продлевает выживаемость крыс после геморрагического шока и реанимации. Гипотермия снижает последствия вторичного повреждения головного мозга за счет ряда механизмов, в том числе снижения эксцитотоксичности, окислительного стресса, апоптоза, аутофагии и воспаления [9, 14, 17]. В работе Wu и соавт. [22] продемонстрировано, что после охлаждения до Тр 34°C в течение 2 ч после геморрагического шока (забор крови 3 мл/100 г животного и последующее поддержание АД 40 мм рт.ст.) и последующих реанимационных мероприятий выживаемость крыс выше по сравнению с таким же охлаждением животных в течение 12 ч. Результаты нашей работы показали, что животные охлаждались до гипотермической остановки дыхания в течение одинакового времени как при кровопотере, так и без нее. Однако уровень Тр при гипотермической остановке дыхания статистически достоверно различался, у крыс с кровопотерей апноэ происходило при более высокой Тр. Следовательно, предположение об усилении толерантности к геморрагии на фоне сильного гипотермического воздействия нашими экспериментами не подтверждается.

Во время охлаждения организма в воде мы наблюдали изменения функционирования организма по клиническим проявлениям сердечно-сосудистой и респираторной систем. В зависимости от температуры тела гомеотермного организма классифицируют следующие степени гипотермии: легкая или мягкая (32–35°C), умеренная (28–32°C), тяжелая (28–20°C) и глубокая (<20°C) [7, 23, 24]. Для легкой степени гипотермии характерны терморегуляторная дрожь, тахикардия, тахипноэ, гипертензия, увеличение сердечного выброса, периферическая вазоконстрикция; для умеренной степени гипотермии – брадикардия, замедление дыхания, возможна мерцательная аритмия; тяжелая и глубокая степени гипотермии приводят к прогрессирующей брадикардии, асистолии, возможной фибрилляции желудочков, снижению системного давления и, в конечном итоге, к остановке дыхания.

В нашей работе у крыс 3-й группы при гипотермии легкой степени наблюдалось небольшое кратковременное повышение САД, вероятно, за счет повышения уровня метаболизма и норадреналиноопосредованной периферической вазоконстрикции [23, 25]. При снижении Тр ниже 32°C, т.е. при умеренной и тяжелой степени гипотермии, САД оставалось на уровне нормы и снижалось при достижении глубокой гипотермии. ЧД также возрастала на 35% ($p < 0.001$) в начале охлаждения. Это типичная реакция функции внешнего дыхания на компенсаторной стадии гипотермии – гипотермии легкой степени, которая характеризуется увеличением легочной вентиляции, частоты и глубины дыхания [25]. Затем по достижении степени умерен-

ной гипотермии наблюдалось последовательное угнетение функционального состояния организма, и ЧД постепенно снижалась вплоть до остановки дыхания.

Сообщалось, что при охлаждении крыс до Тр 31°C ЧСС снижается незначительно, но повышаются значения стандартного отклонения и коэффициента вариации [26]. У крыс 3-й группы было зафиксировано существенное понижение ЧСС уже при температуре 32°C (на 25% от исходного, $p < 0.001$), что объясняется, вероятно, выбранным быстрым режимом охлаждения. При гипотермии тяжелой степени наблюдалась прогрессирующая брадикардия, а в момент остановки дыхания ЧСС составляло 36.7 ± 1.8 уд/мин. Можно отметить, что изменения функциональных показателей, которые фиксировались нами во время охлаждения животных 3-й группы, совпадают с аналогичными результатами, изложенными в литературе.

У крыс 4-й группы в результате экспериментальной кровопотери развивалась тяжелая гипотензия. Начало иммерсии приводило к существенному подъему САД (до 55–63 мм рт.ст.). Показатель давления оставался на таком уровне на протяжении дальнейшего периода охлаждения животных, и, в отличие от гипотермических крыс 3-й группы с кратковременным подъемом САД в начале охлаждения, не снижался до этапа глубокой гипотермии. В связи с этим хотелось бы отметить тот факт, что при умеренной гипотермии показатель артериального давления может не соответствовать реальному объему циркулирующей крови.

Согласно исследованиям Nishi и соавт. [10], легкая гипотермия при геморрагическом шоке подавляла ЧСС и увеличивала АД, что не противоречит полученным нами результатам. В указанной работе предполагалось, что более низкая ЧСС при гипотермии снижает потребность миокарда в кислороде, а более высокое АД может улучшать перфузию тканей, что приводит к уменьшению метаболического ацидоза. Возможно, это обеспечивает дополнительный механизм защиты мозга при гипотермии. В нашем исследовании ЧСС в 4-й группе снижалась на протяжении всего охлаждения и статистически не отличалась по сравнению с 3-й группой, а ЧД снизилась сразу после начала охлаждения, и после достижения Тр 28°C дальнейшее уменьшение ЧД было сопоставимо с показателями в 3-й группе. Таким образом, функциональное состояние животных при гипотермии как при гемодинамической стабильности, так и при острой массивной кровопотере остается одинаково тяжелым в условиях быстрого иммерсионного охлаждения при достижении стадий умеренной и глубокой гипотермии, несмотря на значительную разницу в САД. Статистически достоверные различия между показателями ЧСС и ЧД при иммерсионном охла-

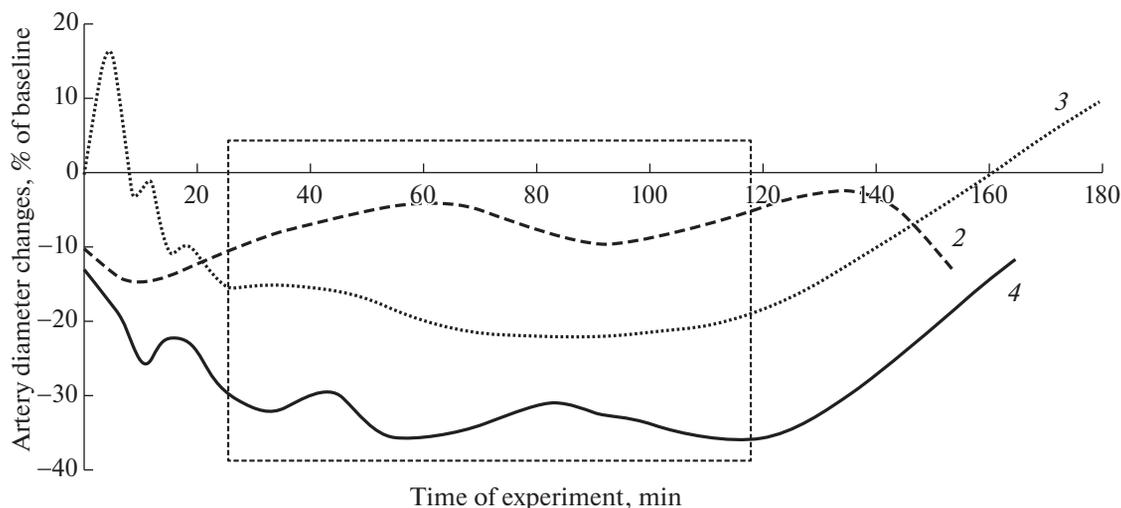


Рис. 3. Изменения диаметров пиальных артерий крыс по отношению к исходному состоянию в различных группах в зависимости от времени эксперимента.

Обозначения: 2 – предварительный забор крови при комнатной температуре; 3 – иммерсионная гипотермия; 4 – иммерсионная гипотермия с предварительной кровопотерей.

ждении животных прослеживаются лишь на этапе легкой гипотермии.

Практически все известные нам экспериментальные работы по изучению микроциркуляции при сочетанном воздействии переохлаждения и кровопотери были выполнены при охлаждении организма не ниже 32°C. В нашем исследовании оценивалось состояние церебральной гемодинамики при системной прогрессирующей гипотермии вплоть до стадии глубокой гипотермии.

Геморрагический шок вызывает серьезные нарушения микроциркуляции. Показано, что после ухудшения гемодинамики последующее охлаждение до Tr 33–34°C приводит к восстановлению микроциркуляторного снабжения изучаемых областей у овец [4], а при локальной гипотермии собак улучшаются перфузия и оксигенация микрососудов желудка и полости рта [16]. Gong и соавт. [11] показали, что легкая гипотермия (33°C) после экспериментальной остановки сердца улучшает церебральное микроциркуляторное кровоснабжение и снижает повышенный коэффициент экстракции кислорода головным мозгом.

В наших экспериментах кровопотеря во 2-й и 4-й группах приводила к сужению пиальных микрососудов на 10% и 13% соответственно (рис. 2). Последующее охлаждение вызывало лишь вазоконстрикторные реакции пиальных сосудов по отношению к исходному состоянию. Тем не менее можно проследить изменение величины сужения сосудов при различных степенях гипотермического воздействия. Так, при Tr 34–33°C наблюдалось снижение вазоконстрикторной реакции, и диаметр пиальных артериол несколько увеличивался по отношению к предыдущему значению.

В контрольной гипотермической группе (3-я группа) начало охлаждения характеризовалось быстрым ответом церебральной гемодинамики: мы наблюдали вазодилатацию сразу после погружения животного в холодную воду, диаметр пиальных артерий увеличивался на $16.5 \pm 4.8\%$ от исходного ($p < 0.01$). Это можно рассматривать как результат быстрых компенсаторных реакций, обусловленных норадреналин-опосредованным периферическим вазоспазмом и централизацией кровотока [18, 26]. Как показано выше, такая вазодилатация сопровождалась периодом кратковременного подъема САД. Дальнейшее охлаждение крыс, соответствующее степени легкой гипотермии, характеризуется сужением пиальных артериол на 5–10% от начального диаметра. На этапах умеренной и тяжелой гипотермии диаметр сосудов оставался на уровне 75–85% от начального. Таким образом, на протяжении всего периода охлаждения у крыс без вызванной кровопотери наблюдалась прогрессирующая вазоконстрикция.

При охлаждении крыс 4-й группы первоначальная, вызванная забором крови вазоконстрикция только усугублялась. В начале охлаждения мы не наблюдали первичного расширения сосудов, аналогичного вазодилатации в контрольной группе гипотермии. Можно проследить тенденцию уменьшения диаметра по мере охлаждения крыс: при гипотермии легкой степени вазоконстрикция составила 20–25%, а при умеренной и тяжелой – 30–35%.

На рис. 3 отображена зависимость величины изменения диаметра пиальных артериол от времени эксперимента.

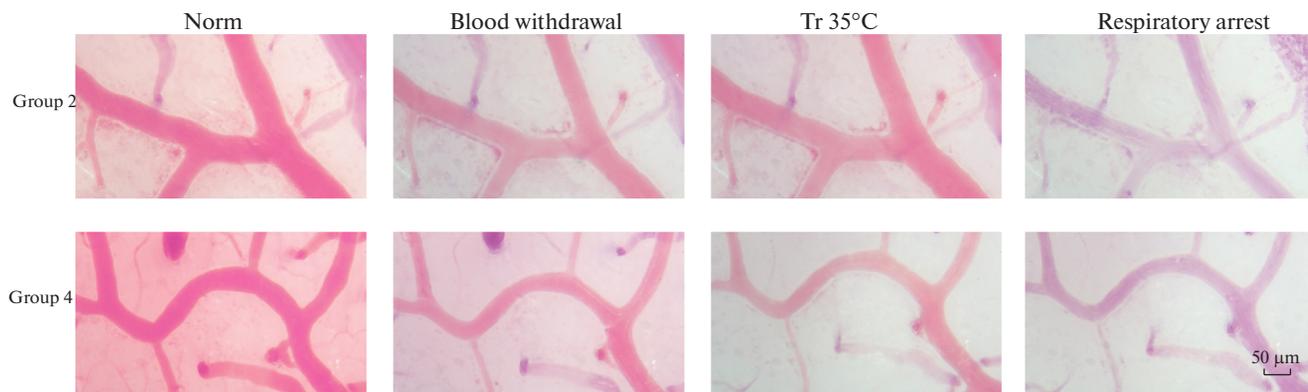


Рис. 4. Реакции пияльных артериальных сосудов на кровопотерю и охлаждение.

Микрофотография пияльных сосудов крыс, подвергшихся предварительно вызванной кровопотерей, на разных этапах эксперимента: до воздействия (norm), после забора крови (blood withdrawal), при Tr 35°C и при остановке дыхания животных (respiratory arrest). Верхние фотографии демонстрируют изменения у крыс 2-й группы, находящихся в условиях комнатной температуры, нижние – у крыс 4-й группы, при последующем иммерсионном охлаждении животных.

На этом рисунке наиболее интересным и информативным является интервал от 30 до 120 мин (выделен прямоугольником). Можно отметить, что изменение диаметра сосудов в 4-й группе (геморрагия + гипотермия) приблизительно равно сумме изменений диаметров артериол 2-й (геморрагия) и 3-й (гипотермия) групп. Вероятно, во время гипотермии животных с массивной кровопотерей происходит наложение причин вазоконстрикции при продолжающейся гипотермии и при кровопотере, и можно говорить об аддитивном действии гипотермии и гиповолемии.

Микрофотография (рис. 4) демонстрирует состояние пияльных микрососудов крыс во 2-й (предварительный забор крови и последующее нахождение животного при комнатной температуре) и 4-й (предварительный забор крови и последующее иммерсионное охлаждение животного) группах эксперимента. В обеих группах выражена вазоконстрикция после забора крови. При спонтанном охлаждении до Tr 35°C диаметр сосудов незначительно увеличивается, однако при остановке дыхания вновь наблюдается вазоконстрикция. При иммерсии в воде вазоконстрикция усугубляется.

Проведенное исследование показало, что в условиях массивной кровопотери (до 35% ОЦК) при комнатной температуре 22–23°C у гомойтермного организма (крыс линии Wistar) в среднем за 3 ч происходит снижение температуры тела до Tr 32–33°C и прекращение дыхательных движений, при иммерсионном охлаждении в воде с температурой 12–13°C остановка дыхания происходит через 2.5 ч при Tr 15–16°C.

Были выявлены значительные изменения жизненно важных показателей организма, таких как ЧСС, САД и ЧД, во время иммерсионного охлаждения вплоть до полной гипотермической остановки дыхания. Предварительно вызванная гемор-

рагия у крыс приводила к повышению температурного порога остановки дыхания. Тем не менее функциональное состояние животного при кровопотере в условиях быстрого иммерсионного охлаждения при достижении стадий умеренной и глубокой гипотермии незначительно отличалось от нормоволемического состояния организма.

В процессе снижения температуры тела у крыс всех экспериментальных групп происходит вазоконстрикция. В группах с кровопотерей непосредственно после забора крови уменьшение диаметра пияльных сосудов составляло 10–15% от нормы, а при последующем охлаждении в воде – более 30% от нормы. Вероятно, дополнительное быстрое иммерсионное охлаждение крыс, в том числе на этапе глубокой гипотермии, не препятствует нарушениям микроциркуляции, вызванным тяжелой кровопотерей.

Таким образом, полученные данные указывают, что системная гипотермия усугубляет микроциркуляторную дисфункцию, вызванную острой массивной кровопотерей, и можно говорить об аддитивном влиянии гипотермии и геморрагии на вазоконстрикторные реакции пияльных артерий у крыс.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Планирование эксперимента, сбор и обработка данных, написание и редактирование статьи выполнены автором лично.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kheirbek T, Kochanek A, Alam H* (2009) Hypothermia in bleeding trauma: a friend or a foe? *Scandinavian J Trauma, Resuscitat Emergen Med* 17: 65. <https://doi.org/10.1186/1757-7241-17-65>
2. *van Veelen M, Maeder B* (2021) Hypothermia in Trauma. *Int J Environ Res Public Health* 18 (16): 8719. <https://doi.org/10.3390/ijerph18168719>
3. *Burggraf M, Lendemans S, Waack I, Teloh J, Effenberger-Neidnicht K, Jäger M, Rohrig R* (2019) Slow as compared to rapid rewarming after mild hypothermia improves survival in experimental shock. *J Surg Res* 236: 300–310. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2018.11.057>
4. *Eguillor J, Ferrara G, Edul V, Buscetti M, Canales H, Lattanzio B, Gatti L, Gutierrez F, Dubin A* (2021) Effect of systemic hypothermia on microcirculation in conditions of hemodynamic stability and in hemorrhagic shock. *Shock* 55 (5): 686–692. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001616>
5. *Jiang S, Zhao Y, Zhao X* (2013) Potential role of therapeutic hypothermia in the salvage of traumatic hemorrhagic shock. *Critical Care* 17: 318. <https://doi.org/10.1186/cc12559>
6. *Шевелев ОА, Петрова МВ, Саидов ШХ, Ходорович НА, Прадхан П* (2019) Механизмы нейропротекции при церебральной гипотермии (обзор). *Общ реаниматол* 15 (6): 94–114. [*Shevelev OA, Petrova MV, Saidov SK, Khodorovich NA, Pradkhan P* (2019) Neuroprotection mechanisms in cerebral Hypothermia (review). *General Reanimatol* 15 (6): 94–114. (In Russ)]. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2019-6-94-114>
7. *Gogol R, Hudziak D, Bis J, Mendrala K, Morkisz Ł, Podsiadło P, Kosiński S, Piątek J, Darocha T* (2021) The role of deep hypothermia in cardiac. *Int J Environ Res Public Health* 18: 7061–7075. <https://doi.org/10.3390/ijerph18137061>
8. *Царев АВ* (2017) Непреднамеренная гипотермия и объем кровопотери у пациентов с политравмой. *Вестн пробл биол мед* 141 (4 ч. 3): 239–242. [*Tsarev AV* (2017) Intraoperative hypothermia and volume of blood loss of patients with politrauma. *Bull Probl Biol Med* 141 (4Pt3): 239–242. (In Russ)]. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2017-4-3-141-239-242>
9. *Rosli D, Schnuriger B, Cadinan D, Haltmeier T* (2020) The impact of accidental hypothermia on mortality in trauma patients overall and patients with traumatic brain injury specifically: a systematic review and meta-analysis. *World J Surg* 44 (12): 4106–4117. <https://doi.org/10.1007/s00268-020-05750-5>
10. *Nishi K, Takasu A, Shinozaki H, Yamamoto K, Sakamoto T* (2015) Hypothermia does not hasten death during uncontrolled hemorrhagic shock presenting as the “triad of death” in rats. *Acute Med Surg* 2 (1): 29–34. <https://doi.org/10.1002/ams2.60>
11. *Gong P, Zhao Sh, Wang J, Yang Z, Qian J, Wu X, Cahoon J, Tang W* (2015) Mild hypothermia preserves cerebral cortex microcirculation after resuscitation in a rat model of cardiac arrest. *Resuscitation* 97: 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2015.10.003>
12. *Crandall C, Rickards C, Johnson B* (2019) Impact of environmental stressors on tolerance to hemorrhage in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 316: R88–R100. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00235.2018>
13. *Shinichiro I, Takasu A, Sakamoto T* (2010) Therapeutic mild hypothermia: effects on coagulopathy and survival in a rat hemorrhagic shock model. *J Trauma* 68 (3): 669–675. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e3181a0fbb3>
14. *George M, Mulier K, Beilman G* (2010) Hypothermia is associated with improved outcomes in a porcine model of hemorrhagic shock. *J Trauma* 68 (3): 662–668. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e3181d3cbbc>
15. *Takasu A, Norio H, Sakamoto T, Okada Y* (2002) Mild hypothermia prolongs the survival time during uncontrolled hemorrhagic shock in rats. *Resuscitation* 54 (3): 303–309. [https://doi.org/10.1016/s0300-9572\(02\)00148-x](https://doi.org/10.1016/s0300-9572(02)00148-x)
16. *Truse R, Smyk M, Schulz J, Herminghaus A, Weber A, Mettler-Altman T, Bauer I, Picker O, Vollmer C* (2019) Regional hypothermia improves gastric microcirculatory oxygenation during hemorrhage in dogs. *PLoS One* 14 (12): e0226146. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226146>
17. *Frink M, Flohé S, van Griensven M, Mommsen P, Hildebrand F* (2012) Facts and fiction: the impact of hypothermia on molecular mechanisms following major challenge. *Mediators Inflamm* 2012: 762840. <https://doi.org/10.1155/2012/762840>
18. *Palmiere C, Bardy D, Letovanec I, Mangin P, Augsburger M, Ventura F, Iglesias K, Werner D* (2013) Biochemical markers of fatal hypothermia. *Forensic Sci Int* 226 (1–3): 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.12.007>
19. *Курсов СВ, Никонов ВВ, Скороплет СН* (2019) Кровопотеря. *Медицина неотложных состояний* 96 (1): 7–21. [*Kursov SV, Nikonov VV, Skoroplit SM* (2019) Blood loss. *Emergency Medicine* 96 (1): 7–21. (In Russ)].
20. *Melnikova N* (2020) Cerebral microcirculation during respiratory arrest in deep experimental rat hypothermia. *J Stress Physiol Biochem* 16 (3): 126–131.
21. *Григорьев ЕВ, Лебединский КМ, Шеголев АВ, Бобовник СВ, Буланов АЮ, Заболотских ИБ, Синьков СВ, Шень НП, Корнелюк РА* (2020) Реанимация и интенсивная терапия при острой массивной кровопотере у взрослых пациентов. *Анестезиол реаниматол* 1: 5–24. [*Grigor'ev EV, Lebedinsky KM, Schegolev AV, Bobovnik SV, Bulanov AY, Zabolotskikh IB, Sinkov SV, Shen NP, Kornelyuk RA* (2020) Resuscitation and intensive care in acute massive blood loss in adults (clinical guidelines). *Russ J Anaesthesiol Reanimatol* 1: 5–24. (In Russ)]. <https://doi.org/10.17116/anaesthesiology20200115>
22. *Wu X, Stezoski J, Safar P, Nozari A, Tisheman S* (2003) After spontaneous hypothermia during hemorrhagic shock, continuing mild hypothermia (34 degrees C) improves early but not late survival in rats. *J Trauma* 55 (2):

- 308–316.
<https://doi.org/10.1097/01.TA.0000079366.23533.1E2>
23. *Алябьев ФВ, Парфирьева АМ, Чесалов НП, Шамарин ЮА, Осипов АИ* (2008) Функционально-морфологические изменения сердца при гипотермии. Сиб мед журн 1 (1): 68–71. [*Alyabyev FV, Parfiryeva AM, Chesalov NP, Shamarin YA, Osipov AI* (2008) Functional-morphologic changes of the heart in hypothermia. Siberian Med J 1 (1): 68–71. (In Russ)].
 24. *Murakami T, Yoshida T, Kurokochi A, Takamatsu K, Teranishi Yu, Shigeta K, Tamaki K, Morita S, Mizuno R, Oya M* (2019) Accidental hypothermia treated by hemodialysis in the acute phase: three case reports and a review of the literature. Intern Med 58 (18): 2743–2748.
<https://doi.org/10.2169/internalmedicine.1945-18>
 25. *Бочаров МИ* (2015) Терморегуляция организма при холодных воздействиях. Сообщение 1 Вестник САФУ сер Мед-биол науки (1): 5–15. [*Bocharov MI* (2015) Thermoregulation in cold environments. Report I Vestnik NAFU ser Med-Biol sci (1): 5–15. (In Russ)].
 26. *Луценко ДГ* (2008) Микрогемоциркуляция головного мозга крыс после гипотермического воздействия. Пробл криобиол 18 (1): 81–84. [*Lutsenko DG* (2008) Rat's brain microhemocirculation after hypothermic effect. Probl Cryobiol 18 (1): 81–84. (In Russ)].

Effect of Systemic Hypothermia on Reactions of the Pial Arteries after Acute Massive Blood Loss in Anesthetized Wistar Rats

N. N. Melnikova

*Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia
 e-mail: melnikovann@infran.ru*

The effect of lowering body temperature on the responses of the cerebral arteries was studied in anesthetized (urethane, 1000 mg/kg) male Wistar rats under conditions of hemodynamic stability and pre-induced acute massive blood loss. Changes in the diameter of the pial arteries (initial diameter 10–40 μm) were evaluated via intravital microscopy in four experimental groups: with and without pre-induced blood loss (35% of the circulating blood volume), and in each, at room temperature (22–23°C) and during gradually developing cold-water immersion hypothermia (12–13°C) until respiratory arrest. In groups with pre-induced blood loss, respiratory arrest occurred at room temperature on average after 3 h of lowering body temperature to $32.4 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and after 2.5 h at $15.1 \pm 0.8^\circ\text{C}$ during immersion cooling. In groups without blood loss, respiratory arrest did not occur at room temperature for more than 3.5 h of observation, although rectal temperature decreased to $34.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$; during immersion cooling, respiratory arrest was observed after 3 h of cooling at $13.1 \pm 0.3^\circ\text{C}$. In the process of lowering body temperature, vasoconstriction occurred in rats of all experimental groups. In groups with blood loss, the reduction in the diameter of the pial vessels accounted for 10–15% of the norm immediately after blood collection and more than 30% of that during subsequent immersion cooling. In rats without blood loss, the constriction of the pial arteries during immersion cooling was significantly less. Thus, systemic hypothermia aggravates microcirculatory dysfunction caused by acute massive blood loss, suggesting an additive effect of hypothermia and hemorrhage on vasoconstrictor responses of the pial arteries in rats.

Keywords: immersion hypothermia, acute blood loss, pial artery, rat, rectal temperature, vasoconstriction, intravital microscopy

ИНФАРКТ-ЛИМИТИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ С ПОМОЩЬЮ L-ЛАКТАТА У МОЛОДЫХ И СТАРЫХ КРЫС ПРИ БЛОКАДЕ М-ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ АТРОПИНОМ

© 2022 г. Ф. И. Висмонт¹, С. Н. Чепелев^{1,*}, С. В. Губкин²

¹ Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

² Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

*e-mail: drserge1991@gmail.com

Поступила в редакцию 15.05.2022 г.

После доработки 25.06.2022 г.

Принята к публикации 29.06.2022 г.

Ишемическое повреждение является одним из наиболее неблагоприятных патогенных факторов, вызывающих необратимые изменения в органах и тканях. Защита сердца от ишемических и реперфузионных повреждений — важная задача современной экспериментальной и клинической медицины. Данный тип повреждения является ключевым звеном патогенеза ишемической болезни сердца и, прежде всего, острого инфаркта миокарда — социально-экономически значимого заболевания, являющегося одной из основных причин потери трудоспособности и смертности среди взрослого населения.

Целью исследования явилось выяснение инфаркт-лимитирующего эффекта посткондиционирования (Пост) с помощью L-лактата при ишемии-реперфузии миокарда у молодых и старых крыс при блокаде М-холинорецепторов атропином.

В опытах на крысах установлено, что Пост с помощью L-лактата оказывает инфаркт-лимитирующий эффект при ишемии-реперфузии миокарда как у молодых, так и у старых животных, однако в условиях системного действия атропина (2 мг/кг) инфаркт-лимитирующий эффект Пост с помощью L-лактата сохранялся только у старых крыс. По-видимому, активность периферических М-холинореактивных систем имеет значение в механизмах реализации кардиопротекторных эффектов Пост с помощью L-лактата у молодых, но не у старых крыс.

Ключевые слова: кардиопротекция, L-лактат, миокард, ишемия, реперфузия, атропин, М-холинореактивные системы

DOI: 10.31857/S0044452922050102

Согласно данным ВОЗ, ведущую причину смертности в мире занимают сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ), на долю которых приходится 16% всех случаев смерти [1]. В настоящее время одним из самых распространенных видов ССЗ является ишемическая болезнь сердца (ИБС). Учитывая большую частоту инвалидизации и сложность реабилитации пациентов с инфарктом миокарда, ИБС представляет собой не только значимую медицинскую, но и важную государственную проблему. В связи с этим поиск новых эффективных методов предотвращения или ослабления ишемического повреждения миокарда и выяснение механизмов его реализации остаются актуальной задачей современной экспериментальной и клинической медицины [2–6].

В последние два десятилетия объектом повышенного интереса ведущих мировых исследователей в области экспериментальной и клинической кардиологии являются кардиопротекторные (про-

тивоишемический и антиаритмический) эффекты дистантного ишемического пре- и посткондиционирования (ДПост), которые воспроизводятся ишемией конечностей, осуществляемой до или после острой коронароокклюзии соответственно [2–6].

Для эффективного применения любого варианта преко́ндиционирования (Пре) как меры профилактической кардиопротекции необходимо точно знать, когда наступит ишемия, требующая защиты миокарда. Однако ввиду того, что это практически невозможно, мощный кардиопротекторный потенциал Пре, как правило, клинически не используется. Следовательно, ишемическое посткондиционирование (Пост), особенно ДПост, имеющее несомненное преимущество перед различными вариантами Пре, можно успешно применять в клинической практике наряду с другими рекомендациями. Во-первых, это чрезвычайно безопасно и дешево, а также малоинвазивно; во-вторых, его

можно применять при оказании скорой медицинской помощи и ко всем пациентам с ишемией миокарда, получающим реперфузионное лечение.

Впервые ишемическое Пост было описано Zhao и соавт. в 2003 г., которые сообщили, что ишемическое Пост, состоящее из коротких прерывистых циклов ишемии, чередующихся с реперфузией, после острой коронароокклюзии может смягчить последствия реперфузионного повреждения [7].

Несколько позже, в 2012 г., Basalay и соавт. в экспериментах на крысах обнаружили, что кратковременная (15-минутная) ишемия задних конечностей оказывает выраженное инфаркт-лимитирующее действие на миокард не только в первые минуты реперфузии, но и при ее осуществлении на 10-й минуте после восстановления коронарного кровотока [8].

За последнее десятилетие данные ряда фундаментальных научных и клинических исследований подтвердили, что ишемическое Пост является эффективным методом снижения реперфузионного повреждения [8–11].

К настоящему времени накоплен достаточно большой объем знаний о феномене ишемического кондиционирования и его защитном влиянии на миокард. Однако биохимические механизмы кардиопротекции, лежащие в основе инфаркт-лимитирующего эффекта ишемического кондиционирования и особенно ДПост при ишемии-реперфузии миокарда, все еще остаются малоизученными [2, 3, 5, 6, 10].

Принимая во внимание известные факты о том, что гипоперфузия, ишемия органов и тканей приводят к повышению уровня молочной кислоты (лактата) в крови, а лактат, в свою очередь, оказывает коронарное сосудорасширяющее действие за счет выделения эндотелием сосудов монооксида азота (NO) [12, 13], а также способен ингибировать перекисное окисление липидов и свободнорадикальные процессы [14], выраженность которых при реперфузии возрастает, и может использоваться тканями, особенно миокардом, после гипоксии в большей степени, чем глюкоза [15], были основания полагать, что повышенный уровень лактата в крови (гиперлактатемия) сможет уменьшить реперфузионное повреждение миокарда.

Так, в проведенном нами в 2020 г. исследовании было установлено, что после воспроизведения ДПост у экспериментальных животных в крови повышается уровень L-лактата, а введение нейтрального L-лактата на 25-й минуте реперфузии в дозе 10 мг/кг частично имитирует инфаркт-лимитирующий эффект ДПост и приводит к снижению размеров зоны некроза в миокарде левого желудочка на 28.2% ($p < 0.05$ по сравнению с интактными животными), т.е. ослабляет повреждение сердца, вызываемое ишемией и реперфузией [16].

Учитывая, что в организме старых животных происходят значительные морфофункциональные и биохимические изменения [17, 18], были основания полагать, что возрастные изменения органов и тканей и, в частности, изменения в них активности периферических M-холинореактивных систем, могут оказывать существенное влияние на кардиопротекторную эффективность Пост с помощью L-лактата у старых крыс.

В то же время в современной литературе отсутствуют сведения, касающиеся выяснения кардиопротекторной эффективности Пост с помощью L-лактата при ишемии-реперфузии миокарда у молодых и старых крыс в условиях системного действия в организме животных блокатора M-холинореактивных систем атропина.

Целью данной работы было выяснить инфаркт-лимитирующий эффект Пост с помощью L-лактата при ишемии-реперфузии миокарда у молодых и старых крыс в условиях блокады M-холинорецепторов атропином.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на наркотизированных нелинейных белых крысах-самцах ($n = 101$), разделенных на две возрастные группы: 43 молодых (молод) крыс массой 200–250 г в возрасте 4 ± 1 мес и 58 старых (стар) крыс массой 400–450 г в возрасте 24 ± 1 мес. Из них, с учетом выживаемости животных после острой ишемии миокарда (ОИМ) и последующих процедур, для обработки и анализа результатов исследования было отобрано 72 крысы (по 36 молодых и старых). Все животные в начале эксперимента перед 30-минутной ишемией и последующей 120-минутной реперфузией миокарда были разделены на 6 групп: 1-я (Контроль_{молод}) – группа молодых крыс, которым проводилась ишемия-реперфузия миокарда ($n = 14$); 2-я (Контроль_{стар}) – группа старых крыс, которым проводилась ишемия-реперфузия миокарда ($n = 22$); 3-я (Лактат_{молод}) – группа молодых крыс, которым через 25 мин от начала реперфузии вводили в левую общую яремную вену L-лактат в дозе 10 мг/кг ($n = 14$); 4-я (Лактат_{стар}) – группа старых крыс, которым через 25 мин от начала реперфузии вводили в левую общую яремную вену L-лактат в дозе 10 мг/кг ($n = 17$); 5-я (Атропин + Лактат_{молод}) – группа молодых крыс, которым проводилась ишемия-реперфузия миокарда, и за 10 мин до воспроизведения Пост с помощью L-лактата вводили в левую общую яремную вену 0.2% раствора M-холинблокатора атропина (Sigma-Aldrich, США) в дозе 2 мг/кг ($n = 15$); 6-я (Атропин + Лактат_{стар}) – группа старых крыс, которым проводилась ишемия-реперфузия миокарда, и за 10 мин до воспроизведения Пост с помощью L-лактата вводили в левую общую яремную вену 0.2% раствора M-холинобло-

катора атропина (Sigma-Aldrich, США) в дозе 2 мг/кг ($n = 19$).

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами Республики Беларусь, принципам Базельской декларации и рекомендациям комитета по биомедицинской этике учреждения образования “Белорусский государственный медицинский университет” (Протокол № 8 от 07.10.2019 г.).

Животные содержались в условиях вивария УО «Белорусский государственный медицинский университет» в соответствии с нормативами индивидуального размещения. Рацион крыс состоял из комбикорма, количество которого определялось нормами кормления лабораторных животных. Питательный режим соответствовал принципу *ad libitum*, световой – естественному уровню освещенности в течение суток. Температуре воздуха в виварии поддерживали на уровне 20–25°C, что находится в пределах термонейтральной зоны для крыс. Относительная влажность воздуха составляла 50–70%. При выполнении работы особое внимание уделяли шумовому режиму содержания животных, так как высокий уровень шума способствует развитию стресса у крыс. Все манипуляции с животными проводили с 8.00 до 18.00. Экспериментальные группы животных формировали методом случайной выборки.

Для наркотизации животных использовали тиопентал натрия в дозе 50 мг/кг внутривенно с последующей внутривенной инфузией в левую общую яремную вену поддерживающей дозы 10 мг/кг · ч с помощью инъекционного насоса В. Braun (Германия). Адекватность выполненной общей анестезии оценивали по отсутствию рефлексорного отдергивания задней конечности животного на укол. Крыс переводили на искусственное дыхание атмосферным воздухом через трахеостому (частота дыхания 56–60 в мин, дыхательный объем 1.0–1.2 мл/100 г массы тела животного) при помощи аппарата искусственной вентиляции легких (Harvard, Великобритания). Наличие проходимости дыхательных путей контролировали по давлению в трахее, нормальным значением которого на вдохе считалось 10–15 мм рт.ст. В ходе экспериментов непрерывно регистрировали электрокардиограмму (ЭКГ) во II стандартном отведении и системное артериальное давление (АД), а полученные данные обрабатывали с помощью компьютерной программы Spike 4 (Великобритания). Для измерения АД прямым методом крысам канюлировали правую общую сонную артерию. Температуру тела измеряли в прямой кишке с помощью электротермометра (Harvard, Великобритания) и поддерживали электрогрелкой на уровне $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Грудную клетку наркотизированного животного вскрывали в IV межреберном промежутке слева. После периода 15-минутной

стабилизации гемодинамики крысам выполняли 30-минутную окклюзию передней нисходящей ветви левой коронарной артерии (ЛКА) путем механического ее пережатия при помощи лигатуры. Согласно современным экспериментальным данным, длительность коронарной окклюзии у крыс, равная 30–40 мин, является достаточной для формирования зоны некроза миокарда, составляющей около 50% от зоны риска [8]. Принимая во внимание литературные данные о том, что Пост у крыс с длительностью ишемии миокарда 45 мин и более не оказывает инфаркт-лимитирующего эффекта [19], мы предположили, что длительность ишемии миокарда, превышающая 30 мин, может оказаться неприемлемой для изучения противоишемической эффективности Поста у крыс. Окклюзия артерии подтверждалась цианозом ишемизированной области, снижением АД (на 10–20 мм рт.ст.) и подъемом сегмента ST на ЭКГ. Реперфузия миокарда достигалась снятием лигатуры и сопровождалась исчезновением цианоза и возвращением сегмента ST к изолинии. Длительность реперфузии составляла 120 мин, поскольку, согласно имеющимся литературным данным, указанный интервал времени является достаточным для формирования в миокарде крыс зоны некроза [8, 20].

На протяжении эксперимента у животных изучались следующие показатели гемодинамики: среднее АД ($\text{АД}_{\text{ср}}$), частота сердечных сокращений (ЧСС) и двойное произведение (ДП). $\text{АД}_{\text{ср}}$ рассчитывали как АД диастолическое + 1/3 (АД систолическое – АД диастолическое), ДП – как (ЧСС · АД систолическое)/100. Показатели гемодинамики регистрировали непрерывно в течение эксперимента и оценивали в конце 15-минутной стабилизации гемодинамики после вскрытия грудной клетки, в начале 30-минутной окклюзии ЛКА, в начале реперфузии миокарда, а также каждые 30 мин в течение периода реперфузии. Значения гемодинамических показателей в конце 15-минутной стабилизации гемодинамики после вскрытия грудной клетки принимали в качестве исходных значений данных показателей.

Критериями исключения животных из эксперимента являлись ЧСС < 300 уд/мин до начала эксперимента и $\text{АД}_{\text{ср}} < 60$ мм рт.ст., а также наличие у животных желудочковых экстрасистол до начала ОИМ.

Для оценки антиаритмического эффекта подсчитывали общую длительность нарушений сердечного ритма во время 30-минутной острой коронарной окклюзии – фибрилляции желудочков (ФЖ), пароксизмальной желудочковой тахикардии (ПЖТ), парной желудочковой экстрасистолии, желудочковой экстрасистолии по типу бигеминии, а также определяли наличие реперфузионных нарушений сердечного ритма.

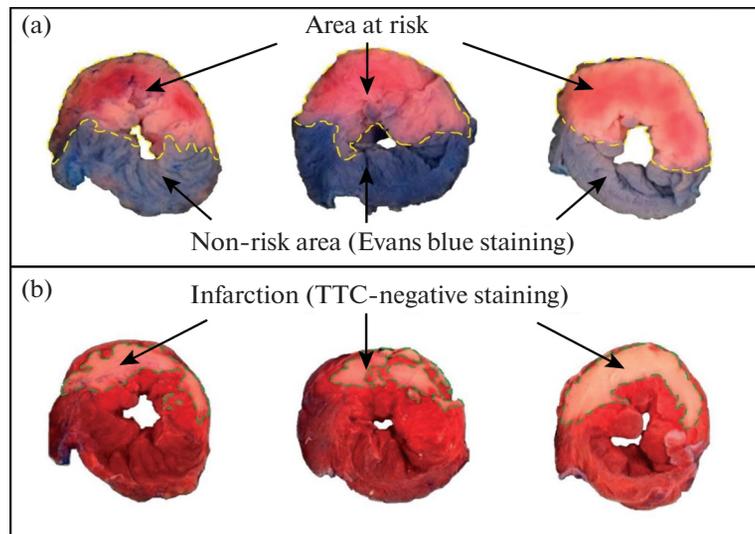


Рис. 1. Изображения ишемически-реперфузионного повреждения левого желудочка миокарда у крыс: (а) срезы, окрашенные красителем Evans Blue, на которых идентифицирована неперфузируемая зона риска, выделенная желтым цветом, а также нормально перфузионный участок миокарда, окрашенный красителем Evans Blue; (б) срезы на 15 мин помещали в 1%-ный раствор 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида (ТТС) и 24 ч инкубировали в 10%-ном растворе формалина при температуре 37.0°C, после чего измеряли участки зоны некроза бледно-розового цвета (окрашенные ТТС-негативно), выделенные зеленым контуром, в отличие от жизнеспособного ТТС-положительного миокарда, окрашенного в темно-красный цвет.

Зону риска определяли путем введения в левую общую яремную вену 0.5 мл 5%-ного раствора синьки Эванса (Sigma-Aldrich, США) в конце реперфузии при повторном кратковременном пережатии лигатурой ЛКА. Зону риска определяли как зону, не окрашенную в синий цвет (рис. 1). Затем сердце извлекали и отделяли от него левый желудочек. После замораживания в морозильной камере (при -20°C в течение 30 мин) левый желудочек разрезали на 6 поперечных срезов, которые в последующем взвешивали и сканировали с обеих сторон, используя сканер Epson.

При помощи компьютерной планиметрии с использованием программы Adobe Photoshop CC 2017 для каждого среза определяли отношение средней площади зоны риска в каждом срезе к средней площади всего среза. Массу зоны риска ($m_{\text{риска}}$) в каждом срезе вычисляли по формуле

$$m_{\text{риска}} = \frac{\bar{S}_{\text{риска}} \times m_{\text{среза}}}{\bar{S}_{\text{среза}}},$$

где $\bar{S}_{\text{риска}}$ — средняя площадь зоны риска в каждом срезе; $m_{\text{среза}}$ — масса всего среза; $\bar{S}_{\text{среза}}$ — средняя площадь всего среза.

Для расчета общей зоны риска (Зона_{риска}, %) использовали следующую формулу:

$$\text{Зона}_{\text{риска}} = \frac{\sum m_{\text{риска}}}{m_{\text{ЛЖ}}} \times 100,$$

где $\sum m_{\text{риска}}$ — арифметическая сумма значений масс зон риска всех срезов левого желудочка; $m_{\text{ЛЖ}}$ — масса левого желудочка.

Для идентификации зоны некроза в миокарде левого желудочка крыс использовали метод, основанный на определении активности дегидрогеназ [20]. Срезы помещали в 1%-ный раствор 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида на 15 мин при температуре 37.0°C . Жизнеспособный миокард (клетки, сохранившие дегидрогеназную активность) окрашивался в кирпично-красный цвет, а некротизированная ткань была бледно-розовой (рис. 1). После 24-часовой инкубации срезов в 10%-ном растворе формалина в термостате при температуре 37.0°C срезы сканировали повторно для определения соотношения площадей зоны риска и зоны некроза. При помощи компьютерной планиметрии для каждого среза миокарда левого желудочка определяли отношение средней площади зоны некроза в каждом срезе ($\bar{S}_{\text{некроза}}$) к средней площади всего среза ($\bar{S}_{\text{среза}}$). Массу зоны некроза ($m_{\text{некроза}}$) для каждого отдельного среза вычисляли по формуле

$$m_{\text{некроза}} = \frac{\bar{S}_{\text{некроза}} \times m_{\text{среза}}}{\bar{S}_{\text{среза}}},$$

где $\bar{S}_{\text{некроза}}$ — средняя площадь зоны некроза в каждом срезе; $m_{\text{среза}}$ — масса всего среза; $\bar{S}_{\text{среза}}$ — средняя площадь всего среза.

Для расчета общей зоны некроза ($\text{Зона}_{\text{некроза}}, \%$) в миокарде левого желудочка крыс использовали формулу

$$\text{Зона}_{\text{некроза}} = \frac{\sum m_{\text{некроза}}}{\sum m_{\text{риска}}} \times 100,$$

где $\sum m_{\text{некроза}}$ – арифметическая сумма значений масс зон некроза всех срезов левого желудочка.

Изучение кардиопротекторной эффективности Пост с помощью L-лактата при ишемии-реперфузии миокарда у крыс проводилось у животных, которым через 25 мин от начала реперфузии вводили в левую общую яремную вену 0.5 мл 40 мМоль нейтрализованного раствора L-(+)-молочной кислоты (Sigma-Aldrich, США), т.е. в дозе 10 мг/кг. Для изготовления нейтрализованного L-лактата для инъекций молочную кислоту растворяли в 0.9%-ном растворе NaCl с последующим доведением pH до 7.4 с помощью NaOH (10 N).

Доза L-лактата (10 мг/кг) была выбрана нами с целью обеспечить уровень L-лактата в крови, близкий к тому, что имел место после 15-минутного наложения лигатур на обеих бедренных артериях [16, 21]. Уровень L-лактата в цельной крови, взятой из левой общей яремной вены, определяли при помощи анализатора Lactate Pro 2 (Arkgray, Япония) малобъемным методом с помощью тест-полосок Lactate Pro 2 Test Strip для биохимических исследований (Arkgray, Япония).

Изучение кардиопротекторной эффективности Пост с помощью L-лактата при ишемии-реперфузии миокарда у старых и молодых крыс в условиях блокады M-холинореактивных систем проводилось у животных, которым за 10 мин до воспроизведения Пост с помощью L-лактата вводили в левую общую яремную вену 0.2% раствора M-холинореактивного блокатора атропина (Sigma-Aldrich, США) в дозе 2 мг/кг.

Полученные в исследовании результаты анализировали с использованием стандартных пакетов статистических программ Statistica 13.3 и GraphPad Prism 9. Для оценки нормальности распределения анализируемых показателей применяли критерий Колмогорова–Смирнова. Статистическую значимость различий полученных данных в случае их параметрического распределения оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием тестов множественных сравнений Данна и Бонферрони. Результаты исследования при их параметрическом распределении представляли в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm m$). Для оценки статистической значимости различий данных в случае их непараметрического распределения использовали критерий Краскала–Уоллиса и тест множественных сравнений Данна. При непараметрическом распределении результаты исследования были представлены в виде медианы и интерквартильно-

го размаха (25-й; 75-й процентиля). Уровень $p < 0.05$ рассматривали как статистически значимый.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выживаемость крыс после острой коронарной окклюзии составила 71.3% (29 крыс из 101 погибли в период ОИМ и последующей реперфузии). При этом в группе Контроль_{молод} выживаемость животных составила 85.7%; в группе Контроль_{стар} – 54.5%; в группе Лактат_{молод} – 85.7%; в группе Лактат_{стар} – 70.6%; в группе Атропин + Лактат_{молод} – 80.0%; в группе Атропин + Лактат_{стар} – 63.2%. Так, у старых крыс за время 30-минутной коронароокклюзии и последующей 120-минутной реперфузии имело место значительное снижение выживаемости по сравнению с молодыми крысами (погибло 22 старых и 7 молодых крыс), что свидетельствует о более чем двукратном снижении устойчивости миокарда старых крыс к повреждению, вызванному его длительной ишемией, а также последующей реперфузией. Таким образом, с учетом выживаемости животных в экспериментальных группах осталось по 12 крыс в каждой.

Установлено, что в группах Контроль_{молод}, Контроль_{стар}, Лактат_{молод}, Лактат_{стар}, Атропин + Лактат_{молод} и Атропин + Лактат_{стар} во время ОИМ имело место статистически значимое снижение показателя АД_{ср} ($p < 0.05$) по сравнению с его исходными значениями. В начале реперфузии в группах Контроль_{стар}, Лактат_{стар}, Атропин + Лактат_{молод} и Атропин + Лактат_{стар} также имело место статистически значимое снижение показателя АД_{ср} ($p < 0.05$) по сравнению с его исходными значениями. У животных, которым осуществлялось введение в левую общую яремную вену 0.2% раствора M-холинореактивного блокатора атропина в дозе 2 мг/кг за 10 мин до Пост с помощью L-лактата, отмечалось статистически значимое повышение показателя ЧСС ($p < 0.01$) по сравнению с его исходными значениями на 30, 60, 90 и 120 мин реперфузии. Изменение показателей гемодинамики на протяжении эксперимента у старых и молодых крыс представлено в табл. 1.

При проведении исследования установлено, что величина ДП в анализируемых группах крыс до начала острой коронарной окклюзии статистически значимо не различалась. Следовательно, были основания полагать, что животные всех анализируемых групп до начала эксперимента характеризовались сходной потребностью миокарда в кислороде.

При изучении антиаритмической эффективности Пост с помощью L-лактата при ишемии-реперфузии миокарда у молодых и старых крыс в условиях системного действия в организме животных блокатора M-холинореактивных систем атропина (2 мг/кг) были получены следующие результаты продолжительности аритмий: Контроль_{молод} –

Таблица 1. Изменение показателей гемодинамики у крыс исследуемых групп на протяжении эксперимента

Показатели гемодинамики		Контроль		Лактат		Атропин + лактат	
		Молод. (n = 12)	Стар. (n = 12)	Молод. (n = 12)	Стар. (n = 12)	Молод. (n = 12)	Стар. (n = 12)
До начала ОИМ	АД _{ср}	81 ± 5	88 ± 5	82 ± 3	87 ± 5	84 ± 3	89 ± 4
	ЧСС	415 ± 16	448 ± 17	410 ± 15	439 ± 18	415 ± 13	435 ± 19
Начало ОИМ	АД _{ср}	68 ± 4*	70 ± 5*	69 ± 4*	71 ± 4*	68 ± 5*	72 ± 4*
	ЧСС	430 ± 14	408 ± 24	434 ± 16	404 ± 17	426 ± 19	424 ± 22
Начало реперфузии	АД _{ср}	75 ± 5	73 ± 4*	76 ± 4	74 ± 5*	73 ± 3*	77 ± 4*
	ЧСС	433 ± 23	407 ± 31	420 ± 23	399 ± 35	416 ± 17	427 ± 18
30' реперфузии	АД _{ср}	77 ± 4	76 ± 5	75 ± 4	77 ± 5	75 ± 5	78 ± 4
	ЧСС	439 ± 19	404 ± 24	424 ± 21	403 ± 29	495 ± 21**	514 ± 24**
60' реперфузии	АД _{ср}	76 ± 5	78 ± 6	78 ± 5	78 ± 4	76 ± 4	79 ± 5
	ЧСС	432 ± 16	398 ± 23	415 ± 21	406 ± 21	502 ± 20**	521 ± 23**
90' реперфузии	АД _{ср}	78 ± 4	78 ± 5	78 ± 4	80 ± 4	77 ± 5	81 ± 4
	ЧСС	420 ± 16	393 ± 25	417 ± 18	416 ± 24	491 ± 17**	512 ± 20**
120' реперфузии	АД _{ср}	80 ± 5	79 ± 5	80 ± 3	81 ± 5	81 ± 4	83 ± 3
	ЧСС	413 ± 17	387 ± 25	420 ± 17	421 ± 21	484 ± 22**	503 ± 19**

Примечание. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ – различия статистически значимы по сравнению с исходными значениями.

167 (49; 233) с; Контроль_{стар} – 237 (128; 331) с; Лактат_{молод} – 145 (27; 192) с; Лактат_{стар} – 97 (66; 154) с; Атропин + Лактат_{молод} – 182 (54; 258) с и Атропин + Лактат_{стар} – 192 (77; 314) с.

В ходе исследования также установлено, что в группе Контроль_{молод} у 9 из 12 крыс отмечалась ФЖ, а у 11 животных данной группы была выявлена ПЖТ. Реперфузионные нарушения сердечного ритма имели место у 10 крыс данной группы. В группе Контроль_{стар} в период острой коронарной окклюзии у 11 из 12 крыс отмечались ФЖ и ПЖТ. Во время реперфузии миокарда нарушения сердечного ритма наблюдались также у 11 животных данной группы. В группе Лактат_{молод} в период острой коронарной окклюзии у 9 из 12 крыс отмечались ФЖ и ПЖТ. Во время реперфузии миокарда нарушения сердечного ритма наблюдались у 7 животных данной группы. В группе Лактат_{стар} в период острой коронарной окклюзии у 11 из 12 крыс отмечалась ФЖ, а ПЖТ имела место у 10 крыс. Во время реперфузии миокарда нарушения сердечного ритма наблюдались у 8 животных данной группы. В группе Атропин + Лактат_{молод} в период 30-минутной ишемии миокарда ФЖ и ПЖТ были выявлены у 11 из 12 животных. Реперфузионные аритмии имели место у 12 животных данной группы. В группе Атропин + Лактат_{стар} в период острой коронарной окклюзии у 11 из 12 крыс отмечались ФЖ и ПЖТ. Во время реперфузии миокарда нарушения сердечного ритма наблюдались у 11 животных данной группы.

Таким образом, длительность ишемических нарушений сердечного ритма в исследуемых группах старых и молодых крыс, подвергнутых атропинизации и Пост с помощью L-лактата, сопоставима с таковой в группах контроля.

При изучении инфаркт-лимитирующего эффекта Пост с помощью L-лактата при ишемии-реперфузии миокарда у молодых и старых крыс в условиях системного действия в организме животных блокатора М-холинореактивных систем атропина статистически значимых различий между анализируемыми группами по показателю размера зоны риска в миокарде левого желудочка не выявлено. Так, зона ишемии в группе Контроль_{молод} составила $54 \pm 3\%$, в группе Контроль_{стар} – $55 \pm 3\%$; в группе Лактат_{молод} – $52 \pm 4\%$; в группе Лактат_{стар} – $53 \pm 3\%$; в группе Атропин + Лактат_{молод} – $50 \pm 4\%$ и в группе Атропин + Лактат_{стар} – $54 \pm 5\%$. Таким образом, во всех анализируемых группах крыс размеры зоны риска в миокарде левого желудочка были сопоставимы.

Размер инфаркта является важным показателем повреждения миокарда из-за его влияния на сократимость сердца. Установлено, что размер зоны некроза в миокарде левого желудочка у животных в группе Контроль_{молод} составил $45 \pm 4\%$, а в группе Контроль_{стар} – $47 \pm 5\%$. После внутривенного введения животным L-лактата (10 мг/кг), которое осуществлялось через 25 мин после начала реперфузии, у крыс при ишемии и реперфузии миокарда в левом желудочке формировались следующие размеры зон некроза: в группе Лактат_{молод} – $33 \pm 3\%$

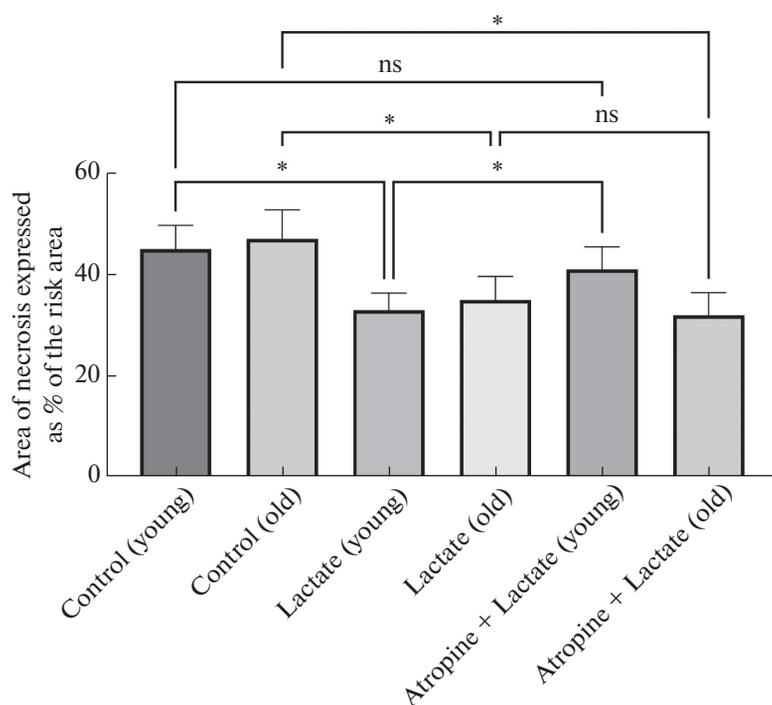


Рис. 2. Размеры зоны некроза в миокарде левого желудочка в исследуемых группах. * — статистически значимые различия ($p < 0.05$); ns — различия не достоверны.

($p < 0.05$ по сравнению с группой Контроль_{молод}), а в группе Лактат_{стар} — $35 \pm 4\%$ ($p < 0.05$ по сравнению с группой Контроль_{стар}). Размер зоны некроза в группах молодых и старых животных, которым на 15-й минуте реперфузии вводили блокатора М-холинореактивных систем атропин (2 мг/кг), а затем внутривенно вводился лактат, был следующим: в группе Атропин + Лактат_{молод} — $41 \pm 4\%$, а в группе Атропин + Лактат_{стар} — $32 \pm 4\%$ ($p < 0.05$ по сравнению с группой Контроль_{стар}) (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Достаточно долгое время лактат рассматривался как тупиковый метаболит, агент усталости или метаболический яд. В медицине было принято считать, что повышение уровня лактата в крови коррелирует с тяжестью заболевания или травмы. В последнее время в научной литературе стали появляться сведения о ранее неизвестных эффектах лактата и начали резко изменяться представления о роли лактата в физиологии и медицине. Так, в ряде исследований показано, что лактат участвует в регуляции метаболизма и играет ключевую роль в регулировании различных биологических процессов [22]. Выявлено, что L-лактат постоянно образуется и используется в различных клетках организма в полностью аэробных условиях [22]. Лактат, перемещаясь между клетками-продуцентами и клетками-потребителями, выполняет по крайней

мере три важные функции: является основным источником энергии, предшественником глюкозы в глюконеогенезе и сигнальной молекулой [22]. Концепции “лактатного челнока” описывают роль лактата в доставке окислительных и глюконеогенных субстратов, а также в передаче сигналов клетками [22].

В современной литературе имеются также, хотя и немногочисленные, экспериментальные исследования, посвященные выяснению механизмов влияния лактата на сердечную деятельность. Zhang и соавт. в опытах на мышах показали, что лактат ускоряет поляризацию макрофагов M2, продуцирующих противовоспалительные цитокины, через сигнальный путь STAT3, а также оказывает кардио-защитное действие после инфаркта миокарда за счет улучшения фракции выброса и фракционного укорочения, снижения апоптоза кардиомиоцитов и увеличения плотности микрососудов в зоне ишемии [23].

Есть мнение, что во время покоя или физической нагрузки лактат является основным энергетическим субстратом для здорового сердца [22]. Фактически в качестве энергетического субстрата для сердца L-лактат предпочтительнее глюкозы и свободных жирных кислот [24]. В клинической практике в исследовании Nalos и соавт. показано, что инфузия полумолярного лактата натрия может улучшить работу сердца у пациентов с острой сердечной недостаточностью без какого-либо пагуб-

ного воздействия на функцию органов [25]. Кроме того, исследования Коуата и соавт. выявили, что Пост с кровью, обогащенной лактатом, обеспечивает потенциальную кардиопротекцию у пациентов с инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST, которым выполнялось первичное чрескожное коронарное вмешательство [26]. Можно констатировать, что идет процесс накопления данных, свидетельствующих о том, что лактат может быть многообещающим средством лечения ССЗ.

За последние годы проведен ряд исследований, посвященных вопросу влияния пожилого возраста на воспроизводимость инфаркт-лимитирующего эффекта Пост у экспериментальных животных, однако выводы, сделанные на их основании неоднозначны и во многом являются противоречивыми. Так, результаты одних исследований свидетельствуют об отсутствии инфаркт-лимитирующего эффекта Пост у старых животных [27], а данные других исследований, наоборот, указывают о наличии у таких животных противоишемического эффекта Пост [28].

На сегодняшний день накоплено большое количество сведений, подчеркивающих важную роль парасимпатической регуляции сердечной деятельности в механизмах защиты миокарда от поврежденных [29–32]. В частности, согласно современным представлениям, парасимпатическая регуляция сердечной деятельности имеет важное значение в механизмах защиты миокарда от ишемического и реперфузионного повреждений [33–35].

Известно, что процессы старения организма сопровождаются ослаблением влияния парасимпатической регуляции на сердце, что связано с деструкцией холинергических нервных окончаний, снижением интенсивности процессов синтеза ацетилхолина и числа М-холинорецепторов в миокарде [17, 18].

Полученные нами данные свидетельствуют о наличии выраженного инфаркт-лимитирующего эффекта Пост с помощью L-лактата у молодых крыс ($p < 0.05$). Однако в условиях системного действия в организме животных блокатора М-холинореактивных систем атропина (2 мг/кг) у молодых крыс Пост с помощью L-лактата оказывало менее выраженный противоишемический эффект ($p > 0.05$). У старых животных в условиях системного действия в их организме атропина инфаркт-лимитирующий эффект Пост с помощью L-лактата сохранялся ($p < 0.05$).

Учитывая имеющиеся литературные данные о том, что у старых крыс имеет место выраженное снижение интенсивности процессов синтеза ацетилхолина и активности ацетилхолинтрансферазы, что может свидетельствовать о нарушении процессов холинергической регуляции сердечной деятельности у таких животных, данные выполненных исследований дают основания полагать, что актив-

ность периферических М-холинореактивных систем имеет значение в механизмах реализации инфаркт-лимитирующего эффекта Пост с помощью L-лактата у молодых, но не у старых крыс. В пользу сделанного предположения свидетельствуют и такие имеющиеся в литературе сведения, что при старении организма у животных происходит деструкция холинергических нервных окончаний и уменьшение числа М-холинорецепторов в миокарде, что в конечном итоге ведет к ослаблению парасимпатических влияний на сердце у старых животных [17, 18].

Таким образом, данные, полученные в настоящем исследовании, свидетельствуют о том, что Пост с помощью L-лактата оказывает инфаркт-лимитирующий эффект при ишемии-реперфузии миокарда как у молодых, так и у старых крыс, однако в условиях системного действия в организме животных атропина этот эффект Пост с помощью L-лактата сохранялся только у старых крыс. Установлено, что Пост с помощью L-лактата у старых крыс, после введения в организм животных атропина в дозе 2 мг/кг, приводит к уменьшению размеров зоны некроза в миокарде левого желудочка на 31.9% ($p < 0.05$) по сравнению с контрольной группой старых крыс. По-видимому, активность периферических М-холинореактивных систем имеет значение в механизмах реализации кардиопротекторных эффектов Пост с помощью L-лактата у молодых, но не у старых крыс.

Полученные знания о биохимических механизмах кардиопротекторной эффективности Пост с помощью L-лактата послужат научным обоснованием для разработки новых подходов к профилактике и лечению ССЗ, патогенез которых связан с недостаточным кровоснабжением миокарда и тканевой гипоксии.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Экспериментальная работа выполнена в рамках Государственной программы научных исследований 4 “Трансляционная медицина” подпрограммы 4.2 “Фундаментальные аспекты медицинской науки”, финансируемой Министерством здравоохранения Республики Беларусь, по заданию 1.26 “Изучить кардиопротекторную эффективность посткондиционирования с помощью лактата при ишемии-реперфузии миокарда и выяснить механизмы ее реализации”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы, планирование эксперимента (Ф.И.В., Ч.С.Н., Г.С.В.), сбор данных (Ф.И.В., Ч.С.Н., Г.С.В.), обработка данных (Ф.И.В., Ч.С.Н., Г.С.В.), написание и редактирование манускрипта (Ф.И.В., Ч.С.Н., Г.С.В.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. WHO reveals leading causes of death and disability worldwide 2000–2019. Available at: <https://www.who.int/news/item/09-12-2020-who-reveals-leading-causes-of-death-and-disability-worldwide-2000-2019> (accessed 14.05.2022).
2. *Shemarova IV, Nesterov VP, Korotkov SM, Silkin UA* (2018) Evolutionary aspects of cardioprotection. *J Evol Biochem Physiol* 54 (1): 9–19. <https://doi.org/10.1134/S0022093018010027>
3. *Баутин АЕ, Карпова ЛИ, Маричев АО, Ташханов ДМ, Науменко ВС, Галагудза ММ* (2016) Кардиопротективные эффекты ишемического кондиционирования: современные представления о механизмах, экспериментальные подтверждения, клиническая реализация. *Трансляцион медиц* 3 (1): 50–62. [*Bautin AE, Karpova LI, Marichev AO, Tashkhanov DM, Naumenko VS, Galagudza MM* (2016) Cardioprotective effects of ischemic conditioning: current concepts of mechanisms, experimental evidence, clinical implementation. *Translat med* 3 (1): 50–62. (In Russ)]. <https://doi.org/10.18705/2311-4495-2016-3-1-50-62>
4. *Маслов ЛН, Мрочек АГ, Халиулин ИГ, Хануш Л, Пей ЖМ, Жанг И* (2013) Адаптивный феномен ишемического посткондиционирования сердца. Перспективы клинического применения. *Вестн Росс акад мед наук* 68 (1): 10–20. [*Maslov LN, Mrochek AG, Khaliulin IG, Hanus L, Pei JM, Zhang Y* (2013) Adaptive phenomenon of ischemic postconditioning of the heart. Perspectives of clinical use. *Ann Russ Acad Med Sci* 68 (1): 10–20 (In Russ)]. <https://doi.org/10.15690/vramn.v68i1.532>
5. *Шляхто ЕВ, Нифонтов ЕМ, Галагудза ММ* (2007) Ограничение ишемического и реперфузионного повреждения миокарда с помощью пре- и посткондиционирования: молекулярные механизмы и мишени для фармакотерапии. *Креативн кардиол* 1–2: 75–101. [*Shlyakhto EV, Nifontov EM, Galagudza MM* (2007) Limitation of ischemic and reperfusion injury of the myocardium using pre- and postconditioning: molecular mechanisms and targets for pharmacotherapy. *Creative cardiol* 1–2: 75–101. (In Russ)].
6. *Galagudza MM, Blokhin IO, Shmonin AA, Mischenko KA* (2008) Reduction of myocardial ischaemia-reperfusion injury with pre- and postconditioning: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Cardiovas Hematolog Dis-Drug Targ* 8 (1): 47–65. <https://doi.org/10.2174/187152908783884966>
7. *Zhao ZQ, Corvera JS, Halcos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J* (2003) Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol – Heart Circulat Physiol* 285: H579–H588. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01064.2002>
8. *Basalay M, Barsukevich V, Mastitskaya S, Mrochek A, Pernow J, Sjöquist PO, Ackland GL, Gourine AV, Gourine A* (2012) Remote ischaemic pre- and delayed postconditioning – similar degree of cardioprotection but distinct mechanisms. *Experiment Physiol* 97 (8): 908–917. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2012.064923>
9. *Ferdinandy P, Hausenloy DJ, Heusch G, Baxter GF, Schulz R* (2014) Interaction of risk factors, comorbidities, and comedications with ischemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning, and remote conditioning. *Pharmacolog Rev* 66 (4): 1142–1174. <https://doi.org/10.1124/pr.113.008300>
10. *Heusch G* (2015) Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre, post, and remote conditioning. *Circulat Res* 116: 674–699. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.305348>
11. *Нарыжная НВ, Логвинов СВ, Курбатов БК, Мухомедзянов АВ, Сиротина МА, Чепелев СН, Висмонт ФИ, Маслов ЛН* (2022) Эффективность дистантного ишемического посткондиционирования миокарда у крыс с индуцированным метаболическим синдромом зависит от уровня лептина. *Вес Нац акад наук Беларусі Сер мед навук* 19 (1): 38–47. [*Naryzhnaya NV, Logvinov SV, Kurbatov BK, Mukhomedyanov AV, Sirotnina MA, Chepelev SN, Vismont FI, Maslov LN* (2022) The efficiency of remote ischemic postconditioning of the myocardium in rats with induced metabolic syndrome depends on the leptin level. *Proceed Nat Acad Sci Belarus Med series* 19 (1): 38–47. (In Russ)]. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-1-38-47>
12. *Montoya JJ, Fernández N, Monge L, Diéguez G, Villalón AL* (2011) Nitric oxide-mediated relaxation to lactate of coronary circulation in the isolated perfused rat heart. *J Cardiovascul Pharmacol* 5 (4): 392–398. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e318226bcf7>
13. *Чепелев СН, Висмонт ФИ* (2020) О значимости монооксида азота в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта дистантного ишемического посткондиционирования при ишемии-реперфузии миокарда у молодых и старых крыс. *Вес Нац Акад Навук Беларусі Сер мед навук* 17 (3): 353–364. [*Chepelev SN, Vismont FI* (2020) Significance of nitrogen monoxide in the implementation of the infarctlimiting effect of remote ischemic postconditioning in myocardial ischemia-reperfusion in young and old rats. *Proceed Nat Acad Sci Belarus Med series* 17 (3): 353–364. (In Russ)]. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-3-353-363>
14. *Groussard C, Morel I, Chevanne M, Monnier M, Cillard J, Delamarche A* (2000) Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an *in vitro* study. *J App Physiol* (1985) 89 (1): 169–175. <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.89.1.169>
15. *Трекова НА, Аксельрод БА, Юдичев ИИ, Гуськов ДА, Маркин АВ, Попов АМ* (2016) Клинические аспекты динамики лактата крови во время операции на сердце и аорте в условиях искусственного кровообращения. *Анестезиол реанимац* 61 (5): 324–329. [*Trekova NA., Akse'rod BA, Yudichev II, Gus'kov DA, Markin AV, Popov AM* (2016) Clinical aspects of the dynamics of blood lactate during surgery on the heart and

- aorta under conditions of cardiopulmonary bypass. *Anesthes Resuscitat* 61 (5): 324–329. (In Russ)].
16. *Чепелев СН, Висмонт ФИ, Губкин СВ* (2020) О значимости гиперлактатемии в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта дистантного ишемического посткондиционирования при ишемии-реперфузии миокарда в эксперименте. Докл Нац Акад Наук Беларуси 64 (3): 332–340. [Chepelev SN, Vismont FI, Goubkin SV (2020) On the significance of hyperlactatemia in the implementation of the infarct-limiting effect of remote ischemic postconditioning in myocardial ischemia-reperfusion in the experiment. *Dokl Nat Acad Sci Belarus* 64 (3): 332–340. (In Russ)]. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-3-332-340>
 17. *Аринчин НИ, Фролькис ВВ, Аршавский ИА* (1982) Биология старения. Ленинград Наука. [Arinchin NI, Frol'kis VV, Arshavskiy IA (1982) *Biology of aging*. Leningrad Nauka. (In Russ)].
 18. *Фролькис ВВ, Верхратский НС, Шевчук ВГ* (1977) Нервная регуляция функции сердца при старении. Физиол журн СССР 63 (8): 1134–1143. [Frol'kis VV, Verkhraiskiy NS, Shevchuk VG (1977) Nervous regulation of heart function during aging. *Sech Physiol J USSR* 63 (8): 1134–1143. (In Russ)].
 19. *Tang XL, Sato H, Tiwari S, Dawn B, Bi Q, Li Q, Shirk G, Bolli R* (2006) Cardioprotection by postconditioning in conscious rats is limited to coronary occlusions <45 min. *Am J Physiol Heart Circulat Physiol* 291 (5): H2308–H2317. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00479.2006>
 20. *Fishbein MC, Meerbaum S, Rit J, Lando U, Kanmatsuse K, Mercier JC, Corday E, Ganz W* (1981) Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique. *Am Heart J* 101 (5): 593–600. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(81\)90226-x](https://doi.org/10.1016/0002-8703(81)90226-x)
 21. *Чепелев СН, Висмонт ФИ, Губкин СВ, Маслов ЛН* (2021) Кардиопротекторная эффективность фармакологического посткондиционирования с помощью молочной кислоты при ишемии-реперфузии миокарда у крыс с транзитной гиперхолестеринемией. Вес Нац Акад Навук Беларусі Сер мед навук 18 (2): 135–146. [Chepelev SN, Vismont FI, Gubkin SV, Maslov LN (2021) Cardioprotective efficiency of pharmacological postconditioning using lactic acid in ischemia-reperfusion of the myocardium in rats with transitional hypercholesterolemia. *Proc Nat Acad Sci Belarus Med series* 18 (2): 135–146. (In Russ)]. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-135-146>
 22. *Brooks GA* (2018) The science and translation of lactate shuttle theory. *Cell Metabolism* 27 (4): 757–785. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.03.008>
 23. *Zhang J, Huang F, Chen L, Li G, Lei W, Zhao J, Liao Y, Li Y, Li C, Chen M* (2021) Sodium lactate accelerates M2 macrophage polarization and improves cardiac function after myocardial infarction in mice. *Cardiovascu Therapeutics* 2021: 5530541. <https://doi.org/10.1155/2021/5530541>
 24. *Bergman BC, Tsvetkova T, Lowes B, Wolfel EE* (2009) Myocardial glucose and lactate metabolism during rest and atrial pacing in humans. *J Physiol* 587 (9): 2087–2099. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.168286>
 25. *Nalos M, Leverve XM, Huang SJ, Weisbrodt L, Parkin R, Seppelt IM, Ting I, Mclean AS* (2014) Half-molar sodium lactate infusion improves cardiac performance in acute heart failure: a pilot randomised controlled clinical trial. *Critical Care* 18 (2): R48. <https://doi.org/10.1186/cc13793>
 26. *Koyama T, Munakata M, Akima T, Kageyama T, Shibata M, Moritani K, Kanki H, Ishikawa S, Mitamura H* (2016) Impact of postconditioning with lactate-enriched blood on in-hospital outcomes of patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Internat J Cardiol* 220: 146–148. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.06.176>
 27. *Donato M, Evelson P, Gelpi RJ* (2017) Protecting the heart from ischemia/reperfusion injury: an update on remote ischemic preconditioning and postconditioning. *Cur Opin Cardiol* 32 (6): 784–790. <https://doi.org/10.1097/HCO.0000000000000447>
 28. *Yin Z, Gao H, Wang H, Li L, Di C, Luan R, Tao L* (2009) Ischaemic post-conditioning protects both adult and aged Sprague-Dawley rat heart from ischaemia-reperfusion injury through the phosphatidylinositol 3-kinase-AKT and glycogen synthase kinase-3beta pathways. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36 (8): 756–763. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2009.05148.x>
 29. *Rana OR, Schauerte P, Kluttig R, Schröder JW, Koenen RR, Weber C, Nolte KW, Weis J, Hoffmann R, Marx N, Saygili E* (2010) Acetylcholine as an age-dependent non-neuronal source in the heart. *Autonomic Neurosci* 156 (1–2): 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2010.04.011>
 30. *Xiong J, Xue FS, Xu YC, Yang QY, Liao X, Wang WL* (2009) Cholinergic agonists may produce preservation of myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Med Hypoth* 73 (3): 312–314. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2009.03.026>
 31. *Ando M, Katare RG, Kakinuma Y, Zhang D, Yamasaki F, Muramoto K, Sato T* (2005) Efferent vagal nerve stimulation protects heart against ischemia-induced arrhythmias by preserving connexin43 protein. *Circulation* 112 (2): 164–170. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.525493>
 32. *Katare RG, Ando M, Kakinuma Y, Arikawa M, Handa T, Yamasaki F, Sato T* (2009) Vagal nerve stimulation prevents reperfusion injury through inhibition of opening of mitochondrial permeability transition pore independent of the bradycardiac effect. *J Thoracic Cardiovascul Surgery* 137 (1): 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2008.08.020>
 33. *Donato M, Buchholz B, Rodriguez M, Perez V, Inserte J, Garcia-Dorado D, Gelpi RJ* (2013) Role of the parasympathetic nervous system in cardioprotection by remote hindlimb ischaemic preconditioning. *Exp Physiol* 98 (2): 425–434. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2012.066217>

34. Мрочек АГ, Булгак АГ, Басалай МВ, Барсукевич ВЧ, Гурич АВ (2014) Механизмы парасимпатических влияний на сердце в развитии противоишемического эффекта дистантного кондиционирования миокарда. Евраз кард журн 1: 81–88. [Mrochek AG, Bulgak AG, Basalay MV, Barsukevich VC, Gurin AV (2014) Mechanisms of parasympathetic influences on the heart in the development of the anti-ischemic effect of distant myocardium conditioning. Euras Cardiol J 1: 81–88.]
35. Intachai K, Chattipakorn SC, Chattipakorn N, Shinlapwittayatorn K (2018) Revisiting the cardioprotective effects of acetylcholine receptor activation against myocardial ischemia/reperfusion injury. Int J Mol Sci 19 (9): 2466. <https://doi.org/10.3390/ijms19092466>

Myocardial Infarct Size-Limiting Effect of Postconditioning with L-Lactate in Young and Old Rats under Atropine-Induced Blockade of M-cholinergic Receptors

F. I. Vismont^a, S. N. Chepelev^{a,#}, and S. V. Goubkin^b

^a Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

^b Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

[#] e-mail: drserge1991@gmail.com

Ischemic damage is one of the most adverse pathogenic factors causing irreversible changes in organs and tissues. Cardioprotection from ischemia/reperfusion injury is an important challenge for modern experimental and clinical medicine. This type of injury is a key link in the pathogenesis of coronary heart disease and, above all, acute myocardial infarction, a socioeconomically significant disease that is one of the main causes of disability and mortality among the adult population. The aim of the study was to elucidate the infarct size-limiting effect of postconditioning (Post) with L-lactate-enriched blood during myocardial ischemia/reperfusion in young and old rats under atropine-induced blockade of M-cholinergic receptors. In experiments on rats, it was found that Post with L-lactate has an infarct size-limiting effect during myocardial ischemia/reperfusion in both young and old animals, however, under conditions of systemic atropine administration (2 mg/kg), this effect was persistent in old rats only. Apparently, the activity of peripheral M-cholinergic systems is of importance for the mechanisms of implementation of the cardioprotective effects of Post with L-lactate in young, but not old rats.

Keywords: cardioprotection, L-lactate, myocardium, ischemia, reperfusion, atropine, M-cholinergic systems

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ мРНК ТИТИНА И ОБСКУРИНА В ПОПЕРЕЧНО-ПОЛОСАТЫХ МЫШЦАХ ДЛИННОХВОСТОГО СУСЛИКА *UROCITELLUS UNDULATUS*

© 2022 г. Ю. В. Грицына¹, М. А. Грабарская¹, Г. З. Михайлова¹,
С. С. Попова¹, Л. Г. Бобылева¹, А. М. Ермаков¹, Н. М. Захарова², И. М. Вихлянцев^{1,*}

¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Московская область, Россия

² Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр
“Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”,

Пущино, Московская область, Россия

*e-mail: ivanvikhlyantsev@gmail.com

Поступила в редакцию 09.06.2022 г.

После доработки 05.07.2022 г.

Принята к публикации 05.07.2022 г.

Методом ОТ-ПЦР в реальном времени проведено исследование сезонных изменений содержания мРНК гигантских белков саркомерного цитоскелета титина и обскурина в скелетной мышце *m. longissimus dorsi* и левом желудочке сердца длиннохвостого суслика *Uroditellus undulatus*. Эксперименты проводились на животных следующих экспериментальных групп: “летняя активность”, “осенняя активность”, “гипотермия” (спячка) и “зимняя активность”; $n = 5$ для каждой группы. В сердечной мышце сусликов группы “гипотермия” обнаружено уменьшение (на 28%, $p \leq 0.01$) содержания мРНК титина; в трех других группах статистически значимых различий в этом параметре не выявлено. В *m. longissimus dorsi* сусликов из групп “гипотермия” и “зимняя активность” наблюдалось увеличение в 2.9 раза ($p \leq 0.01$) и в 3.6 раза ($p \leq 0.01$) соответственно содержания мРНК титина при отсутствии статистически значимых различий в этом параметре между группами “летняя активность” и “осенняя активность”. Содержание мРНК обскурина было повышено в 3.4–3.6 раза ($p \leq 0.01$) в сердечной мышце сусликов из групп “осенняя активность”, “гипотермия”, “зимняя активность” и в 3.0 и 3.6 раза ($p \leq 0.01$) в скелетной мышце сусликов из групп “гипотермия” и “зимняя активность” соответственно. Таким образом, впервые получены данные о дифференциальной экспрессии мРНК титина и обскурина, указывающие на сопряженные изменения этих белков в мышцах длиннохвостого суслика в период гибернации. Полученные результаты обсуждаются в контексте адаптации поперечно-полосатых мышц длиннохвостого суслика к условиям зимней спячки.

Ключевые слова: *Uroditellus undulatus*, гибернация, *m. longissimus dorsi*, сердечная мышца, титин, обскурин, дифференциальная экспрессия генов

Abbreviations: MyHC – myosin heavy chains, mRNA – matrix ribonucleic acid, RT-PCR – reverse transcription polymerase chain reaction

DOI: 10.31857/S0044452922050047

Зимняя спячка является уникальной моделью исследования молекулярных механизмов пластичности поперечно-полосатых мышц. Поиск ответов на вопросы о том, почему, несмотря на развитие атрофии скелетных мышц после продолжительного периода обездвиженности, зимнеспящие животные выходят из состояния гипотермии в течение 2–6 ч (в зависимости от температуры окружающей среды) без нарушений сократительной способности мышц, и какие молекулярные механизмы ответственны за функционирование сердечной мышцы в диапазоне температур от 0°C до 37°C, является актуальным направлением совре-

менной биологии, в частности, мышечной физиологии гибернантов, и позволит открыть новые пути коррекции мышечных патологий, связанных с ограничением подвижности.

Исследования, проведенные в этом направлении, выявили дифференциально экспрессирующиеся гены в мышцах гибернантов, что свидетельствует о молекулярно-генетических механизмах, регулирующих сезонные изменения активности многих сигнальных путей, ответственных, в том числе, за синтез и протеолитическую деградацию белков [1–8]. Эти данные свидетельствуют о значительных перестройках на молекулярном уровне,

адаптирующих мышцы гибернантов к условиям зимней спячки.

Исследования, проведенные нами ранее, выявили в поперечно-полосатых мышцах длиннохвостого суслика и других гибернантов [9–13] адаптационные изменения изоформного состава и уровня фосфорилирования титина (тайтина, мол. массы изоформ составляют 3000–3800 кДа) – гигантского эластичного белка, отвечающего за подержание высокоупорядоченной саркомерной структуры, регулирующего актин-миозинное взаимодействие и участвующего, как механосенсор, в регуляции процессов внутриклеточной сигнализации [14, 15]. В частности, в поперечно-полосатых мышцах истинного гибернанта длиннохвостого суслика *Urocitellus undulatus* (прежнее название *Spermophilus undulatus*) в период “осенней” активности – когда в организме зимнеящих происходят изменения, подготавливающие животных к сезону гибернации, наблюдалась тенденция к увеличению доли более длинных изоформ титина (имеющих большую молекулярную массу) и уменьшению доли более коротких изоформ этого белка [9]. В период гипотермии (спячки), несмотря на ~15–20% уменьшение общего содержания изоформ титина, в поперечно-полосатых мышцах длиннохвостого суслика наблюдалось статистически значимое увеличение доли более длинных изоформ титина в сравнении с их содержанием в период летней активности [9, 12]. В частности, в предсердиях и желудочках сердца сусликов группы гипотермии (спячки) зарегистрировано двукратное увеличение содержания более длинной N2BA-изоформы титина по отношению к содержанию более короткой N2B-изоформе в сравнении с содержанием этих изоформ в сердце летних активных животных [9]. В период “зимней” активности – кратковременной нормотермии (не более суток) между периодами гипотермии, наблюдалось восстановление уменьшенного в период спячки содержания титина в мышцах длиннохвостого суслика [9, 12]. При этом сохранялось повышенное содержание более длинных изоформ этого белка. Представленные данные позволяют говорить о дифференциальной экспрессии гена титина, кодирующего различающиеся по длине изоформы этого белка, в поперечно-полосатых мышцах длиннохвостого суслика.

В данной работе исследованы сезонные изменения содержания мРНК титина в сердечной мышце, сократительная активность которой сохраняется в период спячки, и скелетной мышце *m. longissimus dorsi*, функциональная активность которой ингибируется в период спячки, у длиннохвостого суслика *Urocitellus undulatus*. Мы ожидали получить следующие результаты: (1) обнаружить увеличение содержания мРНК титина в двух исследуемых типах мышечной ткани сусликов в период “осенней” активности, принимая во внимание данные об увели-

чении содержания более длинных (более высокомолекулярных) изоформ титина в сердечной и скелетных мышцах сусликов в этот период [9]; (2) учитывая данные о молекулярных механизмах, стабилизирующих мРНК и защищающих ее от деградации в период спячки [16, 17], обнаружить повышенное содержание мРНК титина в исследуемых мышцах сусликов в этот период, несмотря на общую транскрипционную супрессию в период гипотермии [18]; (3) выявить поддержание стабильно повышенного уровня мРНК титина, а возможно, и его увеличение в мышцах сусликов в период “зимней” активности, учитывая данные о преобладающем синтезе титина в этот период [12]. Аналогичные результаты мы ожидали обнаружить и для мРНК обскурина – сравнительно недавно открытого гигантского мышечного белка, взаимодействующего в саркомере с титином и формирующего вместе с ним трехмерный цитоскелетный каркас, поддерживающий высокоупорядоченную структуру миофибрилл и мышцы в целом [19, 20].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментах были использованы длиннохвостые суслики *Urocitellus undulatus*, отловленные летом в местах их природного обитания (долина реки Лена, Якутия), и содержащиеся в условиях вивария ИБК РАН (Пушино, Московская область) в индивидуальных клетках при естественном фотопериоде; обеспечение пищей, водой и гнездовым материалом *ad libitum*. Эксперименты проводились на животных, находящихся в следующих состояниях: “летней” активности (нормотермия, 38°C, май–июль, сезонный контроль); “осенней” активности (нормотермия, 38°C, октябрь–первая половина ноября); гипотермии (глубокое оцепенение (спячка), декабрь–март, температура сердечной мышцы 1.5–2.0°C, продолжительность периода гипотермии 7–11 сут); “зимней” активности (нормотермия, 36–37°C, периодически повторяющиеся временные промежутки (не более суток) между периодами гипотермии, взятие материала происходило через 10–14 ч эутермного состояния после пробуждения). Количество животных для каждой группы – $n = 5$. Подготовку животных к экспериментам и контроль их физиологического состояния проводили согласно методике [21]. На проведение экспериментов с животными получено разрешение Комиссии по биологической безопасности и биоэтике ИТЭБ РАН, протокол № 32/2020 от 18 февраля 2020 г. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Образцы мышечной ткани (скелетной мышцы *m. longissimus dorsi* (пояснично-крестцовый отдел) и левого

Таблица 1. Праймеры, используемые для ОТ-ПЦР в реальном времени

Гены	Прямой праймер	Обратный праймер	Длина продукта ПЦР, п.н.
<i>GAPDH</i>	5'-TCATGACCACAGTCCATGCC-3'	5'-CCAGTGGATGCAGGGATGAT-3'	115
<i>TTN</i>	5'-AGTCTCGGGCTTGA AAAAATGTG-3'	5'-TCTGTACCATGTCACTTTGGGG-3'	100
<i>OBSCN</i>	5'-CACTCCTTCAGCGGAGCAC-3'	5'-GTCCTTCTCCAGCTCACG-3'	129

Обозначения: *GAPDH* – глицеральдегид 3-фосфатдегидрогеназа, *TTN* – титин, *OBSCN* – обскурин, ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.

желудочка сердца после изъятия замораживались в жидком азоте и хранились при температуре -75°C .

Поскольку в базе данных PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) отсутствуют нуклеотидные последовательности генов титина и обскурина длиннохвостого суслика *Urocitellus undulatus*, было проведено выравнивание (с помощью программного обеспечения CLUSTAL W (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/>)) известных нуклеотидных последовательностей мРНК титина и обскурина серой крысы (*Rattus norvegicus*), альпийского сурка (*Marmota marmota*) и тринадцатиполосного суслика (*Ictidomys tridecemlineatus*) с целью поиска гомологичных участков в мРНК известных последовательностей изучаемых генов у этих близкородственных животных, относящихся к отряду грызунов. На основе гомологии с известными нуклеотидными последовательностями мРНК титина, обскурина и *GAPDH* (референсный ген) серой крысы (титин: XM_039106393.1; обскурин: XM_039087230.1; *GAPDH*: XM_039107008.1), альпийского сурка (титин: XM_015481108.1; обскурин: XM_015498766.1; *GAPDH*: XM_015500718.1) и тринадцатиполосного суслика (титин: XM_040294541.1; обскурин: XM_040273316.1; *GAPDH*: XM_005338350.4), были подобраны специфические праймеры (с использованием алгоритмов программы BLAST) для проведения ОТ-ПЦР в реальном времени с целью определения содержания мРНК титина и обскурина в исследуемых мышцах (см. табл. 1). Ген *GAPDH* был выбран в качестве референсного гена, поскольку содержание его мРНК не менялось в поперечнополосатых мышцах четырех исследованных групп сусликов.

Праймеры были синтезированы фирмой “Евроген” (Россия). Суммарную РНК экстрагировали из 4–6 мг мышечной ткани при помощи RNeasyMicroKit (QIAGEN, Германия) по протоколу изготовителя. Определение концентрации тотальной РНК проводили на спектрофотометре UV 2450 (“Shimadzu”, Япония) в диапазоне от 200 до 320 нм. Пробу перед измерением развели в 21 раз в ТЕ-буфере (10 mM Tris, 1 mM ЭДТА, pH 8.0). Измерение каждой пробы проводилось не менее 3 раз в кювете для микрообъемов. Чистота образцов оценивалась по соотношению показателей поглощения при различных длинах волн. Для проведения

обратной транскрипции были использованы компоненты фирмы “Синтол” (Россия). Для синтеза кДНК водный раствор, содержащий 1 мкг суммарной РНК, 30 мкМ случайных гексануклеотидов и 17.4 мкМ олиго-d (T)₁₅, инкубировали в течение 3-х мин при 70°C и затем переносили на лед. Далее к смеси добавляли 11.5 мкл мастер-микса (1.3 mM dNTP, 0.02 ед./мкл ингибитора РНКазы, 6 ед./мкл M-MLV-ревертазы, 4 мкл 5x-буфера для M-MLV-ревертазы, “Синтол”). После этого пробы помещали в амплификатор для проведения обратной транскрипции: 10 мин при 25°C , 60 мин при 37°C , 5 мин при 95°C , 30 мин при 4°C . Полученная кДНК использовалась для проведения ПЦР в реальном времени с праймерами, специфичными к генам исследуемых белков (титину, обскурина и *GAPDH*). ОТ-ПЦР в реальном времени проводилась на амплификаторе ДТ-322 (“ДНК-Технология”, Россия) с использованием ДНК-полимеразы Tersus (“Евроген”) и флуоресцентного красителя SYBR Green I (“Invitrogen”). Режим ПЦР был следующим: 1) “горячий старт” – 95°C , 5 мин; 2) денатурация – 92°C , 10 с; 3) отжиг праймеров – 60°C , 30 с; 4) элонгация – 68°C , 1 мин. Этапы со 2-го по 4-й повторялись 30 раз. Изменение экспрессии генов рассчитывалось по методу $2^{-\Delta\Delta C_t}$ согласно [22]. Значения $\Delta\Delta C_t$ рассчитывались по формуле $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ (контроль) – ΔC_t (опыт), каждое значение ΔC_t рассчитывалось по формуле $\Delta C_t = C_t$ (ген исследуемого белка) – C_t (референсный ген). Продукты ПЦР выделяли из геля согласно протоколу Cleanup Standard (“Евроген”). Фрагменты ДНК были секвенированы в ЗАО “Евроген”. Данные представлены значениями среднего арифметического \pm стандартное отклонение $M \pm SD$ (при уровне значимости доверительного интервала $p \leq 0.01$). Статистический анализ изменений содержания мРНК титина и обскурина проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 1 представлены результаты, показывающие сезонные изменения содержания мРНК титина в сердечной и скелетной мышцах длиннохвостого суслика. Обнаружено уменьшение (на 28%, $p \leq 0.01$) содержания мРНК титина в левом желу-

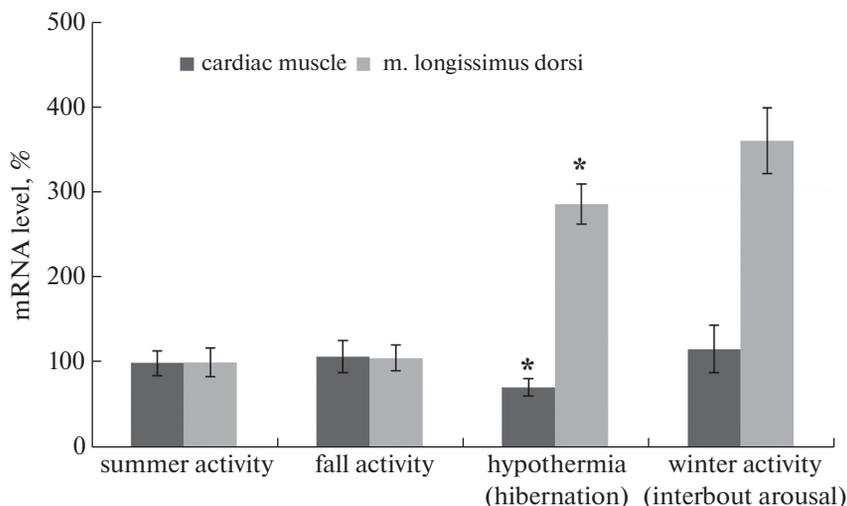


Рис. 1. Сезонные изменения содержания мРНК титина в поперечнополосатых мышцах длиннохвостого суслика. Указаны группы: летняя активность, осенняя активность, гипотермия (спячка), зимняя активность. *различия по сравнению с контрольной группой (летняя активность) статистически значимы при $p \leq 0.01$. Значения представлены как $M \pm SD$, $n = 5$.

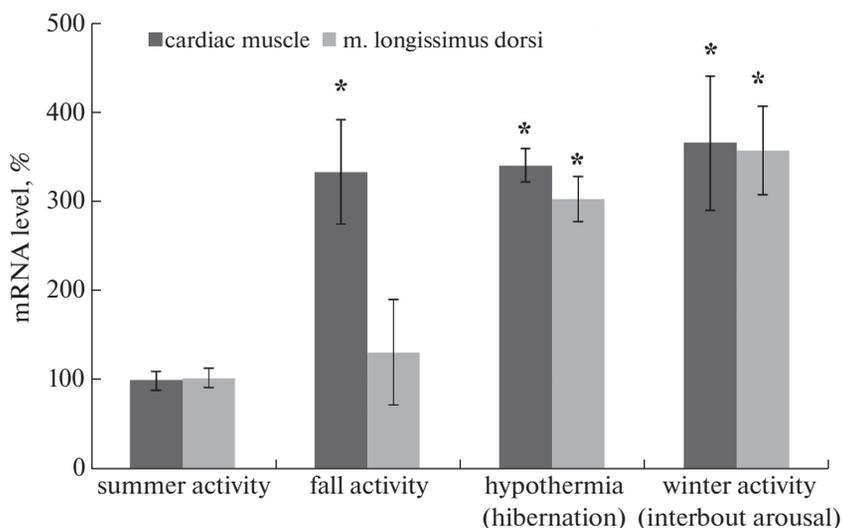


Рис. 2. Сезонные изменения содержания мРНК обскурина в поперечно-полосатых мышцах длиннохвостого суслика. Указаны группы: летняя активность, осенняя активность, гипотермия (спячка), зимняя активность. *различия по сравнению с контрольной группой (летняя активность) статистически значимы при $p \leq 0.01$. Значения представлены, как $M \pm SD$, $n = 5$.

дочке сердца сусликов группы “гипотермия”. В трех других группах статистически значимых различий в этом параметре не выявлено. В скелетной мышце сусликов из групп “гипотермия” и “зимняя активность” наблюдалось увеличение в 2.9 раза ($p \leq 0.01$) и в 3.6 раза ($p \leq 0.01$), соответственно, содержания мРНК титина. Статистически значимых различий в этом параметре между группами “летняя активность” и “осенняя активность” не выявлено.

На рис. 2 представлены результаты, показывающие сезонные изменения содержания мРНК обскурина в сердечной мышце и m. longissimus dorsi длиннохвостого суслика. Содержание мРНК обскурина было повышено в 3.4–3.6 раза ($p \leq 0.01$) в левом желудочке сердца сусликов из групп “осенняя активность”, “гипотермия”, “зимняя активность” и в 3.0 и 3.6 раза ($p \leq 0.01$) в скелетной мышце сусликов из групп гипотермия” и “зимняя активность” соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Первое наше предположение об увеличении содержания мРНК титина в исследуемых мышцах в период “осенней” активности не подтвердилось, хотя мы ожидали выявить подобные изменения, особенно в скелетной мышце. В скелетных мышцах многих гибернантов обнаружены так называемые “fast-to-slow” изменения, приводящие к увеличению доли “медленных” волокон (содержащих преимущественно изоформу I типа тяжелой цепи миозина (ТЦМ)) и уменьшению доли “быстрых” волокон (содержащих преимущественно изоформы II типа ТЦМ) в период гибернации [23]. У длиннохвостого суслика подобная трансформация миозинового фенотипа в скелетных мышцах зарегистрирована в период “осенней” активности [24]. Известно также, что в скелетно-мышечных волокнах, содержащих “медленную” изоформу I ТЦМ, экспрессируются более длинные изоварианты N2A-изоформы титина, тогда как в “быстрых” волокнах – более короткие изоварианты N2A-титина. Учитывая это и полученные нами ранее данные об изменениях изоформного состава как титина [9], так и ТЦМ [24] в скелетных мышцах длиннохвостого суслика в период “осенней” активности, мы ожидали обнаружить увеличение содержания мРНК титина в этот период. Подобный результат мы ожидали получить и для сердечной мышцы “осенних” сусликов. Однако увеличения содержания мРНК титина ни в скелетной мышце (*m. longissimus dorsi*), ни в левом желудочке сердца длиннохвостого суслика в период “осенней” активности не было обнаружено. Эти данные позволяют сделать предположение об одинаковой эффективности трансляции как более коротких, так и более длинных изоформ титина.

Второе наше предположение, касающееся увеличения содержания мРНК титина в исследуемых мышцах сусликов в период гипотермии (спячки), нашло подтверждение для скелетной мышцы. При относительно незначительном уменьшении (на ~1/4) содержания мРНК титина в сердечной мышце гипотермных сусликов, в скелетной мышце наблюдалось увеличение (почти в 3 раза) содержания мРНК этого гигантского белка. По всей вероятности, эффективность молекулярных механизмов, стабилизирующих мРНК и защищающих ее от деградации в период торпора [16, 17, 25], выше не в сердечной, а в скелетных мышцах, в частности, в *m. longissimus dorsi*, сократительная активность которой подавлена полностью. Кроме того, температура скелетных мышц во время спячки, как известно, на несколько градусов ниже температуры функционирующей сердечной мышцы, что может быть дополнительным фактором, уменьшающим деградацию мРНК вследствие более сильного ингибирования активности РНКаз.

Третье наше предположение также подтвердилось. В частности, обнаружено не только поддержание стабильно повышенного уровня мРНК титина, но и его увеличение в *m. longissimus dorsi* длиннохвостого суслика в период “зимней” активности. В этот период в поперечно-полосатых мышцах длиннохвостого суслика, в том числе в *m. longissimus dorsi*, наблюдается преимущественный синтез гигантских белков саркомерного цитоскелета, в частности, титина [12], что приводит к восстановлению содержания этого белка, уменьшенного во время спячки. При этом в период “зимней” активности происходит и процесс быстрого обновления/оборота (turnover) титина, на что указывает увеличение содержания протеолитических T2-фрагментов, уменьшение содержания которых (в 1.5–2 раза) также зарегистрировано в мышцах длиннохвостого суслика в период гипотермии (спячки) [12, 14]. Такие адаптационные изменения способствуют сохранению высокоупорядоченной структуры саркомеров и поддержанию нормальной сократительной активности мышц, атрофированных в период спячки. Увеличенное содержание мРНК титина в *m. longissimus dorsi* соответствует повышенным “запросам” синтетического аппарата мышцы и будет способствовать увеличению трансляции титина в этот период. Изменения, направленные на восстановление нормального содержания титина, а также его обновление, происходят и в сердечной мышце “зимних” активных сусликов [12]. При этом, как показано нами в текущем исследовании, происходит восстановление и даже незначительное увеличение содержания мРНК в левом желудочке сердца сусликов вышеуказанной группы (рис. 1). Полученные результаты свидетельствуют о дифференциальной экспрессии мРНК титина в исследованных поперечно-полосатых мышцах, в особенности в *m. longissimus dorsi*, у длиннохвостого суслика.

Обсуждая результаты по обскурина, отметим, что все наши предположения нашли подтверждения. В частности, мы обнаружили трехкратное и более увеличение содержания мРНК обскурина в сердечной мышце сусликов трех экспериментальных групп (“осенняя активность”, “гипотермия”, “зимняя активность”), а также в скелетной мышце этих животных из групп “гипотермия” и “зимняя активность”.

Обскурин (“obscure” – неизвестный, неясный) – гигантский белок семейства титина – семейства белков, экспрессирующихся в поперечно-полосатых мышцах позвоночных и беспозвоночных животных и состоящих преимущественно из Ig- и Fn3-доменов, одного или двух киназных доменов, а также содержащих уникальные упруго-эластичные или сигнальные домены [19, 20, 26, 27]. В поперечно-полосатых мышцах млекопитающих обскурин был открыт 21 год назад [28]. Как и титин, обскурин кодируется одним геном и подвергается

альтернативному сплайсингу, вследствие которого экспрессируются более длинные (~720–970 кДа) и более короткие (~40–500 кДа) изоформы этого белка [20, 27]. Показано, что в саркомере обскурина локализуется в М-линии, Z-диске и в А/І-зоне [20, 29]. Обнаружена локализация обскурина во вставочных дисках кардиомиоцитов, в костмерах, саркоплазматическом ретикулуме, а также в ядре [20]. Считается, что обскурина, в отличие от титина, участвующего в формировании длины толстых нитей и продольных размеров саркомеров, определяет поперечные размеры саркомеров и мышечных волокон в целом. Кроме этого, обсуждается участие обскурина в миофибриллогенезе, сборке толстых нитей и поддержании кальциевого гомеостаза [19, 20]. Взаимодействие обскурина с титином в саркомере [29] и участие обскурина во встраивании титина в Z-диск [30] свидетельствуют о тесной структурной и функциональной взаимосвязи этих двух гигантских белков. Обсуждается сопряженное участие этих белков, формирующих в районе Z-диска/І-зоны саркомера упруго-эластичный комплекс, в регуляции процессов внутриклеточной сигнализации [29].

Полученные нами данные свидетельствуют о сопряженных изменениях титина и обскурина в поперечно-полосатых мышцах длиннохвостого суслика в периоды “осенней” и “зимней” активности. Можно предположить, что в эти периоды происходит не только обновление обскурина и восстановление возможно уменьшенного при спячке содержания этого белка, но и синтез его новых изоформ, участвующих совместно с более длинными изоформами титина в реконструкции трехмерного упруго-эластичного каркаса. Нельзя исключить, что при этом происходит увеличение содержания обскурина — больше такового, имеющегося в мышцах “летних” активных (контрольных) животных. В пользу этого предположения можно привести следующие данные. Обскурина, несмотря на то что считается миофибрилярным белком, взаимодействует не только с белками саркомеров, но и с белками саркоплазматического ретикулума, а также субсарколеммальными белками, участвуя, тем самым, в поддержании целостности сарколеммы [20, 31–33]. Согласно исследованию [34], содержание несаркомерных белков (субсарколеммальных, белков костмеров), которые не участвуют в формировании высокоупорядоченной саркомерной структуры с четко выверенной белковой стехиометрией, может увеличиваться в мышцах. В частности, Chopard и соавт. [34] зарегистрировали значительное увеличение содержания дисферлина и белков костмера в двух скелетных мышцах человека после 84-суточного длительного постельного режима. Учитывая эти данные, можно предположить, что обнаруженное нами повышенное содержание мРНК обскурина в поперечнополосатых мышцах сусликов в период “осенней” и “зимней”

активности будет приводить к увеличению содержания этого белка. Адаптационное значение подобных изменений, наряду с изменениями в титине, может заключаться в поддержании структурной целостности мышечных клеток, а также обеспечении необходимого уровня сократительной активности мышц в разные фазы гибернационного цикла: вход в спячку, спячка, выход из спячки, межбаутная/ “зимняя” активность.

Итак, мы впервые получили данные о дифференциальной экспрессии мРНК титина и обскурина в сердечной и скелетной (*m. longissimus dorsi*) мышцах истинного гибернанта длиннохвостого суслика. В совокупности с полученными нами ранее данными [9], новые результаты позволяют говорить о сопряженных изменениях изоформного состава и содержания титина и обскурина — двух гигантских белков, участвующих в формировании и поддержании высокоупорядоченной структуры миофибрилл, целостности сарколеммы и мышцы в целом, а также играющих важную роль в регуляции процессов внутриклеточной сигнализации. В связи с этим будущие исследования изменений изоформного состава и содержания обскурина в мышцах гибернантов с целью выяснения роли этих изменений являются перспективной научной задачей.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-04-00204).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Ю.В.Г. и И.М.В.), сбор данных (Ю.В.Г., С.С.П., А.М.Е.), обработка данных (Ю.В.Г., Г.З.М., М.А.Г., И.М.В.), написание и редактирование манускрипта (Ю.В.Г., Г.З.М., Л.Г.Б., Н.М.З., И.М.В.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Brauch KM, Dhruv ND, Hanse EA, Andrews MT* (2005) Digital transcriptome analysis indicates adaptive mechanisms in the heart of a hibernating mammal. *Physiol Genomics* 23 (2): 227–234. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00076.2005>
2. *Williams DR, Epperson LE, Li W, Hughes MA, Taylor R, Rogers J, Martin SL, Cossins AR, Gracey AY* (2005) Seasonally hibernating phenotype assessed through transcript screening. *Physiol Genomics* 24 (1): 13–22. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00301.2004>

3. Yan J, Barnes BM, Kohl F, Marr TG (2008) Modulation of gene expression in hibernating arctic ground squirrels. *Physiol Genomics* 32 (2): 170–181. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00075.2007>
4. Hampton M, Melvin RG, Kendall AH, Kirkpatrick BR, Peterson N, Andrews MT (2011) Deep sequencing the transcriptome reveals seasonal adaptive mechanisms in a hibernating mammal. *PLoS One* 6 (10): e27021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027021>
5. Vermillion KL, Anderson KJ, Hampton M, Andrews MT (2015) Gene expression changes controlling distinct adaptations in the heart and skeletal muscle of a hibernating mammal. *Physiol Genomics* 47 (3): 58–74. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00108.2014>
6. Bogren LK, Grabek KR, Barsh GS, Martin SL (2017) Comparative tissue transcriptomics highlights dynamic differences among tissues but conserved metabolic transcript prioritization in preparation for arousal from torpor. *J Comp Physiol B* 187: 735–748. <https://doi.org/10.1007/s00360-017-1073-x>
7. Chang H, Jiang S, Ma X, Peng X, Zhang J, Wang Z, Xu S, Wang H, Gao Y (2018) Proteomic analysis reveals the distinct energy and protein metabolism characteristics involved in myofiber type conversion and resistance of atrophy in the extensor digitorum longus muscle of hibernating Daurian ground squirrels. *Comp Biochem Physiol Part D: Genomics Proteomics* 26: 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2018.02.002>
8. Andrews MT (2019) Molecular interactions underpinning the phenotype of hibernation in mammals. *J Exp Biol* 222 (2): jeb160606. <https://doi.org/10.1242/jeb.160606>
9. Vikhlyantsev IM, Karaduleva EV, Podlubnaya ZA (2008) Seasonal changes in the composition of titin isoforms in muscles of hibernating ground squirrels. *Biophysics* 53: 598–603. <https://doi.org/10.1134/S0006350908060249>
10. Salmov NN, Vikhlyantsev IM, Ulanova AD, Gritsyna YV, Bobylev AG, Saveljev AP, Makariushchenko VV, Maksudov GY, Podlubnaya ZA (2015) Seasonal changes in isoform composition of giant proteins of thick and thin filaments and titin (connectin) phosphorylation level in striated muscles of bears (*Ursidae*, *Mammalia*). *Biochemistry (Mosc)* 80 (3): 343–355. <https://doi.org/10.1134/S0006297915030098>
11. Salmov NN, Gritsyna YV, Ulanova AD, Vikhlyantsev IM, Podlubnaya ZA (2015) On the role of titin phosphorylation in the development of muscular atrophy. *Biophysics* 60: 684–686. <https://doi.org/10.1134/S0006350915040193>
12. Popova S, Ulanova A, Gritsyna Y, Salmov N, Rogachevsky V, Mikhailova G, Bobylev A, Bobyleva L, Yutskevich Y, Morenkov O, Zakharova N, Vikhlyantsev I (2020) Predominant synthesis of giant myofibrillar proteins in striated muscles of the long-tailed ground squirrel *Urocyonax undulatus* during interbout arousal. *Sci Rep* 10 (1): 15185. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72127-y>
13. Popova SS, Yurshenas DA, Mikhailova GZ, Bobyleva LG, Salmov NN, Tyapkina OV, Nurullin LF, Gazizova GR, Nigmatzyanov IR, Gusev OA, Zakharova NM, Vikhlyantsev IM (2021) Stable Level of Giant Sarcomeric Cytoskeletal Proteins in Striated Muscles of the Edible Dormouse *Glis glis* during Hibernation. *J Evol Biochem Phys* 57: 886–895. <https://doi.org/10.1134/S0022093021040128>
14. Vikhlyantsev IM, Podlubnaya ZA (2012) New titin (connectin) isoforms and their functional role in striated muscles of mammals: facts and suppositions. *Biochemistry (Mosc)* 77 (13): 1515–1535. <https://doi.org/10.1134/S0006297912130093>
15. Loescher CM, Hobbach AJ, Linke WA (2021) Titin (TTN): from molecule to modifications, mechanics and medical significance. *Cardiovasc Res* cvab328. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab328>
16. Knight JE, Narus EN, Martin SL, Jacobson A, Barnes BM, Boyer BB (2000) mRNA stability and polysome loss in hibernating Arctic ground squirrels (*Spermophilus parryii*). *Mol Cell Biol* 20 (17): 6374–6379. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.17.6374-6379.2000>
17. Grabek KR, Diniz Behn C, Barsh GS, Hesselberth JR, Martin SL (2015) Enhanced stability and polyadenylation of select mRNAs support rapid thermogenesis in the brown fat of a hibernator. *eLife* 4: e04517. <https://doi.org/10.7554/eLife.04517>
18. van Breukelen F, Martin SL (2002) Reversible depression of transcription during hibernation. *J Comp Physiol B* 172 (5): 355–361. <https://doi.org/10.1007/s00360-002-0256-1>
19. Kontrogianni-Konstantopoulos A, Ackermann MA, Bowman AL, Yap SV, Bloch RJ (2009) Muscle giants: molecular scaffolds in sarcomerogenesis. *Physiol Rev* 89 (4): 1217–1267. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2009>
20. Manning HR, Carter OA, Ackermann MA (2017) Obscure functions: the location-function relationship of obscurins. *Biophys Rev* 9 (3): 245–258. <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0254-x>
21. Захарова Н (2014). Некоторые особенности разогрева гибернирующих сусликов *Spermophilus undulatus* при вызванном пробуждении. *Фундамент исслед* 6: 1401–1405. [Zakharova NM (2014) Some features of body warming at provoked awakening of hibernating ground squirrels *Spermophilus undulatus*. *Fundament Issled* 6: 1401–1405. (In Russ)].
22. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C (T)) Method *Methods* 25 (4): 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
23. Cotton CJ (2016) Skeletal muscle mass and composition during mammalian hibernation. *J Exp Biol* 219 (2): 226–234. <https://doi.org/10.1242/jeb.125401>
24. Lazareva MV, Trapeznikova KO, Vikhlyantsev IM, Bobylev AG, Klimov AA, Podlubnaya ZA (2012) Seasonal changes in the isoform composition of the myosin heavy chains in skeletal muscles of hibernating ground squirrels *Spermophilus undulatus*. *Biophysics* 57: 764–768. <https://doi.org/10.1134/S0006350912060085>
25. Morin P Jr, Storey KB (2009) Mammalian hibernation: differential gene expression and novel application of epigenetic controls. *Int J Dev Biol* 53 (2–3): 433–442. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19412897/>
26. Benian GM, Mayans O (2015) Titin and obscurin: giants holding hands and discovery of a new Ig domain subset. *J*

- Mol Biol 427 (4): 707–714.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.12.017>
27. *Ackermann MA, Shriver M, Perry NA, Hu LY, Kontrogianni-Konstantopoulos A* (2014) Obscurins: Goliaths and Davids take over non-muscle tissues. *PLoS One* 9 (2): e88162.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190842>
28. *Young P, Ehler E, Gautel M* (2001) Obscurin, a giant sarcomeric Rho guanine nucleotide exchange factor protein involved in sarcomere assembly. *J Cell Biol* 154 (1): 123–136.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200102110>
29. *Bang ML, Centner T, Fornoff F, Geach AJ, Gotthardt M, McNabb M, Witt CC, Labeit D, Gregorio CC, Granzier H, Labeit S* (2001) The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system. *Circ Res* 89 (11): 1065–10672.
<https://doi.org/10.1161/hh2301.100981>
30. *Bowman AL, Catino DH, Strong JC, Randall WR, Kontrogianni-Konstantopoulos A, Bloch RJ* (2008) The rho-guanine nucleotide exchange factor domain of obscurin regulates assembly of titin at the Z-disk through interactions with Ran binding protein 9. *Mol Biol Cell* 19 (9): 3782–3792.
<https://doi.org/10.1091/mbc.e08-03-0237>
31. *Bagnato P, Barone V, Giacomello E, Rossi D, Sorrentino V* (2003) Binding of an ankyrin-1 isoform to obscurin suggests a molecular link between the sarcoplasmic reticulum and myofibrils in striated muscles. *J Cell Biol* 160 (2): 245–253.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200208109>
32. *Kontrogianni-Konstantopoulos A, Jones EM, Van Rossum DB, Bloch RJ* (2003) Obscurin is a ligand for small ankyrin 1 in skeletal muscle. *Mol Biol Cell* 14 (3): 1138–1148.
<https://doi.org/10.1091/mbc.e02-07-0411>
33. *Randazzo D, Giacomello E, Lorenzini S, Rossi D, Pierantozzi E, Blaauw B, Reggiani C, Lange S, Peter AK, Chen J, Sorrentino V* (2013) Obscurin is required for ankyrinB-dependent dystrophin localization and sarcolemma integrity. *J Cell Biol* 200 (4): 523–536.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201205118>
34. *Chopard A, Arrighi N, Carnino A, Marini JF* (2005) Changes in dysferlin, proteins from dystrophin glycoprotein complex, costameres, and cytoskeleton in human soleus and vastus lateralis muscles after a long-term bedrest with or without exercise. *FASEB J* 19 (12): 1722–1724.
<https://doi.org/10.1096/fj.04-3336fje>

Differential Expression of Titin and Obscurin mRNA In Striated Muscles of the Long-Tailed Ground Squirrel *Urocitellus Undulatus*

Yu. V. Gritsyna^a, M. A. Grabarskaya^a, G. Z. Mikhailova^a, S. S. Popova^a, L. G. Bobyleva^a, A. M. Ermakov^a, N. M. Zakharova^b, and I. M. Vikhlyantsev^{a,#}

^a Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, Russia

^b Institute of Cell Biophysics, FRC PSCBR, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, Russia

[#]e-mail: ivanvikhlyantsev@gmail.com

Seasonal changes in mRNA levels of the giant sarcomeric cytoskeletal proteins titin and obscurin were studied in the skeletal m. longissimus dorsi and the cardiac (left ventricular) muscle in the long-tailed ground squirrel *Urocitellus undulatus* using real-time RT-PCR. The animals were divided into the following experimental groups: “summer activity”, “fall activity”, “hypothermia” (hibernation), “winter activity” ($n = 5$ per group). In the cardiac muscle of “hypothermia” animals, titin mRNA levels decreased by 28% ($p \leq 0.01$); in the other three groups, no statistically significant differences in this parameter were found. In m. longissimus dorsi of “hypothermia” and “winter activity” animals, titin mRNA levels increased by 2.9 ($p \leq 0.01$) and 3.6 ($p \leq 0.01$) times, respectively, with no statistically significant differences in this parameter in “summer activity” and “fall activity” animals. Obscurin mRNA levels increased by 3.4–3.6 times ($p \leq 0.01$) in the cardiac muscle of “fall activity”, “hypothermia” and “winter activity” animals, and by 3.0 and 3.6 times ($p \leq 0.01$) in the skeletal muscle of “hypothermia” and “winter activity” animals, respectively. Thus, we report here for the first time the data on the differential expression of titin and obscurin mRNAs, indicating concerted changes in these giant cytoskeletal proteins in muscles of the long-tailed ground squirrel during hibernation. The results are discussed in the context of striated muscle adaptation to hibernation in the long-tailed ground squirrel.

Keywords: *Urocitellus undulatus*, hibernation, m. longissimus dorsi, cardiac muscle, titin, obscurin, mRNA, differential gene expression

ВЛИЯНИЕ ДОНОРА ОКСИДА АЗОТА S-НИТРОЗОГЛУТАТИОНА НА ЭКСПРЕССИЮ КОНСТИТУТИВНОГО АНДРОСТАНОВОГО РЕЦЕПТОРА

© 2022 г. Ю. В. Абаленихина^{1,*}, Е. А. Судакова¹,
А. А. Сеидкулиева¹, А. В. Щулькин¹, Е. Н. Якушева¹

¹ Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, Рязань, Россия

*e-mail: abalenihtina88@mail.ru

Поступила в редакцию 08.04.2022 г.

После доработки 23.06.2022 г.

Принята к публикации 16.07.2022 г.

Настоящая работа посвящена изучению механизмов регуляции конститутивного андростанового рецептора (CAR) при воздействии донора оксида азота (NO) S-нитрозоглутатиона (GSNO) *in vitro*. Исследование выполнено на клетках линии Caco-2, которые инкубировали в питательной среде в присутствии S-нитрозоглутатиона (диапазон концентраций 1–500 мкМ) в течение 3, 24 и 72 ч. Относительное количество CAR оценивали методом вестерн-блот. В работе показано, что кратковременное воздействие донора NO GSNO в течение 3 и 24 ч в концентрациях 1–500 мкМ не влияло на количество CAR, а при экспозиции 72 ч с GSNO в концентрациях 1, 10 и 50 мкМ отмечалось его увеличение. Доказано, что повышение относительного количества CAR при воздействии низких концентраций GSNO (1 мкМ) реализуется через NO-цГМФ-сигнальный путь. При увеличении концентрации GSNO до 10 и 50 мкМ отмечается развитие нитрозативного стресса и регуляция CAR осуществляется через битирозин. Прогрессирование нитрозативного стресса (концентрация GSNO 100 и 500 мкМ) приводит к снижению относительного количества CAR, предположительно, вследствие повреждения его молекулы.

Ключевые слова: конститутивный андростановый рецептор, нитрозативный стресс, оксид азота, битирозин, гуанилатциклаза

DOI: 10.31857/S0044452922050023

Конститутивный андростановый рецептор (CAR) – член суперсемейства ядерных рецепторов (NR113 – Nuclear Receptor Subfamily 1, Group 1, Member 3, семейство орфановые рецепторы) [1], регулирующий экспрессию целевых генов и принимающий участие в защите организма от ксенобиотиков.

CAR главным образом экспрессируется в гепатоцитах и энтероцитах тонкого кишечника, где регулирует биотрансформацию лекарственных веществ [2]. Низкий уровень базальной экспрессии CAR обнаружен также в скелетных и сердечной мышцах, ткани почек и головном мозге [3, 4].

CAR в виде комплекса с шаперонами (HSP90, HSP70, HSP60) конститутивно локализуется в цитозоле клеток [5]. Взаимодействие с лигандами приводит к диссоциации CAR от шаперонов, транслокации рецептора в ядро, где он в виде гетеродимера с рецептором ретиноевой кислоты (RXR) запускает транскрипцию таргетных генов [6].

Долгое время считалось, что основной функцией CAR является индукция ферментов детоксикации ксенобиотиков в микросомальной цепи окисления – CYP2B, CYP2C, CYP3A, а также ферментов второй фазы биотрансформации ури-

диндифосфат глюкуронозилтрансферазы, сульфотрансферазы [7, 8]. Новые экспериментальные данные указывают на то, что функции CAR гораздо шире, чем рецептор ксенобиотиков. Показано, что CAR может принимать участие в обмене желчных кислот, билирубина, жирных кислот, стероидных гормонов, метаболизме глюкозы [9]. В связи с этим актуальным представляется изучение вопросов регуляции CAR.

Оксид азота (NO) выступает в качестве важного внутриклеточного мессенджера. Физиологической мишенью для NO является растворимая гуанилатциклаза (pГЦ) [10], которая при активации увеличивает внутриклеточную концентрацию циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ), в результате чего активируется протеинкиназа G, кальций-кальмодулинзависимая протеинкиназа в клетках головного мозга [11] и MAP-киназа фибробластов [12].

Эндогенный NO участвует во многих жизненно важных процессах, являясь универсальным и необходимым регулятором функций клеточного метаболизма. NO ингибирует агрегацию и адгезию тромбоцитов [13], миграцию лейкоцитов [14], участвует в регуляции тонуса кровеносных сосудов

[15], деятельности органов дыхания [16], желудочно-кишечного тракта [17] и мочеполовой системы [18], кроме этого NO играет важную роль в нейротрансмиссии [16, 17, 19] и в формировании иммунного ответа [20].

Известно, что NO отличается высокой реакционной способностью, благодаря наличию неспаренного электрона на внешней π -орбитали [21]. Основным продуктом окисления азота являются химически инертные нитратные ионы, способные вновь превращаться в NO [22]. При взаимодействии NO с супероксид-анион радикалом образуется пероксинитрит, который оказывает не только токсическое действие, взаимодействуя с липидами, белками и ДНК, но и регуляторное, влияя на активность киназ (протеинкиназа В и С, фосфоинозид-3-киназа, митоген-активируемые протеинкиназы и др.).

Одним из продуктов нитрозативного стресса является битирозин, который образуется в результате взаимодействия пероксинитрита с тирозином. Битирозин выступает не только в качестве маркера нитрозативного стресса, но также выполняет функции сигнальной молекулы [23].

Таким образом, NO как через цГМФ-сигнальный путь, так и через продукты нитрозативного стресса (например, битирозин) может оказывать регуляторное воздействие, в том числе и на CAR.

Цель исследования – изучить влияние донора оксида азота S-нитрозоглутатиона на изменение экспрессии CAR и установить возможный механизм регуляции.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на линии клеток аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2) (ЦКП “Коллекция культур клеток позвоночных”, Российская Федерация). Культивирование клеток проводили в инкубаторе WS-189C (“World Science”, Корея) при 37°C и 5%-ном содержании CO₂, в среде Игла, модифицированной Дульбекко, (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л), с добавлением L-глутамин (4 мМ), 15% эмбриональной бычьей сыворотки, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (все компоненты “Sigma-Aldrich”, Германия).

Культивирование клеток осуществляли в 96-луночном планшете (“Corning”, США) для определения жизнеспособности клеток и 6-луночных планшетах (“Corning”, США) для оценки биохимических показателей в течение 21 суток, так как при этом сроке происходит их спонтанная дифференцировка в энтероцитоподобные клетки, экспрессирующие CAR [24].

Исследование было выполнено в три этапа:

Первый этап – оценка влияния донора оксида азота на относительное количество CAR в клетках

линии Caco-2, включал в себя две серии экспериментов:

1.1. Контрольная серия – клетки, которые инкубировали в питательной среде без добавления тестируемых веществ.

1.2. Опытная серия – S-нитрозоглутатион (GSNO, “Sigma-Aldrich”, Германия) добавляли в культуральную среду в конечных концентрациях 1, 10, 50, 100 и 500 мкМ и инкубировали в течение 3, 24 и 72 ч. При инкубации 72 ч смену питательной среды проводили каждые 24 ч.

Второй этап – изучение роли NO-цГМФ-сигнального пути в регуляции CAR, включал в себя три серии экспериментов:

2.1. Контрольная серия – клетки инкубировали в питательной среде с добавлением этанола (растворитель ODQ) в конечной концентрации 0.0001% в течение 72 ч.

2.2. Ингибирование NO-цГМФ-сигнального пути. В качестве ингибитора растворимой гуанилатциклазы использовали – 1H-[1,2,4]оксадиазоло-[4,3-a]хиноксалин-1-он (ODQ, “Sigma Aldrich”, Германия). Клетки инкубировали в питательной среде с добавлением ODQ в концентрации 10 мкМ в течение 72 ч [25].

2.3. Индукция CAR под действием GSNO – клетки инкубировали в культуральной среде, содержащей этанол в конечной концентрации 0.0001%, с добавлением GSNO (“Sigma-Aldrich”, Германия) в конечной концентрации 10 мкМ в течение 72 ч.

2.4. Влияние GSNO на количество CAR в условиях ингибирования рГЦ – клетки инкубировали с GSNO в концентрациях 1 и 10 мкМ, повышающих уровень CAR, совместно с ODQ в концентрации 10 мкМ в течение 72 ч [25]. Ингибитор добавляли в питательную среду за 30 мин до внесения GSNO.

Третий этап – оценка влияния продукта нитрозативного стресса – битирозина на относительное количество CAR в клетках линии Caco-2, включала две серии опытов.

3.1. Контрольная серия – клетки, которые инкубировали с питательной средой без добавления тестируемого вещества.

3.2. Опытная серия – битирозин (“Cambridge Isotope Laboratories”, Франция) добавляли к клеткам линии Caco-2 в концентрациях 0.2; 0.4; 1 и 1.5 мМ и инкубировали в течение 72 ч. Смену питательной среды проводили каждые 24 ч.

На каждый эксперимент в каждой временной точке и концентрации было выполнено по 3 повторения ($n = 3$).

Получение клеточных лизатов. После завершения экспериментов с клетками их снимали с лунок раствором, состоящим из 0.25% трипсина и 0.2% ЭДТА (“Sigma-Aldrich”, Германия).

Клетки в количестве 1×10^6 промывали фосфатным буфером pH 7.4 (“BioRad”, США). Далее ли-

зировали ледяным буфером в объеме 150 мкл. Состав лизирующего буфера: 50 mM трис-НСI (рН 7.4), 150 mM КСI, 0.5% тритон X-100, смесь ингибиторов протеиназ (“Sigma-Aldrich”, Германия). Полученную клеточную суспензию встряхивали на шейкере и инкубировали на льду в течение 10 мин. Затем центрифугировали при 5000 g (СМ-50, “Eppendorf”, Германия) 10 мин. Цитоплазматическую фракцию переносили в отдельные пробирки и использовали для определения биохимических показателей.

Определение уровня метаболитов оксида азота (суммарная концентрация нитратов и нитритов, NOx) проводили фотоколориметрическим методом с использованием реактива Грисса (“Нева Реактив”, Россия) и хлорида ванадия (III) (“Acros organics”, Франция). Интенсивность окраски определяли на микропланшетном анализаторе Stat Fax 2100 (“Awareness Technology”, США) при длине волны 540 нм [26]. Концентрацию NOx рассчитывали по калибровочному графику, для построения которого использовали NaNO₃.

Уровень пероксинитрита анализировали по интенсивности светопоглощения при длине волны 302 нм СФ 2000 (“ОКБ-спектр”, Россия). Концентрацию рассчитывали с использованием молярного коэффициента 1670 M⁻¹ см⁻¹ [27].

Определение концентрации битирозина осуществляли по интенсивности флуоресценции образца в фосфатном буфере (рН 7.4) при длине волны возбуждения (экстинкция) 325 нм и длине волны испускания (эмиссия) 415 нм на спектрофлуориметре Shimadzu RF-6000 (“Shimadzu Corporation”, Япония) [28].

Концентрацию метаболитов оксида азота, пероксинитрита и битирозина выражали в нмоль/мг белка.

Количество белка в пробах анализировали методом Бредфорда (Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit, “ThermoFisher”, США) [29].

Определение количества CAR в клетках линии Сасо-2 проводили методом вестерн-блот.

После окончания экспозиции клетки снимали с лунок раствором трипсин-ЭДТА (“Sigma-Aldrich”, США), трижды промывали раствором фосфатного буфера (“BioRad”, США) и лизировали в NP40 Cell Lysis Buffer Thermo (“Thermo Fisher Scientific”, США) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ (“Sigma-Aldrich”, США) в течение 30 мин при

4°C и постоянном перемешивании из расчета 10⁷ клеток на 100 мкл буфера. Полученный лизат центрифугировали при 22440 g в течение 10 мин (“AvantiJXN-3, BeckmanCoulter”, США).

Супернатант подвергали электрофорезу с использованием TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit (“Bio-Rad”, США). Перед загрузкой образцы смешивали с буфером Laemmli (“Bio-Rad”, США), содержащим 50 mM β-меркаптоэтанол (“Bio-Rad”, США) в соотношении 1:3, инкубировали 5 мин при температуре 70°C. Гели прогоняли при 100 В в течение 90 мин.

Для определения относительного количества CAR методом вестерн-блот использовали первичные мышиные моноклональные антитела (MB67 CAR Monoclonal Antibody, “Invitrogen”, США) в концентрации 1:200. Визуализацию первичных антител осуществляли с использованием вторичных кроличьих антител (Rabbit anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP, “Invitrogen”, США) в разведении 1:4000. Белки визуализировали хемилюминесценцией с помощью Chemi Doc XRS+ (“Bio-Rad”, США). Интенсивность полученных полос (бэндов) анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab (“Bio-Rad”, США). Количество CAR оценивали относительно содержания белка домашнего хозяйства GAPDH (первичные мышиные антитела GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), DyLight 68, “Invitrogen”, США разведение 1:1000, вторичные кроличьи антитела – Rabbitanti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP, “Invitrogen”, США, разведение 1:4000).

Цитотоксический тест (МТТ-тест). Клетки засеивали в 96-луночный планшет из расчета 10⁴ клеток на каждую лунку и культивировали в течение 21 сут, затем добавляли питательную среду с GSNO. После окончания инкубации в каждую лунку добавляли по 20 мкл 0.5%-ного раствора бромида 3-(4.5-диметилтиазол-2-ил)-2.5-дифенил тетразолия (МТТ) и инкубировали в течение 2 ч, затем раствор МТТ удаляли и добавляли 200 мкл 1%-ного раствора диметилсульфоксида (“ПанЭко”, Россия) [30]. Поглощение измеряли через 10 мин при 530 нм на спектрофотометре для планшетов Stat Fax 2100 (“Awareness Technology”, США).

Жизнеспособность клеток Сасо-2 в присутствии GSNO рассчитывали по формуле:

$$\text{Жизнеспособность} = \frac{\text{ОП опытных лунок} - \text{ОП среды}}{\text{ОП контрольных лунок} - \text{ОП среды}} \times 100\%$$

где ОП – оптическая плотность.

Статистический анализ. Полученные результаты обрабатывали с помощью программного обеспече-

ния GrafPad Prism 8, Statistica 13.0 (StatSoft, Inc). Данные представлены в виде среднего арифметического значения (*M*) ± стандартное отклонение

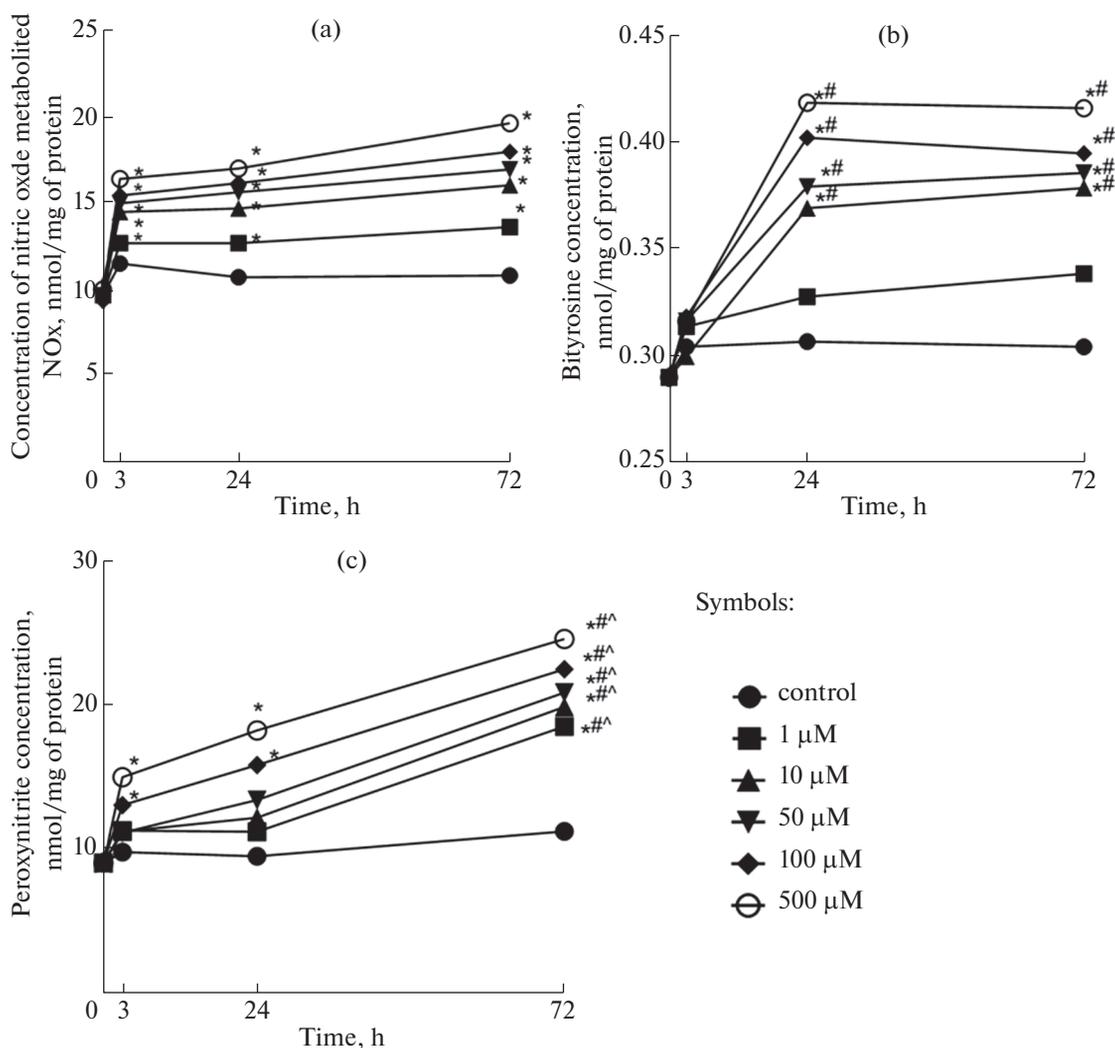


Рис. 1. Изменение уровня метаболитов оксида азота (а), битирозина (б), пероксинитрита (с) при воздействии S-нитрозоглутатиона в концентрациях 1–500 мкМ ($M, n = 3$).

* $p < 0.05$ – статистически значимые отличия от контроля; # $p < 0.05$ – статистически значимые отличия от группы 3 ч; ^ $p < 0.05$ – статистически значимые отличия от группы 24 ч (тест Фишера).

(SD). Для оценки статистической значимости различий использовали дисперсионный анализ (ANOVA), попарные сравнения осуществляли с помощью критерия Фишера. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Развитие нитрозативного стресса под действием GSNO в клетках линии Сасо-2.

Уровень метаболитов оксида азота возрастал при всех концентрациях GSNO (1–500 мкМ) и всех сроках эксперимента. Максимальные изменения наблюдались при концентрации 500 мкМ: при инкубации 3 ч – на 51.8% ($p < 0.001$) выше значений контроля, при инкубации 24 ч – на 58.9% ($p < 0.001$) и при инкубации 72 ч – на 68.5% ($p < 0.001$) (рис. 1а).

При этом концентрация не изменялась в зависимости от времени инкубации.

Выраженность нитрозативного стресса оценивали по уровню битирозина и пероксинитрита (рис. 1б, с). Содержание битирозина не изменялось при воздействии GSNO в концентрациях 1–500 мкМ в течение 3 ч. При экспозиции 24 ч и концентрации GSNO 1 мкМ содержание битирозина также не изменялось, а при концентрациях 10, 50, 100 и 500 мкМ увеличивалось на 18.3% ($p < 0.01$), 22.1% ($p < 0.01$), 29.4% ($p < 0.01$) и 34.9% ($p < 0.001$) по сравнению с контролем соответственно. При увеличении длительности воздействия до 72 ч количество битирозина при концентрации GSNO 1 мкМ не изменялось и возрастало при концентрациях 10 мкМ на 30.3% ($p < 0.01$), 50 мкМ – на 27.3% ($p < 0.01$),

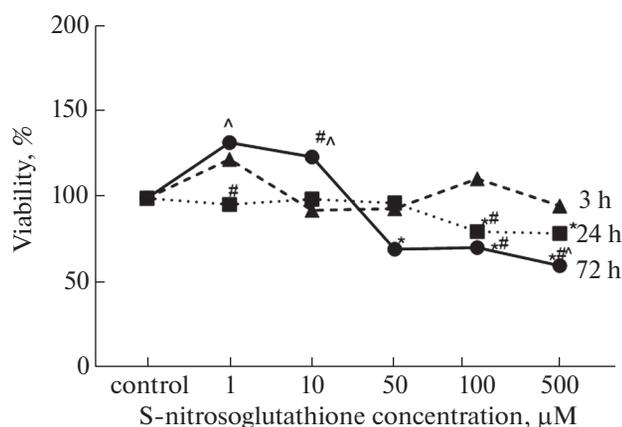


Рис. 2. Изменение жизнеспособности клеток (%) при воздействии S-нитрозоглутатиона в концентрациях 1–500 мкМ ($M, n = 3$).

* $p < 0.05$ – статистически значимые отличия от контроля; # $p < 0.05$ – статистически значимые отличия от группы 3 ч; ^ $p < 0.05$ – статистически значимые отличия от группы 24 ч (тест Фишера).

100 мкМ – на 32.6% ($p < 0.01$), 500 мкМ – на 38.3% ($p < 0.001$) (рис. 1b).

Содержание битирозина статистически значимо увеличивалось на 16.1% ($p < 0.001$) и на 24.7% ($p < 0.001$) при инкубации с GSNO в концентрации 10 мкМ в течение 24 и 72 ч соответственно относительно экспозиции 3 ч. GSNO в концентрации 50 мкМ способствовал увеличению содержания битирозина на 13.8% ($p < 0.001$) и на 13.5% ($p < 0.001$) при экспозиции 24 и 72 ч относительно инкубации 3ч, а в концентрации 100 мкМ – на 34.1% ($p < 0.001$) и 28.8% ($p < 0.001$). При использовании GSNO в концентрации 500 мкМ наблюдалось увеличение концентрации битирозина на 34.1% ($p < 0.001$) и на 30.5% ($p < 0.001$) при инкубации 24 и 72 ч соответственно относительно срока воздействия 3 ч.

При длительности экспозиции 3 ч GSNO увеличивал уровень пероксинитрита в концентрациях 100 и 500 мкМ на 68.1% ($p < 0.01$) и 92.6% ($p < 0.001$) соответственно (рис. 1с).

Аналогичные результаты были получены и при длительности эксперимента 24 ч: содержание пероксинитрита увеличивалось на 34.0% ($p < 0.05$) и 53.6% ($p < 0.01$) по сравнению с контролем соответственно. При увеличении длительности экспозиции до 72 ч содержание пероксинитрита возрастало при концентрациях GSNO 1 – 500 мкМ, максимально на 84.4% ($p < 0.001$) при концентрации 500 мкМ (рис. 1с).

Уровень пероксинитрита повышался при инкубации клеток в течение 72 ч с GSNO в концентрации 1 мкМ на 9.9% ($p < 0.001$) и на 8.9% ($p < 0.001$), 10 мкМ – на 72.9% ($p < 0.01$) и 72.9% ($p < 0.001$), 50 мкМ – на 65.9% ($p < 0.001$) и 68.6% ($p < 0.001$),

100 мкМ – на 41.8% ($p < 0.001$) и 72.3% ($p < 0.001$), 500 мкМ – на 24.3% ($p < 0.01$) и 50.0% ($p < 0.001$) относительно срока воздействия 3 и 24 ч соответственно (рис. 1с).

Цитотоксическое действие GSNO оценивалось по результатам МТТ-теста. В контрольной группе жизнеспособность клеток была принята за 100%. GSNO в концентрациях 1–500 мкМ и длительности воздействия 3 ч достоверно не влиял на жизнеспособность клеток. При воздействии GSNO в концентрациях 1–50 мкМ и длительности экспозиции 24 ч жизнеспособность клеток также не изменялась, а при концентрациях 100 и 500 мкМ снижалась до $79.9 \pm 6.7\%$ ($p < 0.05$) и $78.8 \pm 7.2\%$ ($p < 0.05$). Увеличение длительности экспозиции до 72 ч приводило к снижению жизнеспособности до $68.4 \pm 11.4\%$ ($p < 0.001$), $69.5 \pm 6.1\%$ ($p < 0.001$) и $50.9 \pm 7.5\%$ ($p < 0.001$) при концентрации GSNO 50, 100 и 500 мкМ соответственно (рис. 2).

При анализе результатов в зависимости от срока инкубации были получены следующие результаты. GSNO в концентрации 100 мкМ при длительности экспозиции 24 и 72 ч снижал выживаемость клеток на 28.6% ($p < 0.05$) и на 37.9% ($p < 0.01$) относительно инкубации 3 ч, а в концентрации 500 мкМ и длительности воздействия 72 ч на 46.3% ($p < 0.001$) и на 35.4% ($p < 0.05$) относительно 3 и 24 ч экспозиции.

Таким образом, полученные данные подтверждают, что GSNO является донором NO, причем концентрации 100 и 500 мкМ при длительности экспозиции 24 ч и 50, 100 и 500 мкМ при длительности воздействия 72 ч являются токсичными для клеток линии Сасо-2 [31].

Влияние GSNO на количество CAR в клетках линии Сасо-2. При воздействии GSNO на клетки линии Сасо-2 в течение 3 и 24 ч количество CAR достоверно по сравнению с контролем не изменялось (рис. 3).

При культивировании клеток линии Сасо-2 с GSNO в концентрациях 1, 10 и 50 мкМ в течение 72 ч количество CAR статистически значимо увеличивалось по сравнению с контролем на 25.5% ($p < 0.05$), на 47.9% ($p < 0.001$) и 18.7% ($p < 0.05$) соответственно. При повышении концентрации донора NO до 100 и 500 мкМ наблюдалось снижение количества транскрипционного фактора на 27.5% ($p < 0.01$) и на 38.8% ($p < 0.001$) соответственно относительно контрольных значений (рис. 3).

Изучение роли NO-цГМФ-сигнального пути в регуляции CAR.

При изучении роли NO-цГМФ-сигнального пути в регуляции CAR при воздействии GSNO в течение 72 ч были получены следующие результаты.

Ингибитор рГЦ ODQ в концентрации 10 мкМ и спирт (растворитель ODQ) не влияли на относительное количество CAR (рис. 4).

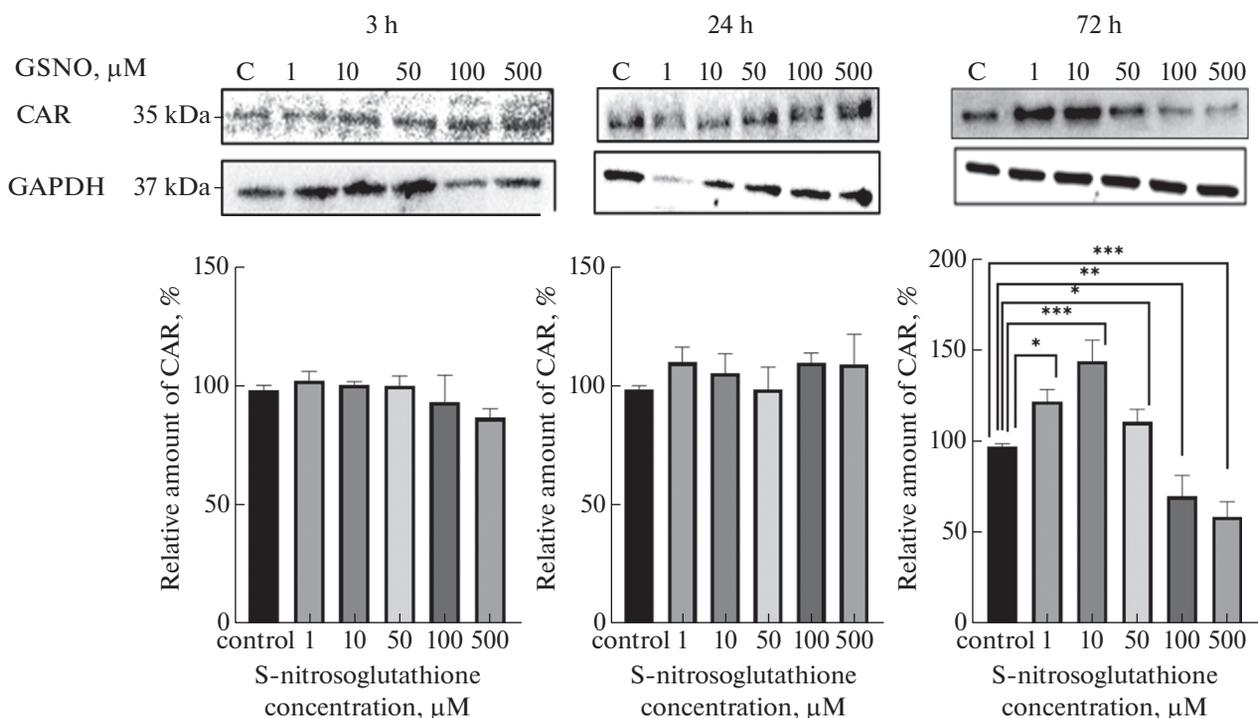


Рис. 3. Относительное количество конститутивного андростанового рецептора в клетках линии Caco-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в концентрациях 1 – 500 мкМ в течение 3, 24 и 72 ч ($M \pm SD$, $n = 3$). С-контроль; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ по сравнению с контролем (тест Фишера).

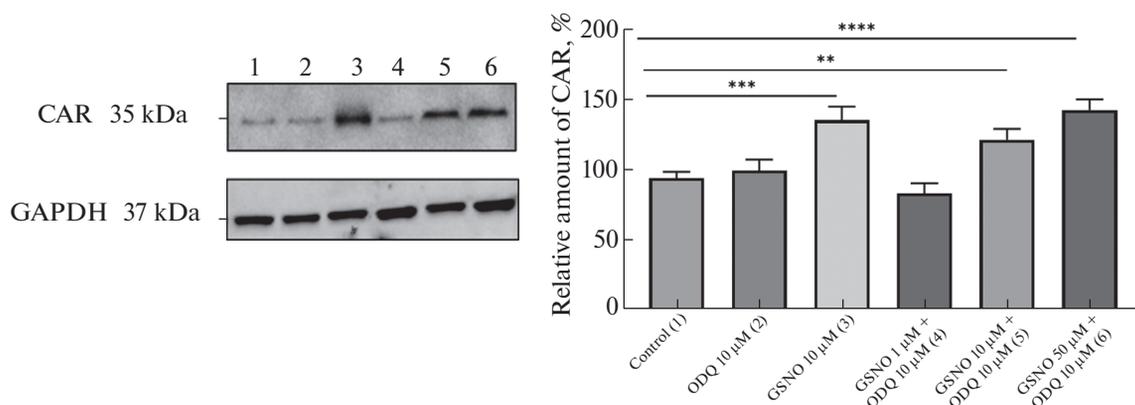


Рис. 4. Относительное количество конститутивного андростанового рецептора в клетках линии Caco-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в сочетании с ингибированием растворимой гуанилатциклазы (ODQ, 10 мкМ) в течение 72 ч. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ по сравнению с контролем (тест Фишера).

Сочетанное применение ODQ и GSNO в концентрации 1 мкМ приводило к нормализации относительного количества CAR по сравнению с контролем (индуцирующий эффект GSNO подавлялся ODQ). В то же время ODQ не влиял на стимулирующее действие GSNO в концентрациях 10 и 50 мкМ на относительное количество CAR, которое возрастало на 22.3% ($p < 0.01$) и 43.8% ($p < 0.0001$) соответственно по сравнению с контролем (рис. 4).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что индуцирующее действие GSNO в концентрации 1 мкМ на CAR реализуется через NO-цГМФ-сигнальный путь.

Оценка влияния продукта нитрозативного стресса – битирозина на относительное количество CAR в клетках линии Caco-2.

Добавление битирозина в питательную среду в концентрации 0.4 мМ приводило к возрастанию

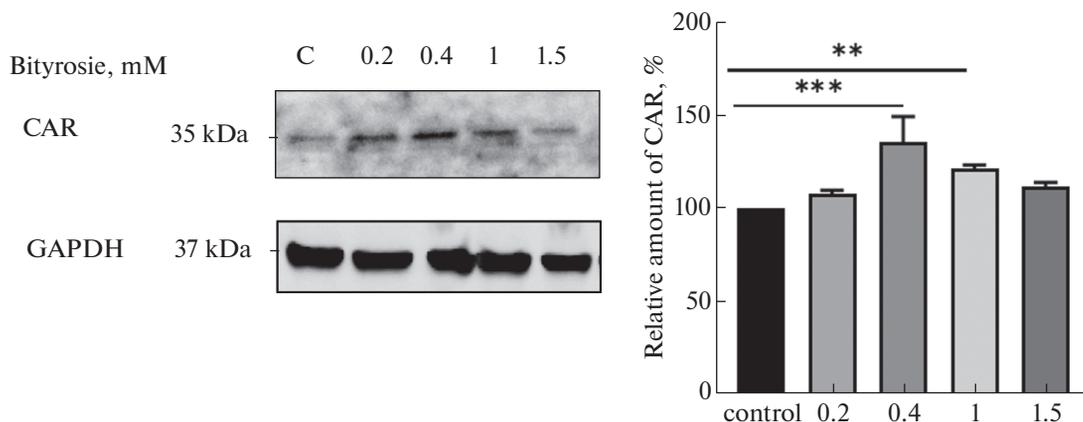


Рис. 5. Относительное количество конститутивного андростанового рецептора в клетках линии Caco-2 при воздействии битирозина в концентрациях 0.2, 0.4, 1, 1.5 мМ в течение 72 ч ($M \pm SD$, $n = 3$).

C – контроль; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ по сравнению с контролем (тест Фишера).

относительного количества CAR на 26.2% ($p < 0.001$), в концентрации 1 мМ – на 13.1% ($p < 0.01$) по сравнению с контролем, а в концентрациях 0.2 и 1.5 мМ не оказывало эффекта (рис. 5).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что продукт нитрозативного стресса – битирозин участвует в регуляции экспрессии CAR.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

GSNO представляет собой S-нитрозированное производное глутатиона и является физиологической эндогенной молекулой-носителем NO. Гомеостатический уровень GSNO в клетке низкий, поскольку он быстро и необратимо разлагается на NO и глутатион при участии фермента S-нитроглютационредуктазы (КФ 1.2.1.1.46) [32].

GSNO не проникает в клетки напрямую, однако его добавление вызывает повышение внутриклеточных уровней S-нитрозотиолов. Предполагается, что GSNO диссоциирует во внеклеточном пространстве с высвобождением NO, который затем может диффундировать через клеточную мембрану [33]. Также описан независимый от NO механизм его проникновения внутрь клеток. Нитрозогруппа от GSNO переносится на цистеин с образованием S-нитрозоцистеина, который способен проникать внутрь клеток через систему транспортера аминокислот [34]. S-нитрозоцистеин внутри клеток может либо вновь нитрозировать глутатион с образованием GSNO, либо непосредственно нитрозировать тиолы белков и запускать сигнальные каскады.

GSNO считается важным медиатором сигнальных механизмов NO, однако его эффект зависит от концентрации и времени воздействия: концентрации от 1 до 100 мкМ оказывают регуляторное дей-

ствие [35, 36], а концентрации выше 500 мкМ являются токсичными [37].

Анализ литературных данных и определил рабочий диапазон концентраций GSNO 1–500 мкМ. Полученные результаты демонстрируют, что добавление GSNO к клеткам линии Caco-2 вызывает повышение содержания метаболитов NO в лизате клеток, что свидетельствует об адекватности используемой экспериментальной модели.

В представленном исследовании было показано, что воздействие GSNO в концентрациях 1, 10 и 50 мкМ на клетки линии Caco-2 в течение 72 ч приводило к увеличению относительного количества CAR. В дальнейшем в ходе работы были изучены возможные механизмы данного явления.

Экспрессия CAR может изменяться в результате белок-белковых взаимодействий (Src-семейство киназ [38], ретиноидный X рецептор [39], шаперон 90 [40, 41]), посттрансляционной модификации (фосфорилирование [42], убиквитинирование [5]), транскрипционной и посттранскрипционной регуляции (метилование) [43].

При воздействии GSNO на клетки линии Caco-2 возможны механизмы регуляции: через NO-цГМФ-сигнальный путь (NO-зависимый), а также через продукты нитрозативного стресса (битирозин-зависимый).

Основной физиологической мишенью для NO в организме является рГЦ, которая катализирует биосинтез из гуанозинтрифосфата (ГТФ) циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ). цГМФ – это универсальная внутриклеточная сигнальная молекула, присутствующая в большинстве типе клеток [44].

Важно отметить, что GSNO в концентрации 1 мкМ в течение 72 ч вызывал повышение уровня метаболитов NO и пероксинитрита, что свидетельствует о генерации NO, однако содержание бити-

розина при этом не изменялось. Следовательно, регуляция CAR в этих условиях осуществляется посредством NO и маловероятна при участии битирозина.

В ходе настоящего исследования с помощью специфического ингибитора растворимой гуанилатциклазы – ODQ было показано, что повышение уровня CAR при воздействии GSNO в концентрации 1 мкМ реализуется через NO-ГЦ-цГМФ сигнальный путь.

Дальнейшее увеличение концентрации GSNO (10 и 50 мкМ) приводило к увеличению уровня метаболитов NO, образованию пероксинитрита и повреждению белковых молекул по тирозину.

Нитрозилирование тирозина представляет собой наиболее специфичную окислительную модификацию. Нитротирозин частично диссоциирует до фенолята, но основное его количество конденсируется до 3,3-дитирозина (битирозина) [45]. Доказано, что образование битирозина превалирует над нитротирозином при длительном воздействии и/или более высоком уровне активных форм азота, что позволяет рассматривать его в качестве маркера нитрозативного стресса [46].

Поэтому на следующем этапе исследования изучался другой потенциальный механизм регуляции через продукт нитрозативного стресса – битирозин.

Прямое воздействие битирозина в концентрациях 0,4 и 1 мМ на клетки линии Сасо-2 приводило к увеличению относительного количества CAR, что указывает на участие продукта нитрозативного стресса в регуляции данного орфанного рецептора. Сигнальная роль битирозина согласуется с данными литературы [47, 48].

При усугублении нитрозативного стресса (воздействие GSNO в концентрациях 100 и 500 мкМ) наблюдались снижение жизнеспособности клеток и уменьшение относительного количества CAR.

Конститутивный андростановый рецептор состоит из 301 аминокислоты, из них 33 приходится на формирование лиганд-связывающего кармана. Аминокислоты, выступающие и окружающие лиганд-связывающий карман, идентифицированы как наиболее важные и определяющие активность CAR [49].

При усугублении нитрозативного стресса происходит взаимодействие пероксинитрита с аминокислотными остатками белков. Пероксинитрит проявляет высокую реакционную активность в отношении следующих аминокислот: цистеин, триптофан, метионин, тирозин. Можно предположить, что изменение относительного количества CAR может объясняться его структурной модификацией – нитрозилированием цистеина (292), триптофана (283, 305), метионина (241, 272, 316, 418) и тирозина (283, 311, 399), входящих в состав лиганд-связывающего кармана CAR.

Таким образом, нами показано, что воздействие донора NO GSNO в течение 3 и 24 ч в концентрациях 1–500 мкМ не влияет на количество CAR. Увеличение длительности экспозиции до 72 ч приводит к увеличению относительного количества CAR при экспозиции с GSNO в концентрациях 1, 10 и 50 мкМ, при этом регуляция осуществляется по разным механизмам.

Повышение относительного количества CAR при воздействии низких концентраций GSNO (1 мкМ) реализуется через NO-цГМФ-сигнальный путь, а при увеличении концентрации GSNO до 10 и 50 мкМ отмечается развитие нитрозативного стресса, и регуляция осуществляется через продукт нитрования – битирозин. В условиях прогрессирования нитрозативного стресса, вызванного GSNO в концентрации 100–500 мкМ, относительное количество CAR снижается, что, вероятно, связано с повреждением его молекулы.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа проведена при поддержке гранта Президента Российской Федерации (МК-1856.2020.7).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А.В.Ш., Ю.В.А.), проведение эксперимента (А.В.Ш., Ю.В.А., Е.А.С., А.А.С.), обработка данных (А.В.Ш., Ю.В.А., Е.А.С., А.А.С.), написание и редактирование манускрипта (А.В.Ш., Ю.В.А., Е.А.С., Е.Н.Я.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kachaylo EM, Pustylnyak VO, Lyakhovich VV, Gulyaeva LF* (2011) Constitutive androstane receptor (CAR) is a xenosensor and target for therapy. *Biochemistry (Mosc)* 76 (10): 1087–1097. <https://doi.org/10.1134/S0006297911100026>
2. *Qatanani M, Moore DD* (2005) CAR, the continuously advancing receptor, in drug metabolism and disease. *Current Drug Metabolism* 6 (4): 329–339. <https://doi.org/10.2174/1389200054633899>
3. *Timsit YE, Negishi M* (2007) CAR and PXR: the xenobiotic-sensing receptors. *Steroids* 72: 231–246. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2006.12.006>
4. *Nishimura M, Naito S, Yokoi T* (2004) Tissue-specific mRNA expression profiles of human nuclear receptor subfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet* 19 (2): 135–149. <https://doi.org/10.2133/dmpk.19.135>

5. *Timsit YE, Negishi M* (2014) Coordinated regulation of nuclear receptor CAR by CCRP/DNAJC7, HSP70 and the ubiquitin-proteasome system. *PLoS One* 9 (5): e96092. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096092>
6. *Kakizaki S, Yamamoto Y, Ueda A, Moore R, Sueyoshi T, Negishi M* (2003) Phenobarbital induction of drug/steroid-metabolizing enzymes and nuclear receptor CAR. *Biochim Biophys Acta* 1619 (3): 239–242. [https://doi.org/10.1016/s0304-4165\(02\)00482-8](https://doi.org/10.1016/s0304-4165(02)00482-8)
7. *He L, Wu J, Tang W, Zhou X, Lin Q, Luo F, Yin Y, Li T* (2018) Prevention of oxidative stress by α -ketoglutarate via activation of car signaling and modulation of the expression of key antioxidant-associated targets in vivo and in vitro. *J Agric Food Chem* 66 (43): 11273–11283. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04470>
8. *Yang H, Wang H* (2014) Signaling control of the constitutive androstane receptor (CAR). *Protein Cell* 5 (2): 113–123. <https://doi.org/10.1007/s13238-013-0013-0>
9. *Lynch C, Pan Y, Li L, Heyward S, Moeller T, Swaan PW, Wang H* (2014) Activation of the constitutive androstane receptor inhibits gluconeogenesis without affecting lipogenesis or fatty acid synthesis in human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 279 (1): 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.05.009>
10. *Abalenikhina YV, Kosmachevskaya OV, Topunov AF* (2020) Peroxynitrite: toxic agent and signaling molecule (review). *Appl Biochem Microbiol* 56: 611–623. <https://doi.org/10.1134/S0003683820060022>
11. *Araki S, Osuka K, Takata T, Tsuchiya Y, Watanabe Y* (2020) Coordination between calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and neuronal nitric oxide synthase in neurons. *Int J Mol Sci* 21: 7997. <https://doi.org/10.3390/ijms21217997>
12. *Browning DD, McShane MP, Marty C, Ye RD* (2000) Nitric oxide activation of p38 mitogen-activated protein kinase in 293T fibroblasts requires cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 275 (4): 2811–2816. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.4.2811>
13. *Bladowski M, Gawrys J, Gajecki D, Szahidewicz-Krupska E, Sawicz-Bladowska A, Doroszko A* (2020) Role of the platelets and nitric oxide biotransformation in ischemic stroke: a translative review from bench to bedside. *Oxid Med Cell Longev* 28: 2979260. <https://doi.org/10.1155/2020/2979260>
14. *Saini R, Azam Z, Sapra L, Srivastava RK* (2021) Neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in neutrophils: an insight. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 180: 49–83. https://doi.org/10.1007/112_2021_61
15. *Zweier JL, Ilangovan G* (2020) Regulation of nitric oxide metabolism and vascular tone by cytoglobin. *Antioxid Redox Signal* 32 (16): 1172–1187. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7881>
16. *Antosova M, Mokra D, Pepucha L, Plevkova J, Buday T, Sterusky M, Bencova A* (2017) Physiology of nitric oxide in the respiratory system. *Physiol Res* 66 (Suppl 2): 159–172. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933673>
17. *Sanders KM, Ward SM* (2019) Nitric oxide and its role as a non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory neurotransmitter in the gastrointestinal tract. *Br J Pharmacol* 176 (2): 212–227. <https://doi.org/10.1111/bph.14459>
18. *Ahmad A, Dempsey SK, Daneva Z, Azam M, Li N, Li PL, Ritter JK* (2018) Role of nitric oxide in the cardiovascular and renal systems. *Int J Mol Sci* 19 (9): 2605. <https://doi.org/10.3390/ijms19092605>
19. *Garthwaite J* (2019) NO as a multimodal transmitter in the brain: discovery and current status. *Br J Pharmacol* 176 (2): 197–211. <https://doi.org/10.1111/bph.14532>
20. *Mazurek M, Rola R* (2021) The implications of nitric oxide metabolism in the treatment of glial tumors. *Neurochem Int* 150: 105172. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105172>
21. *Lancaster JR* (2015) Nitric oxide: a brief overview of chemical and physical properties relevant to therapeutic applications. *Future Sci OA* 1 (1): FSO59. <https://doi.org/10.4155/fso.15.59>
22. *Гуманова НГ* (2021) Оксид азота и его циркулирующие метаболиты NOx, их роль в функционировании человеческого организма при прогнозе риска сердечно-сосудистой смерти (Часть II). Профилакт мед 24 (10): 119–125. [*Gumanova NG* (2021) Nitrogen oxide and its circulating NOx metabolites, their role in human body functioning and cardiovascular death risk prediction (Part II). *Russ J Preventiv Med* 24 (10): 199–125. (In Russ)]. <https://doi.org/10.17116/profmed202124101119>
23. *Koseki K, Yamamoto A, Tanimoto K, Okamoto N, Teng F, Bito T, Yabuta Y, Kawano T, Watanabe F* (2021) Dityrosine crosslinking of collagen and amyloid- β peptides is formed by vitamin B₁₂ deficiency-generated oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Int J Mol Sci* 22 (23): 12959. <https://doi.org/10.3390/ijms222312959>
24. *Li AP* (2020) In vitro human cell-based experimental models for the evaluation of enteric metabolism and drug interaction potential of drugs and natural products. *Drug Metab Dispos* 48 (10): 980–992. <https://doi.org/10.1124/dmd.120.000053>
25. *Hwang TL, Wu CC, Teng CM* (1998) Comparison of two soluble guanylyl cyclase inhibitors, methylene blue and ODQ, on sodium nitroprusside-induced relaxation in guinea-pig trachea. *Br J Pharmacol* 125 (6): 1158–1163. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702181>
26. *Метельская ВА, Гуманова НГ* (2005) Скрининг – метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке человека. Клин лаб диагност 6: 15–18. [*Metelskaya VA, Gumanova NG* (2005) Screening method for determining the level of nitric oxide metabolites in human serum. *Clin Lab Diagnost* 6: 15–18. (In Russ)].
27. *Лобышева ИИ, Сerezженков ВА, Ванин АФ* (1999) Взаимодействие динитрозильных тиолсодержащих комплексов железа с пероксинитритом и перекисью водорода *in vitro*. Биохимия 64 (2): 194–200. [*Lobysheva II, Serezhenkov VA, Vanin AF* (1999) Interaction of dinitrosyl thiol-containing iron complexes with peroxynitrite and hydrogen peroxide *in vitro*. *Biochemistry* 64 (2): 194–200. (In Russ)].

28. *Amado R, Aeschbach R, Neukom H* (1984) Dityrosine: in vitro production and characterization. *Methods Enzymol* 107: 377–388. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(84\)07026-9](https://doi.org/10.1016/0076-6879(84)07026-9)
29. *Bradford M.M.* (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt Biochem* 72: 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
30. *Tolosa L, Donato MT, Gómez-Lechón MJ* (2015) General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay. *Methods Mol Biol* 1250: 333–348. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7_26
31. *Абаленихина ЮВ, Судакова ЕА, Сеидкулиева АА, Щулькин АВ, Якушева ЕН* (2021) Функционирование прегнан Х рецептора в условиях нитрозативного стресса. *Биомед химия* 67 (5): 394–401. [*Abalenikhina YV, Sudakova EA, Seidkulieva AA, Shchulkin AV, Yakusheva EN* (2021) Functioning of pregnan X receptor under conditions of nitrosative stress. *Biomed Khim* 67 (5): 394–401. (In Russ)]. <https://doi.org/10.18097/PBMC20216705394>
32. *Rizza S, Giglio P, Faienza F, Filomeni G* (2019) Therapeutic application of nitric oxide in cancer and inflammatory disorders. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816545-4.00009-8>
33. *Ramachandran N, Root P, Jiang XM, Hogg PJ, Mutus B* (2001) Mechanism of transfer of NO from extracellular S-nitrosothiols into the cytosol by cell-surface protein disulfide isomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (17): 9539–9544. <https://doi.org/10.1073/pnas.171180998>
34. *Ramachandran N, Root P, Jiang XM, Hogg PJ, Mutus B* (2001) Mechanism of transfer of NO from extracellular S-nitrosothiols into the cytosol by cell-surface protein disulfide isomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9539–9544. <https://doi.org/10.1073/pnas.171180998>
35. *Zhang Y, Sun C, Xiao G, Shan H, Tang L, Yi Y, Yu W, Gu Y* (2019). S-nitrosylation of the Peroxiredoxin-2 promotes S-nitrosoglutathione-mediated lung cancer cells apoptosis via AMPK-SIRT1 pathway. *Cell Death Dis* 10 (5): 329. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1561-x>
36. *Kim J, Islam SMT, Qiao F, Singh AK, Khan M, Won J, Singh I* (2021) Regulation of B cell functions by S-nitrosoglutathione in the EAE model. *Redox Biol* 45: 102053. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102053>
37. *Mussbacher M, Stessel H, Pirker T, Gorren ACF, Mayer B, Schrammel A* (2019) S-nitrosoglutathione inhibits adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes by S-nitrosation of CCAAT/enhancer-binding protein β . *Sci Rep* 9 (1): 15403. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51579-x>
38. *Chen T, Chen Q, Xu Y, Zhou Q, Zhu J, Zhang H, Wu Q, Xu J, Yu C* (2011) SRC-3 is required for CAR-regulated hepatocyte proliferation and drug metabolism. *J Hepatol* 56 (1): 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.07.015>
39. *Suino K, Peng L, Reynolds R, Li Y, Cha JY, Repa JJ, Klier SA, Xu HE* (2004) The nuclear xenobiotic receptor CAR: structural determinants of constitutive activation and heterodimerization. *Mol Cell* 16 (6): 893–905. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.036>
40. *Yoshinari K, Kobayashi K, Moore R, Kawamoto T, Negishi M* (2003) Identification of the nuclear receptor CAR: HSP90 complex in mouse liver and recruitment of protein phosphatase 2A in response to phenobarbital. *FEBS Letters* 548 (1–3): 17–20. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)00720-8](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)00720-8)
41. *Kanno Y, Miyama Y, Ando M, Inouye Y* (2010) Dependence on the microtubule network and 90-kDa heat shock protein of phenobarbital-induced nuclear translocation of the rat constitutive androstane receptor. *Mol Pharmacol* 77 (2): 311–316. <https://doi.org/10.1124/mol.109.060434>
42. *Chen T, Laurenzana EM, Coslo DM, Chen F, Omiecinski CJ* (2014) Proteasomal interaction as a critical activity modulator of the human constitutive androstane receptor. *Biochem J* 458 (1): 95–107. <https://doi.org/10.1042/BJ20130685K>
43. *Scopino K, Dalgarno C, Nachmanoff C, Krizanc D, Thayer KM, Weir MP* (2021) Arginine methylation regulates ribosome CAR function. *Int J Mol Sci* 22 (3): 1335. <https://doi.org/10.3390/ijms22031335>
44. *Tejero J, Shiva S, Gladwin MT* (2019) Sources of vascular nitric oxide and reactive oxygen species and their regulation. *Physiol Rev* 99 (1): 311–379. <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2017>
45. *Ferrer-Sueta G, Campolo N, Trujillo M, Bartesaghi S, Carballal S, Romero N, Alvarez B, Radi R* (2018) Biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Chem Rev* 118 (3): 1338–1408. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b0056846>
46. *Boer TR, Palomino RI, Mascharak PK* (2019) Peroxynitrite-mediated dimerization of 3-nitrotyrosine: unique chemistry along the spectrum of peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine. *Med One* 4: e190003. <https://doi.org/10.20900/mo.20190003>
47. *Lu Y, Ma S, Tang X, Li B, Ge Y, Zhang K, Yang S, Zhao Q, Xu Y, Ren H.* (2020) Dietary dityrosine induces mitochondrial dysfunction by diminished Thyroid Hormone Function in Mouse Myocardia. *J Agric Food Chem.* 26; 68(34): 9223–9234. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03926>
48. *Lu Y, Ma S, Tang X, Li B, Ge Y, Zhang K, Yang S, Zhao Q, Xu Y, Ren H.* (2020) Dietary Dityrosine Induces Mitochondrial Dysfunction by Diminished Thyroid Hormone Function in Mouse Myocardia. *J Agric Food Chem* 68 (34): 9223–9234. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03926>
49. *Mathäs M, Nussbag C, Burk O, Gödtel-Armbrust U, Herlyn H, Wojnowski L, Windshügel B* (2014) Structural and functional similarity of amphibian constitutive androstane receptor with mammalian pregnane X receptor. *PloS One* 9 (5): e96263. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096263>

Effect of the Nitrogen Oxide Donor S-Nitrosoglutathione on Expression of the Constitutive Androstane Receptor

Yu. V. Abalenikhina^{a,#}, E. A. Sudakova^a, A. A. Seidkuliyeva^a,
A. V. Shchulkin^a and , and E. N. Yakusheva^a

^a Pavlov Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia

[#]e-mail: abalenikhina88@mail.ru

The mechanisms of regulation of the constitutive androstane receptor (CAR) under the effect of the nitric oxide (NO) donor S-nitrosoglutathione (GSNO), added to a nutrient medium at concentrations ranging from 1 to 500 μM for 3, 24, and 72 h, were studied *in vitro* on Caco-2 cells. Relative CAR levels were assessed by Western blotting. It was found that short-term (3 and 24 h) exposure to GSNO at concentrations of 1–500 μM did not affect the relative CAR level, while after a 72-h exposure to GSNO concentrations of 1 and 10 μM , it increased. Such an increase in the relative CAR level upon exposure to a low GSNO concentration (1 μM) was proved to be implemented via the NO-cGMP signaling pathway. Further increase in the GSNO concentration to 10 μM triggered the development of nitrosative stress, and the relative CAR level was regulated via the nitration product bityrosine. Nitrosative stress progression at GSNO concentrations of 100 and 500 μM was accompanied by a decline in Caco-2 cell survival, leading to a decrease in the relative CAR level.

Keywords: constitutive androstane receptor, nitrosative stress, nitric oxide, bityrosine

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КАПСУЛЫ БРЫЖЕЕЧНЫХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ МОЛОДЫХ И СТАРЕЮЩИХ БЫКОВ

© 2022 г. Г. И. Лобов^{1,*}, М. Е. Косарева¹

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

*e-mail: lobovgi@infran.ru

Поступила в редакцию 31.05.2022 г.

После доработки 27.07.2022 г.

Принята к публикации 02.08.2022 г.

Эффективность системы транспорта лимфы влияет не только на баланс интерстициальной жидкости, но и на другие аспекты гомеостаза. Известно, что транспорт лимфы из интерстициального пространства в магистральные вены обеспечивается преимущественно ритмическими сокращениями сегментов лимфатических сосудов — лимфангионов. При этом в сеть лимфатических сосудов последовательно встроены лимфатические узлы, роль которых в транспорте лимфы изучена слабо. Целями данной работы были исследования соотношения длина — натяжение в капсуле брыжеечных лимфатических узлов быка и расчет величины давления, которое способны генерировать лимфатические узлы, а также сопоставление активных и пассивных механических характеристик капсулы лимфатических узлов молодых и стареющих животных. Эксперименты на изолированных капсулах лимфатических узлов показали, что лимфатические узлы являются хорошо растяжимыми структурами, что позволяет им беспрепятственно заполняться лимфой даже на максимуме лимфообразования. Наши данные показывают, что брыжеечные лимфатические узлы быка обладают способностью регулировать ток лимфы по ним посредством внутренних механизмов. Гладкомышечные клетки капсулы лимфатических узлов чувствительны к растяжению, что проявляется в возрастании силы сокращений при увеличении растяжения капсулы. Лимфатические узлы способны генерировать высокое активное давление при значительном увеличении объема и пассивного давления. Растяжимость капсулы лимфатических узлов стареющих быков и активное давление, развиваемое ими в процессе спонтанных сокращений, снижены по сравнению с аналогичными показателями лимфатических узлов молодых животных. В совокупности, в данной работе представлены первые измерения и анализ соотношения длина — натяжение в капсуле и диаметр — давление в брыжеечных лимфатических узлах молодых и стареющих быков.

Ключевые слова: лимфатический узел, капсула, гладкомышечные клетки, натяжение, давление

DOI: 10.31857/S0044452922050072

В организме позвоночных функционируют две сосудистые системы: кровеносная и лимфатическая. Кровеносная система необходима для обмена воды, солей, кислорода, питательных веществ, гормонов и представляет собой замкнутый круг кровообращения с централизованным насосом. Напротив, лимфатическая сосудистая сеть является открытой системой однонаправленного транспорта с низким давлением, ответственной за реабсорбцию и доставку компонентов интерстициальной жидкости из тканей в венозный отдел кровеносной системы. Транспорт лимфы децентрализован и осуществляется лимфатическими сосудами [1, 2]. Наличие лимфатической сосудистой системы у млекопитающих с их высоким давлением в кровеносных сосудах является обязательным условием для оптимальной гидратации тканей. Во всех тканях в сосудах микроциркуляторного русла филь-

трация преобладает над реабсорбцией [3], что в отсутствие дренирующей лимфатической системы могло бы привести к накоплению в интерстициальном пространстве значительного объема жидкости (у человека за сутки до 8–12 л) и отеку [4]. Избыток жидкости реабсорбируется из межклеточного пространства лимфатическими капиллярами. Вместе с водой из интерстиция в лимфатические капилляры поступает широкий спектр различных молекул, профильтрованных из плазмы крови или синтезированных клетками тканей. Из лимфатических капилляров лимфа переходит в собирательные лимфатические сосуды и коллекторы, которые обеспечивают возврат капиллярного ультрафильтра и внесосудистых белков в кровеносную систему.

Важнейшей функцией лимфатической системы является участие в иммунных реакциях. В составе

лимфы (в особенности, кишечной) содержатся тысячи антигенов (аутоантигенов, антигенов из состава пищи и антигенов комменсальной флоры) [5]. Лимфатическая система реализует и контролирует аутоотолерантность и иммунный ответ на эти антигены несколькими способами: управление проникновением антигена/дендритных клеток в лимфатические капилляры на периферии; доставку антигена/дендритных клеток по афферентным лимфатическим сосудам в лимфатические узлы (ЛУ); презентацию антигена в ЛУ с участием лимфатических эндотелиальных клеток и клеток стромы ЛУ; регуляция выхода лимфоцитов из ЛУ [2].

Для реализации своих функций лимфатическая система должна иметь эффективную и хорошо регулируемую систему транспорта лимфы. Несмотря на то что исследования лимфатической системы в последние годы развиваются быстрыми темпами [6, 7], механизмы лимфотока и регуляции транспорта лимфы все еще остаются менее изученными по сравнению с кровеносной системой [1, 8]. К настоящему времени установлено, что продвижение лимфы по лимфатическим сосудам осуществляется за счет внешних и внутренних сил. Внешний механизм эффективно функционирует в органах, подвергающихся периодической компрессии (органы грудной и брюшной полостей, скелетные мышцы) [9]. Однако важнейшим механизмом, обеспечивающим движение лимфы по лимфатическим сосудам, является внутренний механизм, именно он является основным источником периодического градиента давления, способствующего лимфотоку [1, 8]. Внутренний механизм накачки лимфы реализуется за счет мощных фазных сокращений гладкомышечных клеток стенки лимфатических сосудов и наличия в них клапанов. Сегменты лимфатических сосудов, называемые лимфангионами, ритмично сокращаясь, эффективно перекачивают лимфу против неблагоприятного градиента давления [10–12].

Количество лимфы, образующейся в тканях, существенно варьирует и в зависимости от активности органов может изменяться в 10–15 раз [13]. Лимфатические сосуды имеют сложную многоконтурную регуляцию (миогенную, эндотелийзависимую, регуляцию с участием химических веществ), благодаря которой их активная транспортная функция изменяется в соответствии с уровнем лимфообразования [14, 15]. Эффективная система регуляции позволяет лимфатическим сосудам эффективно перекачивать значительные объемы лимфы как в физиологических условиях, так и при патологии, обеспечивая тем самым оптимальную гидратацию тканей.

Обязательными элементами лимфатической системы млекопитающих являются ЛУ, их число у человека составляет от 500 до 600 [16]. ЛУ в эмбриональном периоде формируются из лимфатиче-

ских сосудов, по мере развития они значительно увеличиваются по сравнению с лимфатическими сосудами, заселяются различными клетками и на протяжении жизни выполняют функцию иммунного надзора. ЛУ располагаются в точках схождения афферентных лимфатических сосудов и включены в лимфатическую сосудистую сеть таким образом, что весь объем образующейся в организме лимфы обязательно проходит через один, а чаще — через несколько ЛУ, которые действуют как фильтры патогенов, места встречи антигенпрезентирующих клеток и лимфоцитов, а также как среда для клональной экспансии антигенспецифических Т- и В-лимфоцитов [17, 18]. Антигены и дендритные клетки поступают в ЛУ по лимфатическим сосудам, а лимфоциты — через стенку венул с высоким эндотелием [19]. Исследования иммунных реакций, происходящих в ЛУ, стремительно развиваются, ежегодно публикуются сотни работ. При этом механизмы лимфотока по ЛУ и его регуляция изучены слабо [20, 21].

Основополагающими характеристиками, определяющими реакции органов, имеющих в своем составе гладкомышечные клетки, на различные стимулы, являются механические свойства их стенки [22]. В частности, механические свойства оказывают основное влияние на сократительную функцию кровеносных и лимфатических сосудов [23, 24]. Механические свойства лимфатических сосудов различных регионов разных животных и человека подробно описаны в нескольких работах [25–27]. В ЛУ активным элементом, обеспечивающим продвижение лимфы по синусам ЛУ, является капсула, покрывающая ЛУ снаружи и состоящая из коллагеновых и эластических волокон, формирующих трехмерную сеть, с включенными в нее пучками гладкомышечных клеток [28, 29]. Механические свойства капсулы ЛУ не изучены, соответственно также отсутствуют данные об изменениях механических свойств капсулы ЛУ и ее сократительной функции в зависимости от возраста. Между тем, морфологические исследования показывают, что по мере старения количество соединительной ткани в ЛУ увеличивается [30], участки ЛУ, населенные иммунными клетками, замещаются соединительной тканью, в капсуле и паренхиме ЛУ развиваются фиброз и липоматоз [31, 32].

Цели нашего исследования были двоякими. Во-первых, учитывая ограниченное количество данных о сократительной функции капсулы ЛУ, ее важность для продвижения лимфы по синусам ЛУ и отсутствие информации о чувствительности гладкомышечных клеток капсулы к растяжению, мы поставили задачу исследовать соотношение длина — натяжение в капсуле брыжеечных ЛУ быка и рассчитать величину давления, которое способны генерировать ЛУ. Во-вторых, учитывая выраженные морфологические изменения ЛУ, развивающиеся с возрастом, сопоставить активные и пас-

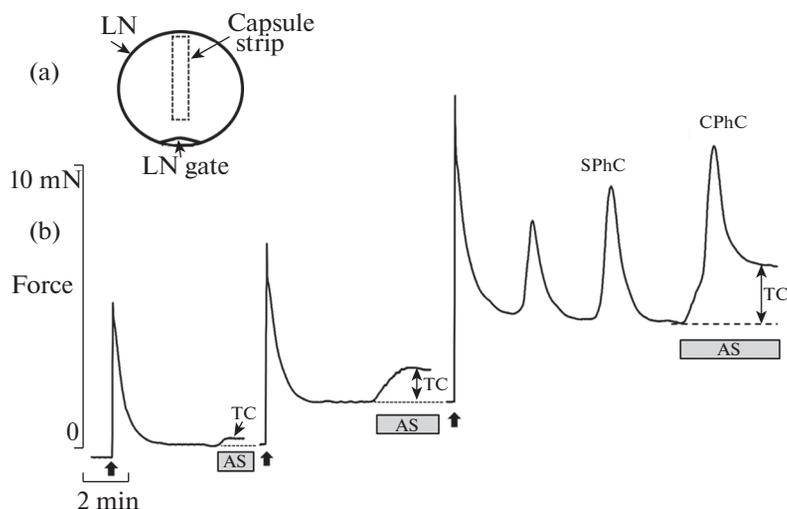


Рис. 1. Динамика развития силы в полоске капсулы брыжеечного ЛУ молодого быка при пошаговом увеличении длины: а – схема ЛУ и расположение полоски капсулы в ЛУ, используемой в экспериментах, б – оригинальная кривая, иллюстрирующая реакции полоски капсулы ЛУ при пошаговом ее удлинении. По завершении релаксации после каждого шага растяжения на полоску действовали активирующим раствором (AS). TC – тоническое сокращение, SPhC – спонтанное фазное сокращение, CPhC – фазное сокращение, вызванное действием активирующего раствора. Вертикальные стрелки показывают момент удлинения полоски. Разрывы на кривой соответствуют 15 мин действия PSS до восстановления исходного уровня тонуса.

сивные механические характеристики капсулы ЛУ молодых и стареющих животных.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для исследования забирали брыжеечные ЛУ второго порядка у молодых (18–20 мес) быков ($n = 14$) и быков в возрасте 7–8 лет ($n = 8$), которых ветеринары считают стареющими [33]. Исследование было одобрено этической комиссией Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Забор материала для исследований осуществляли в цехе забоя животных племенного завода “Приневское”. ЛУ извлекали из брыжейки через 10–12 мин после обескровливания животных и доставляли в лабораторию в холодном (2–4°C) физиологическом солевом растворе (PSS), состав которого представлен ниже. В лаборатории из капсулы ЛУ на стороне, противоположной воротам ЛУ, вырезали фрагменты капсулы и хранили их до исследования в холодильнике в PSS на льду. Перед исследованием из фрагментов капсулы вырезали полоски шириной 2 мм, в направлении от ворот к выпуклой части ЛУ (рис. 1а). Все полоски имели одинаковые размеры и были вырезаны в одинаковых местах капсулы ЛУ. К обоим концам полосок прикрепляли шелковые лигатуры таким образом, чтобы расстояние между ними составляло 5 мм. Размеры полосок определяли под микроскопом МССО (ЛОМО, Россия) с измерительным окуляром. Подготовленные полоски помещали в камеру миографа с датчиком силы FORT – 10 (WPI, США). Одну лигатуру прикрепляли к штоку датчика, а вторую – к микроманипулятору с

микрометром. Через камеру миографа постоянно протекал PSS следующего состава (мМ: NaCl – 120.4; KCl – 5.9; CaCl₂ – 2.5; MgCl₂ – 1.2; NaH₂PO₄ – 1.2; NaHCO₃ – 15.5; глюкоза – 11.5 (все вещества химически чистые, производства Химпром, Россия) + 10 г/л очищенного бычьего сывороточного альбумина (Merck, Sigma-Aldrich)). Раствор аэрировали газовой смесью, состоящей из 95% O₂ и 5% CO₂. Температуру раствора поддерживали на уровне $38 \pm 0.1^\circ\text{C}$, pH 7.40 ± 0.02 . Сигнал от датчика поступал на вход усилителя INA333 (Texas Instruments Incorporated), затем – в сигма – дельта АЦП, встроенный в микроконтроллер STM32F373 (STMicroelectronics). Далее поток данных с частотой 50 Гц поступал на USB – порт компьютера. Программа регистрации (C++) обеспечивала непрерывную запись информации с датчика на протяжении всего эксперимента.

Полоски капсулы ЛУ уравнивали в ненагруженном состоянии на протяжении 40 мин. Затем пошагово (с шагом 500 мкм) увеличивали длину полосок с помощью микроманипулятора. После завершения релаксации и установления стабильного уровня силы полоски активировали раствором (AS), в котором весь Na⁺ был заменен на K⁺ с добавлением 20 мкМ норадреналина (Norepinephrine bitartrate, Sigma-Aldrich). AS действовал до развития полосками максимальной силы. Затем AS в камере миографа заменяли на проточный PSS до восстановления исходного уровня тонуса. Растяжение – активацию полосок капсулы ЛУ повторяли до уменьшения активной силы до 60% от макси-

мальной. После каждого шага увеличения длины измеряли пассивное натяжение и после активации – общее натяжение (при фазном и тоническом сокращении). Активное натяжение рассчитывали путем вычитания из общего натяжения величины пассивного натяжения. Полученные данные в последующем переводили в натяжение на единицу длины посредством деления зарегистрированной силы (в Н) на длину полоски (в м). На основании полученных данных были построены графики зависимости пассивного, активного и общего натяжения от длины. Для сравнения натяжений среди полосок капсулы ЛУ разного диаметра, длину полосок (L) нормализовали к оптимальной длине (L_0), при которой полоски капсулы генерировали максимальное активное натяжение. Соответственно длину полоски на графиках выражали как отношение реальной длины полоски к L_0 (L/L_0). Диаметр ЛУ при построении графиков расчетного давления определяли в соответствии с данными о диаметре ЛУ до вырезания полосок капсулы и рассчитывали по формуле $D = \frac{\text{Дисх} \times L}{\text{Лисх}}$, где D – расчетный диаметр ЛУ, соответствующий длине полоски капсулы после растяжения, Дисх – диаметр ЛУ до препарирования, Лисх – длина полоски капсулы ЛУ до растяжения, L – длина полоски после растяжения. Величины трансмурального давления были получены из значений напряжения и диаметра с использованием закона Лапласа с учетом толщины капсулы и рассчитаны по формуле: $P = T \times \frac{2h}{r}$, где P – трансмуральное давление, T – напряжение в полоске капсулы ЛУ, h – толщина капсулы, r – радиус ЛУ.

Мы забирали в брыжейке быка ЛУ второго порядка, которые имели форму слегка уплощенной сферы с диаметром от 21.3 до 28.7 мм. Толщина капсулы ЛУ составляла от 212 до 256 мкм. Всего было изучено 37 полосок, вырезанных из капсулы брыжеечных ЛУ молодых быков и 26 полосок капсулы ЛУ стареющих животных. 8 полосок капсулы ЛУ не проявляли спонтанной сократительной активности при растяжении и были исключены из анализа. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы “StatSoft STATISTICA 6.1.478”. Для проверки нормальности распределения данных применяли критерий Шапиро–Уилка. Данные соответствовали распределению Гаусса и представлены в виде среднего арифметического значения и стандартной ошибки ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Соотношение длина – натяжение

При исследовании механических характеристик капсулы брыжеечных ЛУ быка было установлено,

что на первых этапах растяжения полоски капсулы ЛУ демонстрировали значительную релаксацию. Применение AS на первых шагах увеличения длины приводило к слабому тоническому сокращению полосок (рис. 1б). Начиная с третьего – четвертого шагов удлинения полоски капсулы ЛУ, без каких-либо дополнительных воздействий генерировали спонтанные фазные сокращения, амплитуда которых на первых шагах растяжения возрастала, а в последующем снижалась.

Начиная с третьего – четвертого шагов удлинения полосок капсулы ЛУ действие AS сопровождалось развитием двуфазного сокращения, состоящего из быстрого фазного сокращения с последующим частичным расслаблением до плато (рис. 1). Мы измеряли амплитуду как фазных, так и тонических сокращений полосок капсулы ЛУ, вызванных действием AS. Величину тонического сокращения полосок капсулы ЛУ при генерации ими фазных сокращений измеряли при максимальном расслаблении полосок. Удлинение полосок капсулы ЛУ производили до снижения амплитуды активных фазных сокращений до 60% от максимального. На основании полученных данных были построены графики длина – натяжение для полосок капсулы брыжеечных ЛУ быков разного возраста (рис. 2).

На первых шагах удлинения полосок капсулы ЛУ развиваемое ими пассивное натяжение было минимальным. Левая часть графиков (при $L/L_0 = 0.6–0.93$) длина – пассивное натяжение показывает, что в интервале длин $0.6–0.93 L_0$ полоски капсулы ЛУ обладают высокой растяжимостью. Сравнение данных, полученных при исследовании полосок капсулы ЛУ молодых и стареющих быков, выявило достоверное увеличение пассивного натяжения в полосках капсулы ЛУ стареющих животных при увеличении длины полосок более $0.93 L_0$ ($p < 0.05$). Максимальные различия были выявлены при длинах полосок капсулы $1.13–1.34 L_0$.

Фазное активное натяжение при длине полосок L_0 составило в полосках капсулы ЛУ молодых быков в среднем 3.94 ± 0.33 Н/м при пассивном натяжении 0.51 ± 0.04 Н/м (рис. 2а). В полосках капсулы ЛУ стареющих животных аналогичные показатели составили 2.63 ± 0.21 и 0.67 ± 0.05 Н/м (рис. 2б). Левая часть графиков длина – активное натяжение (рис. 2) показывает быстро нарастающее увеличение активного натяжения по мере удлинения полосок капсулы ЛУ молодых быков, в то время как у стареющих животных угол наклона восходящей части графика был значительно меньше. Полоски капсулы ЛУ как молодых, так и стареющих животных при длинах $0.8–1.27 L_0$ генерировали активное натяжение более 75% от максимального.

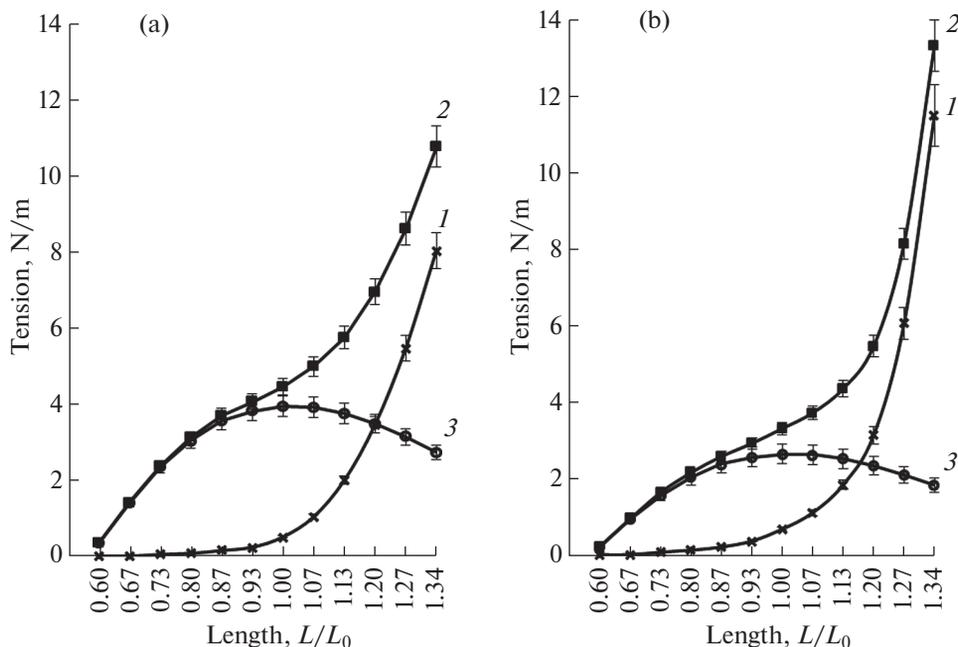


Рис. 2. Зависимость пассивного (1), общего (2) и активного (3) натяжения полосок капсулы брыжеечных ЛУ молодых (а) и стареющих быков (б) от длины при вызванных действием активирующего раствора фазных сокращениях. L_0 – длина полосок, при которой они генерировали максимальную активную силу.

Соотношение диаметр – давление

На основании данных о соотношении длины и натяжения при фазных сокращениях были рассчитаны величины пассивного и активного давления, которое может генерировать капсула ЛУ в зависимости от растяжения. Мы проводили расчеты давления для фазных сокращений, поскольку только этот тип сокращений может осуществлять активную насосную функцию. На рис. 3 показаны графики зависимости трансмурального давления в брыжеечных ЛУ быков в зависимости от нормализованного диаметра (D/D_0), где D и D_0 были рассчитаны, исходя из величин L и L_0 . График зависимости активного давления от диаметра ЛУ молодых быков имеет крутую восходящую и более плавную нисходящую ветви. Максимальное активное давление, развиваемое капсулой брыжеечного ЛУ молодых быков, составило в среднем 27.29 ± 1.73 см H_2O . Высокое активное давление поддерживалось капсулой ЛУ при значительном изменении его диаметра: при диаметре от 0.80 до 1.4 D_0 капсула ЛУ развивала активное давление, составляющее более 80% от максимального. Результаты настоящего исследования показывают, что капсула ЛУ может генерировать высокое активное давление даже при небольшой величине пассивного трансмурального давления (около 1 см H_2O). При повышении пассивного давления способность капсулы ЛУ генерировать высокое активное давление снижалась медленно (при пассивном давлении 20 см H_2O капсула ЛУ развивала активное давление

около 16 см H_2O). Левая часть графика (при диаметрах 0.6–1.0 D_0), характеризующего зависимость активного давления от диаметра ЛУ стареющих животных, была более пологой по сравнению с аналогичным графиком для ЛУ молодых быков. Капсула ЛУ стареющих животных при действии AS генерировала значительно меньшее максимальное давление (при $D_0 = 20.52 \pm 1.44$ см H_2O).

Сравнение максимального активного давления с давлением при спонтанных сокращениях

Одной из целей данного исследования было сравнение величин активного давления в ЛУ, развивающегося при максимальной активации лимфатических гладкомышечных клеток с величинами давления, генерируемого ЛУ при спонтанных фазных сокращениях. Применение AS, содержащего высокую концентрацию K^+ и норадреналин, приводило к максимальной активации сократительного аппарата гладкомышечных клеток капсулы ЛУ. Подобная методика широко применяется при исследовании механических свойств артерий, вен и лимфатических сосудов [34]. Однако в физиологических условиях важнейшим естественным активатором сократительной активности гладкомышечных клеток капсулы ЛУ является их растяжение, а силой, обеспечивающей продвижение лимфы по ЛУ – спонтанные фазные сокращения капсулы [20]. Исходя из этого, в заключительной серии экспериментов мы измеряли амплитуду

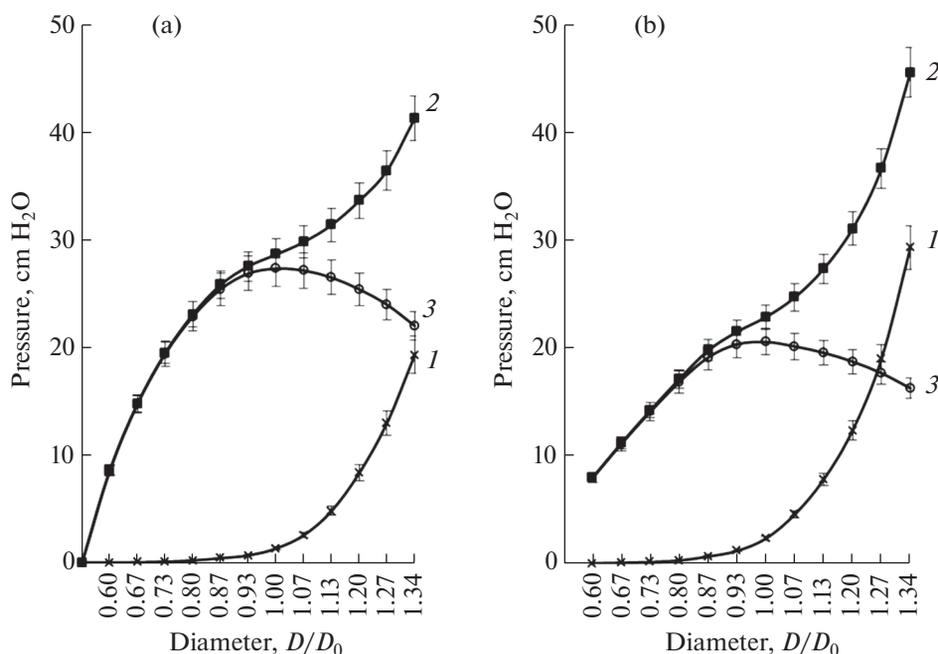


Рис. 3. Расчетное давление (1 – пассивное, 2 – общее, 3 – активное) в зависимости от нормализованного диаметра в брыжеечных лимфатических узлах молодых (а) и стареющих (б) быков. D/D_0 – нормализованный диаметр, где D_0 – диаметр, при котором капсула развивала максимальную силу сокращения.

спонтанных фазных сокращений при различном растяжении полосок капсулы ЛУ и на основании полученных данных рассчитали активное давление, которое способна генерировать капсула ЛУ при растяжении без дополнительной стимуляции лимфатических гладкомышечных клеток. Данные этой серии экспериментов представлены на рис. 4. На рис. 4а показаны фрагменты записи одного из экспериментов, показывающие, что с увеличением натяжения полоски капсулы брыжеечного ЛУ быка возрастают амплитуда и частота спонтанных фазных сокращений. Так, при увеличении натяжения полосок капсулы ЛУ от 0.5 до 1.5 N/m амплитуда спонтанных сокращений полоски капсулы ЛУ возрастала с 3.3 до 7.5 mN. При этом частота спонтанных сокращений увеличивалась с 0.26 до 0.54 мин⁻¹. Дальнейшее увеличение натяжения приводило к уменьшению амплитуды спонтанных сокращений капсулы ЛУ (не показано).

На рис. 4б и с представлены графики зависимости расчетного давления, развиваемого капсулой ЛУ молодых и стареющих быков от диаметра ЛУ при генерации ими спонтанных фазных сокращений. Графики на рис. 4 в общих чертах похожи на графики, представленные на рис. 3, однако величины активного давления, развиваемого капсулой ЛУ при спонтанных сокращениях, были намного меньше по сравнению с давлением, развиваемым капсулой ЛУ при максимальной активации гладкомышечных клеток. Так, при D_0 максимальное активное давление, развиваемое капсулой ЛУ моло-

дых быков при действии AS, было 27.3 ± 1.8 см H₂O, а при спонтанных сокращениях – 11.4 ± 1.0 см H₂O. ЛУ стареющих быков при спонтанных фазных сокращениях развивали достоверно меньшее давление – 8.9 ± 0.8 см H₂O ($p < 0.01$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Расширение наших знаний об основных механических характеристиках элементов лимфатической системы важно для понимания механизмов транспорта лимфы и его регуляции. Из ранее опубликованных работ известно, что лимфатические сосуды очень растяжимы и функционируют в условиях относительно низкого трансмурального давления [1, 8]. Кроме того, в лимфатических сосудах, в отличие от большинства артерий и вен, проявляется спонтанная фазная сократительная активность. Благодаря ей и наличию клапанов сегменты этих сосудов (лимфангионы) выполняют активную насосную функцию, обеспечивающую эффективный транспорт лимфы. Многочисленные исследования организации лимфатической системы показали, что в процессе лимфотока лимфа обязательно протекает через ЛУ, последовательно включенных в лимфатическую сосудистую сеть. При этом приходится констатировать, что работ по исследованию транспортной функции ЛУ крайне мало [1]. Фундаментальные свойства гладких мышц, входящих в состав капсулы ЛУ, изучены слабо, практически нет данных о механических свойствах капсу-

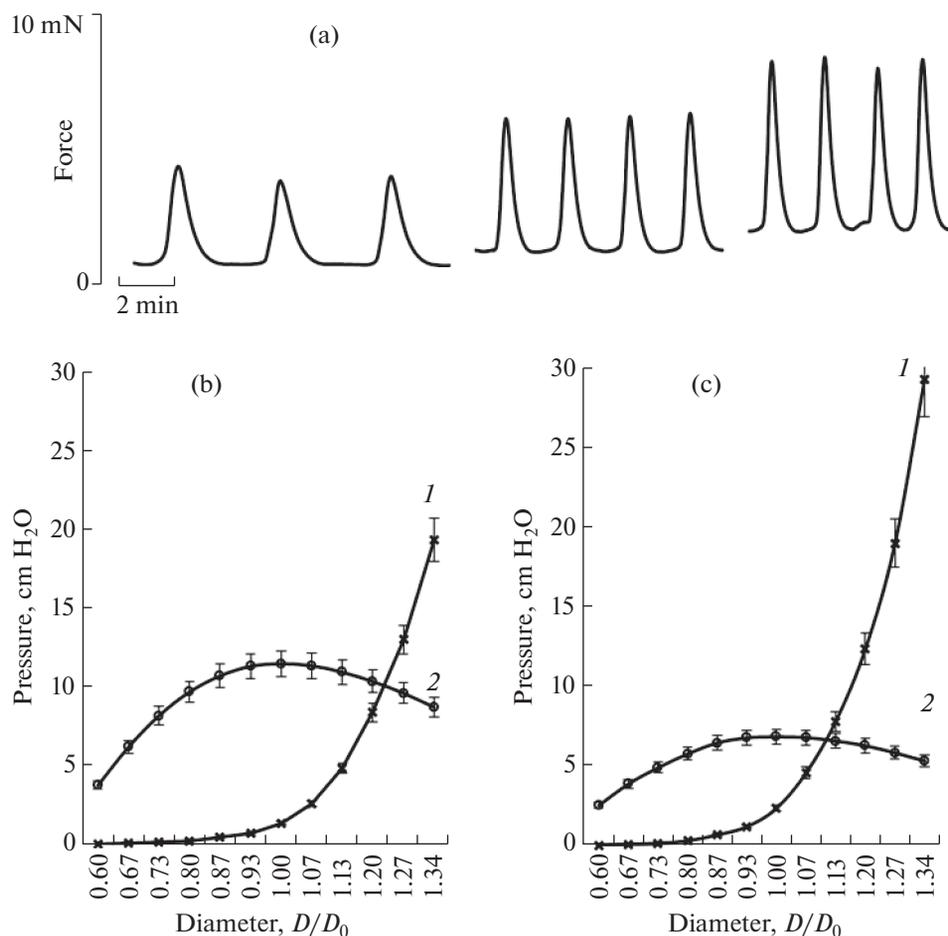


Рис. 4. Спонтанные фазные сокращения капсулы ЛУ молодого быка и расчетное давление, развиваемое капсулой ЛУ при спонтанных сокращениях: а – спонтанные сокращения капсулы ЛУ при натяжении: 0.5 N/m (слева), 1.0 N/m (в центре), 1.5 N/m (справа), б – расчетное давление (1 – пассивное, 2 – активное) при спонтанных сокращениях капсулы ЛУ молодых быков, с – расчетное давление (1 – пассивное, 2 – активное) при спонтанных сокращениях капсулы ЛУ стареющих быков в зависимости от нормализованного диаметра. D/D_0 – нормализованный диаметр, где D_0 – диаметр, при котором капсула ЛУ развивала максимальную силу сокращений.

лы ЛУ. В то же время эта информация крайне необходима как для понимания роли ЛУ в осуществлении лимфотока по лимфатической сети, так и для построения точных математических моделей функционирования ЛУ как центральных структур, реализующих иммунный ответ [35].

В данной работе нами изучены основные механические характеристики капсулы брыжеечных ЛУ молодых и стареющих быков, включая отношение длина – натяжение и спонтанные сокращения. Оснований для выбора брыжеечных ЛУ быка как объекта исследования было несколько: 1) ЛУ лабораторных животных (мыши и крысы) имеют тонкую капсулу, которую крайне сложно выделить без повреждений; 2) параметры сократительной и насосной функции брыжеечных лимфатических сосудов быков хорошо изучены [14, 25]; 3) через ЛУ брыжейки протекает большой объем лимфы (в кишечнике и печени образуется до 80% всей лимфы в ор-

ганизме) [36]; лимфатическая система кишечника подвергается мощной антигенной нагрузке, включая аутоантигены, антигены пищи и комменсальной микрофлоры [37, 38].

Механическую реакцию органов, имеющих в своем составе гладкомышечные клетки, на физиологические нагрузки можно разделить на пассивную и активную составляющие. Пассивный ответ определяется такими компонентами стенки, как эластин и коллаген, в то время как активный ответ является результатом сокращения гладкомышечных клеток. Капсула, покрывающая ЛУ снаружи и определяющая форму и размеры ЛУ, является наименее изученной структурой ЛУ. На фоне сотен публикаций о взаимодействии стромальных клеток, лимфатических эндотелиальных клеток и иммунных клеток в ЛУ в процессе реализации иммунного ответа [39], работ по исследованию состояния и роли капсулы ЛУ в процессе транспорта лимфы

крайне мало, при этом имеющиеся данные являются преимущественно морфологическими [29, 40]. При исследовании капсулы ЛУ различных животных и человека показано, что эта капсула состоит преимущественно из коллагеновых и эластических волокон, формирующих сложную трехмерную сеть, и пучков гладкомышечных клеток, ориентированных в разных направлениях [28, 29]. На выпуклой стороне ЛУ найдено максимальное количество гладкомышечных клеток, которые “располагаются плотными слоями и имеют циркуляторную ориентацию” [41]. В нашей работе мы опирались на имеющиеся морфологические данные, т.о. полоски, вырезаемые из капсулы, были ориентированы в соответствии с направлением основной массы гладкомышечных клеток [41]. Механические характеристики капсулы ЛУ не изучены, соответственно нет данных о возрастных изменениях биомеханических свойств капсулы ЛУ, хотя имеются морфологические данные, свидетельствующие о возраст зависимом фиброзе и липоматозе капсулы и паренхимы ЛУ [42, 43].

В нашей работе, выполненной на полосках капсулы брыжеечных ЛУ молодых и стареющих быков, установлено, что капсула ЛУ обладает высокой растяжимостью, что подтверждается выраженной релаксацией полосок капсулы на первых этапах растяжения. Высокая растяжимость капсулы ЛУ также наглядно иллюстрируется графиком, отражающим отношение длины и пассивного натяжения полосок капсулы ЛУ: первые пять шагов удлинения полосок капсулы практически не повышали пассивное натяжение капсулы ЛУ как молодых, так и стареющих животных (рис. 2). По-видимому, так же, как и в лимфатических сосудах, в капсуле ЛУ при малых деформациях основное сопротивление растяжению оказывают волокна эластина с его низким модулем упругости [44]. Представляется, что высокая растяжимость является важным свойством капсулы ЛУ, которая позволяет ЛУ беспрепятственно заполняться лимфой, поступающей по афферентным лимфатическим сосудам даже в условиях повышенного лимфообразования. Высокая растяжимость характерна и для других структур лимфатической системы (например, для брыжеечных лимфатических сосудов быка [25]), и, по-видимому, является основополагающим свойством лимфатической системы, позволяющим эффективно прокачивать лимфу при низком трансмуральном давлении. В нашем исследовании растяжимость полосок капсулы ЛУ начинала снижаться при увеличении длины более $0.93 L_0$. Следует полагать, что при увеличении деформации в сопротивление капсулы ЛУ растяжению рекрутируются коллагеновые волокна, которые при малых деформациях только расправляются, а при больших становятся все более натянутыми, что значительно повышает жесткость капсулы. В этом диапазоне длин прослеживались достоверные отличия

механических характеристик капсулы ЛУ молодых и стареющих быков, капсула ЛУ стареющих животных демонстрировала значительно большую жесткость.

Применение AS на первых шагах увеличения длины полосок капсулы ЛУ сопровождалось тоническим сокращением препаратов (рис. 1). В последующем, на третьем – четвертом шагах удлинения полосок AS приводил к развитию двуфазного сокращения, которое состояло из быстрого фазного сокращения и следующего за ним частичного расслабления до плато. В этом отношении гладкомышечные клетки капсулы брыжеечных ЛУ быков проявляли такие же свойства, что и гладкомышечные клетки лимфатических сосудов [26, 45], это в определенной степени объясняется их общим происхождением (ЛУ в процессе эмбриогенеза образуются из мезенхимального зачатка с участием уже существующих лимфатических сплетений). Так же, как и лимфатические сосуды, капсула ЛУ при достаточной степени растяжения генерировала спонтанные фазные сокращения, амплитуда и частота которых демонстрировали выраженную зависимость от растяжения. Мы измеряли амплитуду фазных и тонических сокращений, вызванных действием AS, но в дальнейшем анализировали данные о фазных сокращениях, поскольку только этот вид сокращения гладкомышечных клеток обеспечивает насосную функцию элементов лимфатической системы [12].

Максимальное активное натяжение полосок капсулы ЛУ при вызванных действием AS фазных сокращениях было зарегистрировано у молодых животных при пассивном натяжении 0.51 ± 0.03 Н/м и составляло в среднем 3.94 ± 0.19 Н/м (рис. 2). У стареющих быков максимальное активное натяжение полосок капсулы ЛУ составило 2.63 ± 0.14 Н/м при пассивном натяжении 0.67 ± 0.05 Н/м, что свидетельствует об уменьшении активной силы, которую способна развивать капсула ЛУ стареющих быков. Графики, отражающие зависимость активного натяжения полосок капсулы ЛУ молодых и стареющих быков от длины, имели пологую восходящую ветвь и были довольно плоскими при длинах полосок капсулы от 0.8 до $1.2 L_0$, активное натяжение полосок в этом диапазоне составляло около 80% от максимального. Представляется интересным, что капсула брыжеечных ЛУ быка демонстрировала примерно такие же величины активного и пассивного натяжения, что и грудной проток человека [46], хотя диаметры грудного протока и ЛУ отличаются более чем на порядок.

На основании данных о пассивном и максимальном активном натяжении капсулы ЛУ нами были проведены расчеты давления, которое может создавать капсула ЛУ при изменении их диаметра. Мы считаем необходимым подчеркнуть, что представленные нами величины пассивного и активно-

го давления в ЛУ являются производными величинами, рассчитанными на основании данных о силе, развиваемой капсулой при разном диаметре ЛУ. Подобные расчеты правомерны и широко используются при исследовании лимфатических сосудов [26, 46]. Расчеты показали, что на первоначальных этапах увеличения диаметра пассивное давление в ЛУ возрастает очень медленно, но при диаметрах больших, чем D_0 , график зависимости пассивного давления от диаметра становится крутым, т.е. растяжимость капсулы ЛУ значительно снижается. В физиологических условиях зависимость пассивного давления от диаметра определяется количеством соединительнотканых элементов (коллагена и эластина) в капсуле ЛУ. С возрастом в ЛУ развиваются дегенеративные процессы, приводящие к выраженному фиброзу, липоматозу, витрификации и гиалинизации в различных структурах ЛУ, в т.ч. и в капсуле [42, 43], что, по нашему мнению, и приводит к большей жесткости капсулы, наглядно иллюстрируемой в данном исследовании крутой правой частью графика зависимости пассивного давления от диаметра в ЛУ стареющих быков.

Активно генерируемое давление быстро возрастало по мере увеличения диаметра ЛУ. Восходящая часть графика, отражающего зависимость активного давления от диаметра ЛУ, была очень крутой, особенно в ЛУ молодых быков. Так, в брыжеечных ЛУ молодых животных при $D/D_0 = 0.6$ активное давление было 8.53 ± 0.61 см H_2O , а при увеличении D/D_0 до 0.8 возрастало до 23.04 ± 1.51 см H_2O , т.е. гладкомышечные клетки капсулы ЛУ так же, как и гладкомышечные клетки собирающих лимфатических сосудов [47] способны ощущать степень растяжения и реагировать на него увеличением силы сокращений. Важным свойством является также способность капсулы ЛУ генерировать высокое активное давление при значительном увеличении растяжения капсулы: при увеличении диаметра ЛУ до $1.27 D_0$ ЛУ развивал давление, составляющее более 80% от максимально возможного. Ранее быстрый прирост активного давления и длительное удержание давления на высоком уровне при увеличении диаметра были показаны при исследовании брыжеечных лимфатических сосудов быка [25]. По-видимому, высокая чувствительность к растяжению, высокая реактивность и способность к развитию высокого давления при значительном растяжении характерны для всех элементов лимфатической системы. Графики, иллюстрирующие зависимость активного давления от диаметра в брыжеечных ЛУ молодых и стареющих быков, существенно отличались. В частности, левая часть графика, отражающего зависимость активного давления от диаметра ЛУ стареющих животных, была менее крутой. В ЛУ молодых животных максимальное активное давление при D_0 составляло

27.29 ± 1.77 см H_2O , а в ЛУ стареющих быков — лишь 20.52 ± 1.63 см H_2O ($p < 0.01$). Мы полагаем, что в основе выявленных различий в растяжимости и снижении силы сокращений капсулы ЛУ молодых и стареющих животных лежат возраст зависимые структурные изменения, заключающиеся не только в избыточном развитии волокнистой соединительной ткани в капсуле и трабекулах ЛУ [42, 43], но и в снижении массы гладкомышечных клеток. Так, при морфометрическом анализе структурно-функциональных изменений брыжеечных ЛУ человека при старении показано уменьшение числа гладкомышечных клеток в капсуле ЛУ [31, 43].

Данные о максимальном активном давлении, регистрируемом при действии различных стимулирующих факторов, характеризуют потенциальную способность гладкомышечных клеток кровеносных и лимфатических сосудов, а также ЛУ к сокращению и развитию силы. Однако в физиологических условиях для выполнения своей специфической функции гладкомышечные клетки сосудов используют только часть своих потенциальных способностей к развитию силы. Так, миогенный тонус в артериях поддерживается сокращениями стенок гладкомышечных клеток, амплитуда которых не превышает 18% от максимальной [48]. В мезентериальных лимфатических сосудах крысы амплитуда спонтанных фазных сокращений составляет лишь 15% от максимально возможной [45]. Результаты нашего исследования показывают, что капсула ЛУ при генерации спонтанных фазных сокращений, лежащих в основе активной насосной функции ЛУ, также реализует лишь часть своих потенциальных возможностей по развитию силы, но эта часть значительно больше по сравнению с лимфатическими сосудами. Величина активного давления, развиваемого капсулой брыжеечных ЛУ молодых быков при D_0 в процессе спонтанных сокращений, составила 11.4 ± 1.0 см H_2O или 41.7% от максимально развиваемого ею активного давления при действии AS. В ЛУ стареющих животных эта величина оказалась еще меньше — 6.8 ± 0.6 см H_2O (33.1%). Мы полагаем, что в основе столь значительного отличия механических характеристик лимфатических сосудов и ЛУ лежат различия в их строении: лимфатические сосуды являются полими органами, препятствий для лимфотока в них практически нет, а внутренняя часть ЛУ является пористой структурой с синусами и лабиринтами шириной 5–20 мкм и высоким гидродинамическим сопротивлением [49]. В стенке лимфатических сосудов значительное количество гладкомышечных клеток, расположенных циркулярно и по спирали [50], способных развивать быстрые сокращения, отношение толщины стенки к диаметру сосуда — 1/15–1/20, а в капсуле ЛУ преобладают соединительнотканые элементы, отношение толщины капсулы в диаметру ЛУ — 1/100 и более. В

связи с этим в ЛУ, несмотря на общее происхождение гладкомышечных клеток их капсулы и лимфатических сосудов, эволюционно сформировались другие механизмы управления процессом сокращения, что проявляется в скорости и длительности фазных сокращений ЛУ. Сокращения лимфатических сосудов быстрые (до 6 с), с фазой укорочения 1.5–2 с [1], в то время как сокращения капсулы брыжеечных ЛУ быка медленные, фаза укорочения составляет до 30 с при общей продолжительности сокращения до 90 с (рис. 4а). Учитывая высокое гидродинамическое сопротивление ЛУ “при сокращении мышечных элементов ЛУ лимфа выжимается из него, как из губки...” [51].

В основе выявленных различий в способности генерировать активное давление в процессе спонтанных сокращений ЛУ молодых и стареющих животных могут лежать два возраст зависимых процесса. Первый – общее уменьшение числа гладкомышечных клеток в капсуле ЛУ стареющих животных на фоне утолщения капсулы. Второй – возрастные дегенеративные изменения, заключающиеся в фиброзе и гиалинозе капсулы и отложении жира [42], что может механически разобщать пучки гладкомышечных клеток, функционирующие в капсуле ЛУ молодых животных по принципу функционального синцития, и ограничивать возможность распространения возбуждения с одних пучков гладкомышечных клеток на другие.

В заключительной части обсуждения представляется интересным сопоставить рассчитанное нами активно генерируемое давление в брыжеечных ЛУ быка с данными, полученными при непосредственном измерении внутриузлового давления *in vivo*. К сожалению, мы не нашли в литературе данных о давлении в ЛУ быка. Однако имеются данные о величинах трансмурального давления в ЛУ человека и других животных. Прежде, чем приводить эти данные и сравнивать их с результатами нашего исследования, хотелось бы отметить, что лимфатическая система является системой низкого давления, функционирующей по законам, отличающимся от законов гемодинамики. В лимфатической системе нет централизованного насоса, транспорт лимфы децентрализован и осуществляется сегментами лимфатических сосудов – лимфангионами и ЛУ [1]. В процессе осуществления своей активной транспортной функции лимфангионы кратковременно развивают небольшие волны давления (как правило, это единицы см H_2O), которого вполне достаточно для перекачивания лимфы из дистального лимфангиона в проксимальный. При исследовании брыжеечных лимфатических сосудов быка было показано, что давление в лимфангионах колебалось от 3 до 7 см воды. При этом систолический объем лимфангиона достигал 70% от конечнодиастолического, т.е. лимфатический сосуд как активный насос работал очень эффективно [52]. В другом исследовании

было установлено, что активная прокачка лимфы в брыжеечных лимфатических сосудах быка начинается при давлении 2 см H_2O и достигает максимума при 8 см H_2O [53]. Измерение давления в брыжеечных лимфатических сосудах овец показало величины давления – 2–3 см H_2O [54], а в лимфатических сосудах ног претерпевало колебания от 0 до 5 см H_2O [55]. Приблизительно такие же величины давления были получены при исследовании внутрилимфатического давления у мелких животных: в брыжеечных лимфатических сосудах крыс давление в лимфангионе на протяжении цикла сокращения – расслабление колебалось от 0 до 2.5 см H_2O , а при повышении давления на входе повышалось до 5 см H_2O [56]. В другой работе у крыс было зарегистрировано несколько большее давление: в диастолу – около 2 см H_2O , а в систолу повышалось до 11 см H_2O [57]. Резюмируя приведенные величины давления в лимфатических сосудах различных животных, приходится констатировать, что этот параметр не зависит от размеров животного (масса быка и крысы отличаются более чем в 1000 раз). Поскольку ЛУ последовательно встроены в систему лимфатических сосудов, следует полагать, что давление в них должно быть примерно таким же, как и в просвете лимфатических сосудов. Прямых измерений внутриузлового давления мало, имеются данные о давлении лишь в ЛУ мыши и человека. Прямое измерение давления в ЛУ мыши показало, что средним оно составляет 6.86 ± 0.56 см H_2O [58]. У человека давление в интактных ЛУ составило 9.1 ± 6.2 см H_2O , а в ЛУ, пораженных метастазами раковых клеток – 21.4 ± 15.4 см H_2O [59]. Сопоставление рассчитанных нами величин активного давления в брыжеечных ЛУ быка с данными, полученными при прямом измерении давления в ЛУ человека и мыши, позволяет сделать заключение о валидности метода расчета механических характеристик капсулы ЛУ, предпринятом в нашем исследовании.

В заключение нами представлены первые измерения и анализ соотношения длины и натяжения в капсуле брыжеечных ЛУ молодых и стареющих быков. Результаты исследования характеризуют ЛУ как хорошо растяжимые структуры, что позволяет ЛУ беспрепятственно заполняться лимфой даже на максимуме лимфообразования. Наши данные показывают, что брыжеечные ЛУ быка обладают способностью регулировать ток лимфы по ним посредством внутренних механизмов. Высокая чувствительность гладкомышечных клеток капсулы ЛУ к растяжению, проявляющаяся в значительном возрастании силы сокращений при увеличении растяжения капсулы, обеспечивает развитие высокого активного трансмурального давления и увеличение объема прокачиваемой ЛУ лимфы. Важной особенностью ЛУ является их способность генерировать высокое активное давление даже при значи-

тельном увеличении объема ЛУ и пассивного давления в нем. Механические характеристики ЛУ молодых и стареющих быков существенно отличаются: растяжимость капсулы стареющих быков снижена, активное давление, развиваемое ими в процессе спонтанных сокращений составляет лишь около 60% от давления, генерируемого ЛУ молодых животных. Мы надеемся, что представленные нами данные позволят расширить знания о механизмах транспорта лимфы по сложно организованной системе лимфатических сосудов и ЛУ и могут быть положены в основу разработок методик терапевтических вмешательств при патологии лимфатической системы у пожилых людей, а также могут быть использованы при математическом моделировании потоков лимфы по ЛУ в процессе развития иммунных реакций.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 22-25-00108.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование экспериментов, проведение экспериментов, редактирование текста статьи (Г.И.Л.), – выполнение экспериментов, написание статьи (М.Е.К.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Лобов ГИ* (2022) Лимфатическая система в норме и при патологии. Успехи физиол наук 53: 15–38. [*Lobov GI* (2022) The lymphatic system in normal and pathological conditions. Progress Physiol Sci 53: 15–38. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0301179822020060>
2. *Liao S, von der Weid PY* (2015) Lymphatic system: an active pathway for immune protection. Semin Cell Dev Biol 38: 83–89.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.11.012>
3. *Levick JR, Michel CC* (2010) Microvascular fluid exchange and the revised Starling principle. Cardiovasc Res 87 (2): 198–210.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvq062>
4. *Goswami AK, Khaja MS, Downing T, Kokabi N, Saad WE, Majdalany BS* (2020) Lymphatic Anatomy and Physiology. Semin Intervent Radiol 37 (3): 227–236.
<https://doi.org/10.1055/s-0040-1713440>
5. *Macpherson AJ, Smith K* (2006) Mesenteric lymph nodes at the center of immune anatomy. J Exp Med 203 (3): 497–500.
<https://doi.org/10.1084/jem.20060227>
6. *von der Weid PY* (2019) Lymphatic Vessel Pumping. Adv Exp Med Biol 1124: 357–377.
https://doi.org/10.1007/978-981-13-5895-1_15
7. *Steele MM, Lund AW* (2021) Afferent Lymphatic Transport and Peripheral Tissue Immunity. J Immunol 206 (2): 264–272.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.2001060>
8. *Breslin JW, Yang Y, Scallan JP, Sweat RS, Adderley SP, Murfee WL* (2018) Lymphatic Vessel Network Structure and Physiology. Compr Physiol 9 (1): 207–299.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c180015>
9. *Solari E, Marcozzi C, Negrini D, Moriondo A* (2020) Lymphatic Vessels and Their Surroundings: How Local Physical Factors Affect Lymph Flow. Biology (Basel) 9 (12): 463.
<https://doi.org/10.3390/biology9120463>
10. *Лобов ГИ, Орлов РС* (1995) Клеточные механизмы регуляции транспорта лимфы. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 81 (6): 19–28. [*Lobov GI, Orlov RS* (1995) The cellular mechanisms in the regulation of lymph transport. Russ J Physiol 81 (6): 19–28. (In Russ)].
11. *Zweifach BW, Prather JW* (1975) Micromanipulation of pressure in terminal lymphatics in the mesentery. Am J Physiol 228 (5): 1326–1335.
<https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1975.228.5.1326>
12. *Scallan JP, Zawieja SD, Castorena-Gonzalez JA, Davis MJ* (2016) Lymphatic pumping: mechanics, mechanisms and malfunction. J Physiol 594 (20): 5749–5768.
<https://doi.org/10.1113/JP272088>
13. *Olszewski W, Engeset A, Jaeger PM, Sokolowski J, Theodorsen L* (1977) Flow and composition of leg lymph in normal men during venous stasis, muscular activity and local hyperthermia. Acta Physiol Scand 99 (2): 149–155.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1977.tb10365.x>
14. *Лобов ГИ, Орлов РС* (1988) Саморегуляция насосной функции лимфангиона. Физиол журн СССР им ИМ Сеченова 74 (7): 977–986. [*Lobov GI, Orlov RS* (1988) Self-regulation of the pump function of the lymphangion. Fiziol Zh SSSR Im IM Sechenova. 74 (7): 977–986. (In Russ)].
15. *Muthuchamy M, Zawieja D* (2008) Molecular regulation of lymphatic contractility. Ann N Y Acad Sci 1131: 89–99.
<https://doi.org/10.1196/annals.1413.008>
16. *Willard-Mack CL* (2006) Normal structure, function, and histology of lymph nodes. Toxicol Pathol 34 (5): 409–424.
<https://doi.org/10.1080/01926230600867727>
17. *von Andrian UH, Mempel TR* (2003) Homing and cellular traffic in lymph nodes. Nature Rev Immunol 3: 867–878.
<https://doi.org/10.1038/nri1222>
18. *Ohtani O, Ohtani Y* (2008) Structure and function of rat lymph nodes. Arch Histol Cytol 71 (2): 69–76.
<https://doi.org/10.1679/aohc.71.69>
19. *Randolph GJ, Ivanov S, Zinselmeyer BH, Scallan JP* (2017) The Lymphatic System: Integral Roles in Immunity. Annu Rev Immunol 35: 31–52.
<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-041015-055354>
20. *Hughes GA, Allen JM* (1993) Neural modulation of bovine mesenteric lymph node contraction. Exp Physiol 78

- (5): 663–674.
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.1993.sp003714>
21. Lobov GI, Pan'kova MN (2012) Effect of histamine on contractile activity of smooth muscles in bovine mesenteric lymph nodes. *Bull Exp Biol Med* 152 (4): 406–408. <https://doi.org/10.1007/s10517-012-1539-5>
 22. Chi Y, Liang J, Yan D (2006) A material sensitivity study on the accuracy of deformable organ registration using linear biomechanical models. *Med Phys* 33 (2): 421–433. <https://doi.org/10.1118/1.2163838>
 23. Hope SA, Hughes AD (2007) Drug effects on the mechanical properties of large arteries in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34 (7): 688–693. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04661.x>
 24. Arkill KP, Moger J, Winlove CP (2010) The structure and mechanical properties of collecting lymphatic vessels: an investigation using multimodal nonlinear microscopy. *J Anat* 216 (5): 547–555. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2010.01215.x>
 25. Ohhashi T, Azuma T, Sakaguchi M (1980) Active and passive mechanical characteristics of bovine mesenteric lymphatics. *Am J Physiol* 239 (1): H88–H95. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1980.239.1.H88>
 26. Ferguson MK, Williams U, Leff AR, Mitchell RW (1993) Length-tension characteristics of bovine tracheobronchial lymphatic smooth muscle. *Lymphology* 26: 19–24.
 27. Razavi MS, Dixon JB, Gleason RL (2020) Characterization of rat tail lymphatic contractility and biomechanics: incorporating nitric oxide-mediated vasoregulation. *J R Soc Interface* 17 (170): 20200598. <https://doi.org/10.1098/rsif.2020.0598>
 28. Folse DS, Beathard GA, Granholm NA (1975) Smooth muscle in lymph node capsule and trabeculae. *Anat Rec* 183 (4): 517–521.
 29. Castenholz A (1990) Architecture of the lymph node with regard to its function. *Curr Top Pathol* 84 (Pt 1): 1–32. https://doi.org/10.1007/978-3-642-75519-4_1
 30. Zhdanov DA (1970) Regional characteristics and age-related changes in the structure and cytoarchitectonics of human lymph nodes. *Arkh Patol* 32 (3): 14–23.
 31. Hadamitzky C, Spohr H, Debertin AS, Guddat S, Tsokos M, Pabst R (2010) Age-dependent histoarchitectural changes in human lymph nodes: an underestimated process with clinical relevance? *J Anat* 216 (5): 556–562. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2010.01213.x>
 32. Сапин МР (1977) Анатомия соединительнотканного каркаса лимфатических узлов взрослого человека. *Архив анат гистол эмбриол* 72 (4): 58–65. [Sapin MR (1977) Anatomy of the connective tissue framework of adult human lymph nodes. *Arkh Anat Gistol Embriol* 72 (4): 58–65. (In Russ)].
 33. Geelhoed GW (1996) “Aging bull”. *Med Hypotheses* 47 (6): 471–479. [https://doi.org/10.1016/s0306-9877\(96\)90160-7](https://doi.org/10.1016/s0306-9877(96)90160-7)
 34. Zhang RZ, Gashev AA, Zawieja DC, Davis MJ (2007) Length-tension relationships of small arteries, veins, and lymphatics from the rat mesenteric microcirculation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292 (4): H1943–H1952. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01000.2005>
 35. Novkovic M, Onder L, Cheng HW, Bocharov G, Ludewig B (2018) Integrative Computational Modeling of the Lymph Node Stromal Cell Landscape. *Front Immunol* 23 (9): 2428. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02428>
 36. Hsu MC, Itkin M (2016) Lymphatic Anatomy. *Tech Vasc Interv Radiol* 19 (4): 247–254. <https://doi.org/10.1053/j.tvir.2016.10.003>
 37. Bernier-Latmani J, Petrova TV (2017) Intestinal lymphatic vasculature: structure, mechanisms and functions. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14 (9): 510–526. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.79>
 38. Pabst O, Mowat AM (2012) Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol* 5: 232–239.
 39. Li L, Wu J, Abdi R, Jewell CM, Bromberg JS (2021) Lymph node fibroblastic reticular cells steer immune responses. *Trends Immunol* 42 (8): 723–734. <https://doi.org/10.1016/j.it.2021.06.006>
 40. Faron OM, Henry RW, al-Bagdadi FK (1987) Smooth muscle distribution in the capsule and trabeculae of the caprine superficial cervical lymph node. *Histol Histo-pathol* 2 (3): 313–315.
 41. Пастухова ИА (1986) Миоциты паховых лимфатических узлов. *Арх анат гистол эмбриол* 90 (6): 32–37. [Pastukhova IA (1986) Myocytes of the inguinal lymph nodes. *Arkh Anat Gistol Embriol* 90 (6): 32–37. (In Russ)].
 42. Erofeeva LM, Mnikhovich MV (2020) Structural and Functional Changes in the Mesenteric Lymph Nodes in Humans during Aging. *Bull Exp Biol Med* 168 (5): 694–698. <https://doi.org/10.1007/s10517-020-04782-0>
 43. Ahmadi O, McCall JL, Stringer MD (2013) Does senescence affect lymph node number and morphology? A systematic review. *ANZ J Surg* 83 (9): 612–618. <https://doi.org/10.1111/ans.12067>
 44. Jamalian S, Bertram CD, Richardson WJ, Moore JE, Jr (2013) Parameter sensitivity analysis of a lumped-parameter model of a chain of lymphangions in series. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 305 (12): H1709–H1717. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00403.2013>
 45. Zhang R, Gashev AA, Zawieja DC, Lane MM, Davis MJ (2007) Length-dependence of lymphatic phasic contractile activity under isometric and isobaric conditions. *Microcirculation* 14 (6): 613–625. <https://doi.org/10.1080/1073968070143616>
 46. Telinius N, Drewsen N, Pilegaard H, Kold-Petersen H, de Leval M, Aalkjaer C, Hjortdal V, Boedtkjer DB (2010) Human thoracic duct in vitro: diameter-tension properties, spontaneous and evoked contractile activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299 (3): H811–H818. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01089.2009>
 47. Shirasawa Y, Benoit JN (2003) Stretch-induced calcium sensitization of rat lymphatic smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H2573–H2577.
 48. Davis MJ, Davidson J (2002) Force–velocity relationship of myogenically active arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H165–H174.
 49. Browse NL, Doig RL, Sizeland D (1984) The resistance of a lymph node to lymph flow. *Br J Surg* 71 (3): 192–196. <https://doi.org/10.1002/bjs.1800710308>
 50. Бопусов АВ (2005) Функциональная анатомия лимфангиона. *Морфология* 128 (6): 18–27. [Borisov AV (2005) Functional anatomy of lymphangion. *Morfologiya*. 128 (6): 18–27. (In Russ)].

51. *Иосифов ГМ* (1914) Лимфатическая система человека с описанием аденоидов и органов движения лимфы. Томск. Изд. Томского Универ. [*Iosifov GM* (1914) The human lymphatic system with a description of the adenoids and organs of lymphatic movement. Tomsk. Ed. Tomsk Univer. (In Russ)].
52. *McHale NG, Roddie IC* (1976) The effect of transmural pressure on pumping activity in isolated bovine lymphatic vessels. *J Physiol* 261 (2): 255–269. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1976.sp011557>
53. *Ferguson MK, Williams U* (2000) Measurement of flow characteristics during individual contractions in bovine mesenteric lymphatic vessels. *Lymphology* 33 (2): 36–42.
54. *McGeown JG, McHale NG, Thornbury KD* (1987) The effect of electrical stimulation of the sympathetic chain on peripheral lymph flow in the anaesthetized sheep. *J Physiol* 393: 123–133. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1987.sp016814>
55. *McGeown JG, McHale NG, Thornbury KD* (1987) The role of external compression and movement in lymph propulsion in the sheep hind limb. *J Physiol* 387: 83–93. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1987.sp016564>
56. *Scallan JP, Zawieja SD, Castorena-Gonzalez JA, Davis MJ* (2016) Lymphatic pumping: mechanics, mechanisms and malfunction. *J Physiol* 594 (20): 5749–5768. <https://doi.org/10.1113/JP272088>
57. *Benoit JN, Zawieja DC, Goodman AH, Granger HJ* (1989) Characterization of intact mesenteric lymphatic pump and its responsiveness to acute edemagenic stress. *Am J Physiol* 257 (6 Pt 2): H2059–H2069. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1989.257.6.H2059>
58. *Bouta EM, Wood RW, Brown EB, Rahimi H, Ritchlin CT, Schwarz EM* (2014) *In vivo* quantification of lymph viscosity and pressure in lymphatic vessels and draining lymph nodes of arthritic joints in mice. *J Physiol* 592 (6): 1213–1223. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.266700>
59. *Nathanson SD, Mahan M* (2011) Sentinel lymph node pressure in breast cancer. *Ann Surg Oncol* 18 (13): 3791–3796. <https://doi.org/10.1245/s10434-011-1796-y>

Comparative Characterization of Capsule Mechanical Properties in Mesenteric Lymph Nodes of Young and Aging Bulls

G. I. Lobov^{a, #}, and M. E. Kosareva^a

^a *Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia*

[#]*e-mail: lobovgi@infran.ru*

The efficiency of the lymph transport system affects not only the balance of the interstitial fluid, but also other aspects of homeostasis. It is known that the transport of lymph from the interstitial space to the main veins is provided mainly by rhythmic contractions of segments of the lymphatic vessels - lymphangions. At the same time, lymph nodes are sequentially built into the network of lymphatic vessels, the role of which in the transport of lymph is poorly studied. The aims of this work were to study the length-tension ratio in the capsule of the mesenteric lymph nodes of the bull and calculate the pressure that the lymph nodes are able to generate, as well as to compare the active and passive mechanical characteristics of the capsule of the lymph nodes of young and aging animals. Experiments on isolated capsules of lymph nodes have shown that lymph nodes are highly extensible structures, which allows them to freely fill with lymph even at the maximum of lymph formation. Our data show that the mesenteric lymph nodes of the bull have the ability to regulate the flow of lymph through them through internal mechanisms. The smooth muscle cells of the capsule of the lymph nodes are sensitive to stretching, which manifests itself in an increase in the strength of contractions with an increase in the stretching of the capsule. Lymph nodes are able to generate high active pressure with a significant increase in volume and passive pressure. The extensibility of the capsule of the lymph nodes of aging bulls and the active pressure developed by them in the process of spontaneous contractions are reduced compared to those of the lymph nodes of young animals. Collectively, this paper presents the first measurements and analysis of the length-tension ratio in the capsule and the diameter-pressure ratio in the mesenteric lymph nodes of young and aging bulls.

Keywords: lymph node, capsule, smooth muscle cells, tension, pressure

ВЛИЯНИЕ Ni^{2+} НА СЕРДЕЧНЫЙ И ДЫХАТЕЛЬНЫЙ РИТМЫ У НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫСЯТ

© 2022 г. С. В. Кузнецов^{1,*}, Н. Н. Кузнецова¹

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

*e-mail: ksv@iephb.ru

Поступила в редакцию 19.05.2022 г.

После доработки 21.07.2022 г.

Принята к публикации 22.07.2022 г.

На новорожденных крысятах 3–16-дневного возраста (P3–16) изучено влияние Ni^{2+} , блокатора низкопороговых кальциевых каналов Т-типа (T-VDCC) и натрий-кальциевого обменника (NCX), на параметры сердечного и дыхательного ритмов. Обнаружена четкая возрастная зависимость выраженности аритмогенного эффекта, возникающего при блокаде кальциевых каналов. У 100% 3-дневных крысят при инъекции NiCl_2 в дозе 109 мг/кг (ED_{100}) возникает преходящий атипичный сердечный ритм, представляющий собой чередование периодов умеренной брадикардии с патологически медленным (до 20–60 сокр/мин) сердечным ритмом. Параллельно развивается выраженная дисфункция дыхательной системы с пачечной формой дыхания. Данный симптомокомплекс возникает у 75% 10–14-суточных крысят и полностью отсутствует у 15–16-суточных. Феноменологически сходные нарушения сердечного ритма наблюдаются у новорожденных крысят после инъекции хлорида никеля, при отравлении ингибиторами ацетилхолинэстеразы и при активации центральных Н-холинергических структур. Полученные данные позволяют предполагать, что в ранний период постнатального онтогенеза крыс нарушение механизмов кальциевого обмена может играть определенную роль в развитии нарушений ритмогенеза.

Ключевые слова: новорожденные крысы, дизритмия, сердечный ритм, дыхание, кальциевые каналы, хлорид никеля

DOI: 10.31857/S0044452922050060

В раннем постнатальном онтогенезе у крысят могут возникать эпизоды атипичного сердечного ритма, представляющие собой чередование периодов умеренной брадикардии с периодами еще более медленного (до 20 сокр/мин) ритма. Аналогичные нарушения сердечного ритма возникают в условиях активации холинергической системы, вызванной рядом фармакологических воздействий [1–3]. Нами был проведен цикл исследований, направленных на выявление возможной роли дисфункции ионных каналов в развитии данного вида аритмии. В опытах на новорожденных крысятах было проведено изучение влияния блокады медленных кальциевых каналов L-типа [4] и Na^+/K^+ -АТФазы [5], а также блокады и активации рианодиновых рецепторов (RyR) [6] на параметры сердечного и дыхательного ритмов. Было установлено, что нарушение этих ионообменных процессов у новорожденных крысят к значимым нарушениям сердечного ритма не приводит. Вместе с тем в сердце есть еще один тип кальциевых каналов, который может принимать участие в нарушении нормального ритмогенеза.

Кальциевые потенциал-зависимые каналы Т-типа (T-type voltage-dependent Ca^{2+} channel, T-VDCC) наиболее многочисленны в клетках, не имеющих системы поперечных канальцев, таких как узловые и эмбриональные сердечные миоциты. T-VDCC расположены преимущественно в синоатриальном и атриовентрикулярном узлах, клетках Пуркинье и участвуют в работе сердечного пейсмекера [7]. В спонтанно сокращающихся пейсмекерных клетках увеличение субсарколеммальной внутриклеточной концентрации Ca^{2+} происходит одновременно с последней третью диастолической деполяризации из-за локального спонтанного высвобождения Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума, т.е. быстрого подъема уровня ионов Ca^{2+} (спарков). Спонтанный выброс Ca^{2+} приводит к активации $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменника в прямом режиме (1 Ca^{2+} – наружу, 3 Na^+ – внутрь клетки), создающего входящий деполяризующий ток $I_{\text{Na-Ca}}$, ускоряющий диастолическую деполяризацию. В то же время активация кальциевого тока Т-типа (I_{CaT}) с одной стороны сама по себе приводит к еще большему ускорению

диастолической деполяризации, а с другой – дополнительно усиливает входящий I_{Na-Ca} . В итоге диастолическая деполяризация переходит из линейной фазы в экспоненциальную, в результате чего мембрана пейсмейкерного миоцита деполяризуется до порога запуска потенциала действия. Этот механизм указывает на важную роль I_{CaT} и субсарколеммального внутриклеточного высвобождения Ca^{2+} в нормальной деятельности сердечного пейсмейкера, а при определенных условиях может способствовать развитию эктопических предсердных аритмий. Помимо участия в обеспечении пейсмейкерной активности, вход Ca^{2+} через T-VDCC может напрямую регулировать внутриклеточные концентрации Ca^{2+} , являющегося важным вторичным мессенджером для различных клеточных процессов [8, 9]. Локализуемые в сердечно-сосудистой системе T-VDCC подразделяются на подтипы Cav3.1 и Cav3.2, которые имеют различные функциональные особенности. Вместе с тем анализ литературы не дает однозначного ответа о роли этих подтипов в работе миокарда [10, 11].

Как правило, кальциевые каналы T-типа экспрессируются в неонатальных кардиомиоцитах, клетках синоатриального и атриовентрикулярного узла, но практически не экспрессируются во взрослых желудочковых миоцитах [12, 13]. T-VDCC могут повторно экспрессироваться в гипертрофированном миокарде, это позволяет предположить, что данные каналы являются частью фетальной генной программы, возникающей вновь во время гипертрофического процесса [13]. Кроме того, при различных патологических состояниях I_{CaT} часто регистрируется в локальной области миокарда на некоторых стадиях ремоделирования, при этом происходит выраженная экспрессия одного или нескольких канальных белков Cav3.1–3.3 [14]. Предполагается, что у кардиомиопатических хомяков, крыс и кошек чрезмерная перегрузка кальцием может быть связана с аномальной экспрессией T-VDCC во время развития сердечной недостаточности [15]. Сходные данные получены и при анализе динамики созревания натрий-кальциевого обменника (Na^+/Ca^{2+} exchanger, NCX). Экспрессия и функция NCX в сердечных миоцитах наиболее высоки у новорожденных крыс и постепенно снижаются при постнатальном развитии. При гипертрофии, вызванной экспериментальной перегрузкой давлением или при сердечной недостаточности у человека, экспрессия NCX увеличивается и переходит в повышенную активность, аналогично ранней фазе постнатального развития крысы, что позволяет предположить наличие общего базового механизма в контроле экспрессии NCX в незрелом и гипертрофированном миокарде [16].

Установлено, что подтипы T-VDCC можно различать по их чувствительности к блокированию Ni²⁺, причем изоформа Cav3.2 приблизительно в

20 раз более чувствительна к никелю, чем Cav3.1 и Cav2.3 [17–21]. NCX также может блокироваться Ni²⁺, но необходимая для этого концентрация никеля должна быть более, чем в 10 раз выше, чем в случае с T-VDCC [22–24]. Исследования спонтанных потенциалов действия с помощью метода фиксации тока показали, что Ni²⁺ замедляет позднюю фазу деполяризации и, следовательно, замедляет срабатывание пейсмейкерных синоатриальных клеток у кролика или латентных пейсмейкерных клеток у кошки. В опытах *in vivo* изменения чувствительности T-VDCC к никелю в перинатальном онтогенезе не исследовались, но могли бы представлять интерес [9], в том числе и для анализа безопасности фармакологических средств для новорожденных и недоношенных детей [21].

Целью настоящего исследования стало изучение последствий блокады кальциевых каналов T-типа ионами Ni²⁺ у крысят 3–16-дневного возраста.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования

Работа выполнена на крысятах *Rattus norvegicus f. domestica* 3-, 10-, 11-, 12-, 13-, 14-, 15- и 16-дневного возраста (P3–P16). В каждой возрастной группе было от 6 до 62 животных без деления по полу. Всего в опытах использовано 308 крысят. Все экспериментальные процедуры соответствовали требованиям Комитета по биоэтике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, основанным на директиве Европейского парламента 2010/63/EU “О защите животных, используемых в экспериментальных целях”.

Экспериментальная установка и методы регистрации

Животных помещали в экранированную камеру с температурой $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Контроль температуры осуществляли с помощью цифрового термометра RST-02100 (RST, Швеция). Регистрацию физиологических показателей проводили на ненаркотизированных крысятах в условиях мягкой фиксации животных.

Исследовали ЭКГ, показатели внешнего дыхания. В целях снижения уровня артефактов, при регистрации ЭКГ у крысят применяли нестандартное отведение от теменной части головы и крестцовой области. Для анализа частоты дыхания (ЧДД) осуществляли регистрацию экскурсии грудной клетки с использованием пьезоэлектрического датчика VP-102 (RTF, Германия). В экспериментах использовали усилители биопотенциалов ИУ-40 (производство ЭПМ НИИЭМ РАМН). ЧДД регистрировали при полосе пропускания усилителя от

0.15 до 30 Гц, ЭКГ – от 5 до 50 Гц, ЭМГ – от 5 до 150 Гц. Для ввода аналоговых сигналов в компьютер использовали АЦП Е14–440 (L-card, Россия) с периодом дискретизации 1 мс. Анализ регистрируемых сигналов проводили в программе “Power-Graph 3.3.10” (ООО “ДИСофт”, Россия) и “Origin 2019” (OriginLab Corporation, США).

У интактных крысят после 15-минутного периода адаптации в течение 30 мин регистрировали сердечный и дыхательный ритм. После регистрации физиологических показателей у интактных животных крысятам внутривенно вводили шестиводный хлористый никель (7791-20-0 Sigma-Aldrich) в дозах от 8 до 273 мг/кг (в пересчете на безводный NiCl_2). Общее время исследования каждого животного составляло от 75 до 90 мин в зависимости от состояния животного. У части крысят осуществляли дополнительную регистрацию ЭКГ и дыхания через 6–8 ч после инъекции препарата.

Определение эффективной дозы хлорида никеля

В доступной литературе имеется очень мало сведений об острых отравлениях соединениями никеля. Установленные в экспериментах на взрослых крысах среднесмертельные (LD_{50}) дозы хлорида никеля существенно различаются у разных исследователей. В частности, исследования острой пероральной токсичности девяти соединений никеля, проведенные на взрослых белых крысах, подтвердили общую низкую пероральную токсичность этих соединений и продемонстрировали широкий диапазон значений LD_{50} от 310 до >11000 мг/кг. Шестиводный хлорид никеля, растворенный в дистиллированной воде, вводили крысам перорально в дозах от 159 до 2000 мг/кг. В течение 14 дней исследования не наблюдалось смертельных исходов в дозах до 400 мг/кг. Острая пероральная LD_{50} была определена как 500 мг/кг, с 95% доверительным интервалом 397–624 мг/кг [25]. По данным другой группы исследователей, – LD_{50} при пероральном введении крысам составляет 681 мг/кг, при внутривенном – ровно на порядок ниже (68.1 мг/кг) [26]. Внутривенное введение хлористого никеля мышам в дозе 500 мг/кг приводит к их гибели на 3-й день после инъекции. За время наблюдения у подопытных мышей отмечено возникновение респираторного дистресса. Среднесмертельная доза, установленная в этом же исследовании при внутривенном введении NiCl_2 крысам, составила 38.8 мг/кг [27].

Так как в перинатальном онтогенезе крыс токсические дозы никеля ранее не были установлены, то мы провели серию опытов с внутривенным введением NiCl_2 в дозах 8, 14, 27, 55, 82, 109, 164, 218 и 273 мг/кг. Для установления действующей (эффективной) дозы было использовано несколько

групп, состоящих из 4–12 крысят 3-, 10- и 16-дневного возраста. За период наблюдения в течение 8–10 ч после введения препарата была зафиксирована гибель одного 13-дневного животного при инъекции ему никеля в дозе 109 мг/кг и одного 16-дневного – при введении никеля в дозе 273 мг/кг. Таким образом, несмотря на наличие выраженных изменений ряда физиологических показателей, нам не удалось установить среднесмертельную дозу препарата. Средняя эффективная доза (ED_{50}) хлористого никеля, вызывающая нарушения сердечного или дыхательного ритма, составила для 3–16-дневных крысят 14 мг/кг.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных осуществляли в программе “Origin 2019”. Статистически обработанные данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка ($M \pm SEM$). Для определения достоверности различий между группами использовали парный тест Стьюдента. Все изменения рассматривали по отношению к фоновым показателям до введения препарата. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Расчет коэффициента сердечной аритмии (КА) осуществляли по формуле $KA = (RR_{\max} - RR_{\min}) / RR_{\text{mean}}$, где RR – длительность кардиоинтервалов. Расчеты показателей частоты сердечных сокращений (ЧСС) и ЧДД осуществляли как за всю эпоху анализа, так и дополнительно в первые и последние три минуты регистрации после инъекции хлорида никеля. При анализе периодограмм сердечного ритма вычисляли коэффициент асимметрии (Skewness) и коэффициент эксцесса (Kurtosis), который для обеспечения сравнения со стандартным нормальным распределением, рассчитывали как куртозис Пирсона (куртоз – 3).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ предварительных данных показал, что, начиная с дозы 109 мг/кг, у 100% 3-дневных крысят возникают единообразные изменения сердечного и дыхательного ритма. Поэтому доза 109 мг/кг была нами выбрана в качестве основной, используемой для тестирования на животных всех возрастных групп (табл. 1).

После проведения оценки изменений показателей сердечного ритма в экспериментальных группах животных, мы объединили для дальнейшего анализа несколько однородных по характеру реакции возрастных групп крысят. В результате были получены три группы крысят: 3- (масса тела 10.1 ± 0.2 г), 10–14- (масса тела 27.1 ± 0.9 г) и 15–16-дневные (масса тела 32.3 ± 1.0 г).

Первые признаки нарушения ритма дыхания возникают у крысят приблизительно через 3 мин после инъекции хлористого никеля. Еще через

Таблица 1. Физиологические показатели у крысят в фоне и после инъекции NiCl₂ в дозе 109 мг/кг

Показатели	Фон	NiCl ₂			
	<i>M ± SEM</i>	<i>M ± SEM</i>	Mediana, (first – last)	% к фону	% животных с наличием комплексов
3 сут (n = 12)					
ЧСС в мин	322.1 ± 3.4	256.1 ± 6.8*	260 (267–185)	80	100
ЧДД в мин	114.0 ± 2.6	71.8 ± 1.4*	71 (78–29)	63	
КА, у.е.	0.29 ± 0.05	5.21 ± 0.75*	–	1797	
10–14 сут (n = 16)					
ЧСС в мин	461.6 ± 11.4	296.1 ± 8.1*	293 (423–264)	64	73
ЧДД в мин	120.6 ± 5.0	68.2 ± 3.5*	70 (76–41)	57	
КА, у.е.	0.12 ± 0.01	3.93 ± 0.56*	–	3275	
15–16 сут (n = 12)					
ЧСС в мин	494.5 ± 7.9	352.0 ± 15.2*	366 (451–317)	71	0
ЧДД в мин	123.5 ± 5.3	57.8 ± 2.3*	56 (69–50)	47	
КА, у.е.	0.13 ± 0.02	0.50 ± 0.04*	–	385	

Здесь и в табл. 2: **p* < 0.05 – достоверность различий между фоном и препаратом.

ЧДД – частота дыхательных движений, ЧСС – частота сердечных сокращений. КА – коэффициент аритмии. Mediana – медиана для среднего значения показателя по группе; (first – last) – средние значения ЧСС или ЧДД в первые и последние три минуты регистрации после инъекции NiCl₂.

30–60 с начинается развитие брадикардии, переходящее в пачечную форму активности, где установившийся медленный сердечный ритм чередуется с периодами еще более медленных сердечных сокращений (рис. 1). Через 15–25 мин происходит восстановление регулярного дыхательного и сердечного ритма. Следует отметить, что, несмотря на стабилизацию ритма сердца, восстановления до нормальной ЧСС не происходит на протяжении 6–8 ч после инъекции.

Примечательно, что увеличение дозы препарата до 273 мг/кг вызывает у животных изменения физиологических показателей, сопоставимые по клинической картине, времени наступления и продолжительности с наблюдаемыми при введении NiCl₂ в дозе 109 мг/кг (табл. 2, рис. 2).

Как мы уже указывали выше, возникновение нарушений ритма дыхания на несколько секунд опережает начало развития брадикардии и появления пачечной аритмии (рис. 1, 2). У 37% 3-дневных и 90% 10–14-дневных крысят на протяжении периода воспроизведения атипичного сердечного ритма отслеживается устойчивая взаимосвязь между комплексами сердечных сокращений и вспышка-

ми высокоамплитудного дыхания (рис. 3). В период между комплексами дыхательных движений может наблюдаться или нерегулярное поверхностное дыхание (рис. 3с), или периоды апноэ. У крысят на P15–16 после инъекции NiCl₂ пачечная форма дыхания отсутствует, хотя ритм дыхания замедляется и имеет нерегулярный характер (табл. 1).

У 3–14-дневных крысят в период аритмии ЧСС имеет большую вариабельность. В разных возрастных группах разброс RR-интервалов существенно различается. Наблюдается четкая возрастная зависимость выраженности аритмогенного эффекта препарата, максимального на 3-и сутки и отсутствующего у 15-дневных крысят (рис. 4). Более выраженный прирост величины коэффициента аритмии на P10–14, представленный в табл. 1, обусловлен меньшим разбросом длительности сердечного цикла в фоне по сравнению с P3, когда и у интактных крысят возникают характерные для этого возраста преходящие короткие периоды брадикардии.

На рис. 5 представлены гистограммы распределения RR-интервалов у интактных и подвергшихся воздействию никеля крысят. В фоне у 3-дневных крысят наблюдается распределение с незначитель-

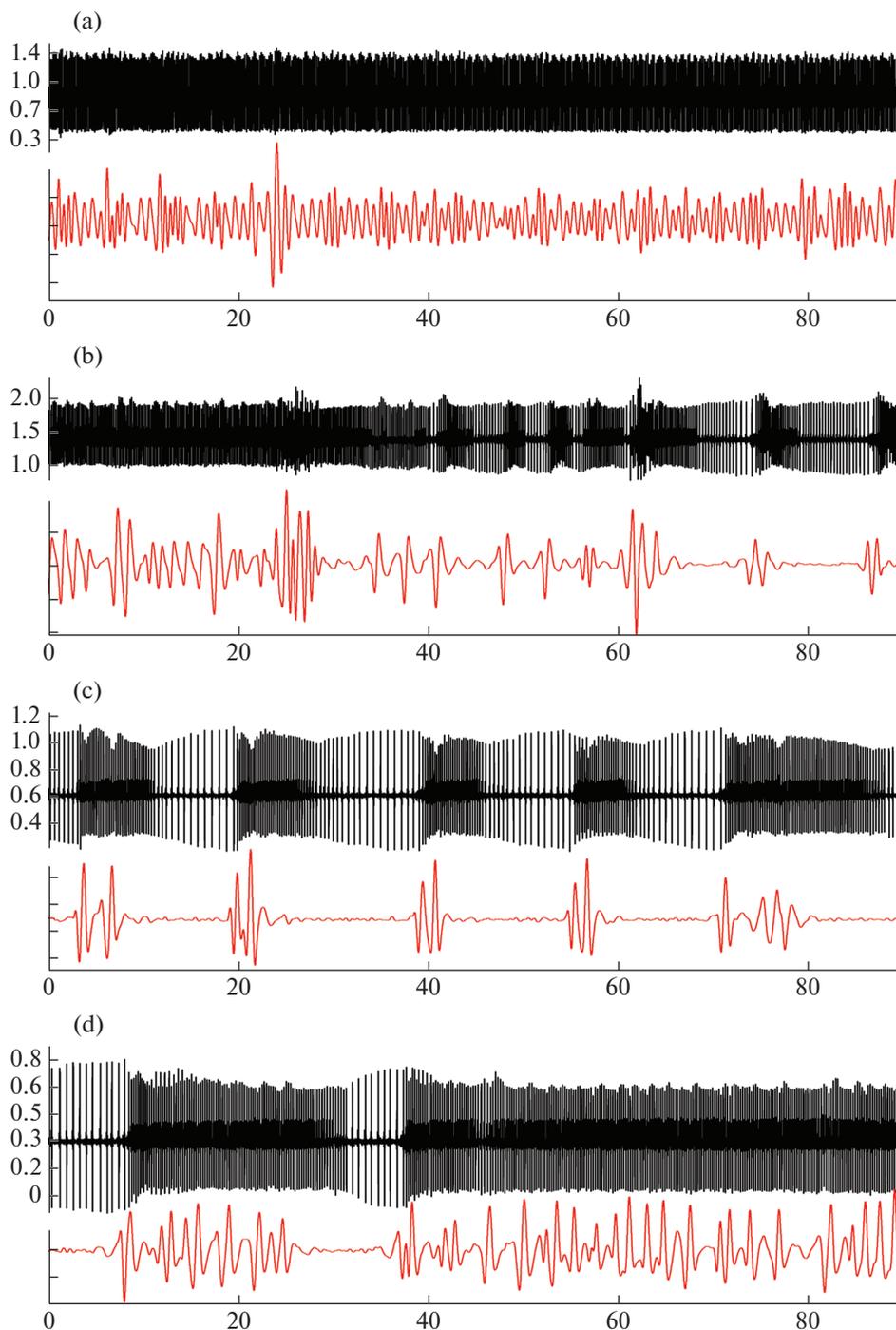


Рис. 1. Преходящие нарушения сердечного (верхняя кривая) и дыхательного (нижняя кривая) ритма у 11-дневного крысенка в фоне (а) и через 140 с (b), 660 с (c), 930 с (d) после инъекции NiCl_2 в дозе 109 мг/кг. Здесь и на рис. 2, 3: по оси абсцисс – время (с), по оси ординат – амплитуда ЭКГ (мВ) и пьезограммы дыхания (y.e.).

ным сдвигом в высокочастотную область, бимодальное распределение интервалов на 10–14-е сутки связано с возрастными различиями ЧСС, а у 15–16-дневных распределение приближается к нормальному (табл. 3). После введения препарата в первые две недели постнатального развития у кры-

сят происходит смещение интервалов в медленно-волновой диапазон, а также их выраженная локализация в области 360–180 мс. Интересный результат наблюдается на P15–16. Введение никеля сопровождается развитием брадикардии и, одновременно, стабилизацией сердечного ритма, при

Таблица 2. Изменение физиологических показателей у крысят в фоне и после инъекции NiCl₂ в разных дозах

Показатели	Фон	NiCl ₂		
	<i>M ± SEM</i>	<i>M ± SEM</i>	% к фону	% животных с наличием комплексов
3-и сутки, 14–27 мг/кг (n = 12)				
ЧСС в мин	311.0 ± 18.9	235.9 ± 9.2*	76	75
ЧДД в мин	110.1 ± 7.0	76.6 ± 3.6*	70	
КА, у.е.	0.26 ± 0.09	1.87 ± 0.45*	719	
3-и сутки, 55 мг/кг (n = 8)				
ЧСС в мин	286.4 ± 13.2	214 ± 25.4*	75	67
ЧДД в мин	96.4 ± 8.9	71.4 ± 7.6*	74	
КА, у.е.	0.29 ± 0.06	3.92 ± 0.99*	1352	
3-и сутки, 273 мг/кг (n = 8)				
ЧСС в мин	287.7 ± 2.0	134.7 ± 2.3*	47	100
ЧДД в мин	110.3 ± 5.0	75.3 ± 7.4*	68	
КА, у.е.	0.24 ± 0.01	4.73 ± 0.70*	1971	
15–16-е сутки, 273 мг/кг (n = 8)				
ЧСС в мин	487.0 ± 11.2	332.0 ± 36.7*	68	0
ЧДД в мин	135.7 ± 15.0	67.7 ± 5.2*	50	
КА, у.е.	0.11 ± 0.02	0.74 ± 0.19*	673	

Таблица 3. Показатели распределения RR-интервалов у крысят в фоне и после инъекции NiCl₂ в дозе 109 мг/кг

Возраст, сутки	Состояние	<i>M ± SEM</i>	Мода	Медиана	Коэффициент асимметрии	Коэффициент эксцесса
3	фон	0.202 ± 0.0001	0.192	0.199	0.388	-0.367
	NiCl ₂	0.376 ± 0.0012*	0.363	0.346	4.145	20.892
10–14	фон	0.129 ± 0.0001	0.126	0.126	1.187	0.178
	NiCl ₂	0.214 ± 0.0003*	0.203	0.199	4.885	34.392
15–16	фон	0.121 ± 0.00003	0.118	0.120	0.235	-0.473
	NiCl ₂	0.165 ± 0.0001*	0.177	0.165	0.056	-0.891

которой коэффициент асимметрии становится близким к нулю, а снижение коэффициента эксцесса может быть связано с постепенным развитием отрицательного хронотропного эффекта (табл. 3, рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Итак, нами обнаружена четкая возрастная зависимость выраженности аритмогенного эффекта, возникающего при блокаде T-VDCC и, возможно, NCX. У 100% крысят на P3 при инъекции NiCl₂ в дозе 109 мг/кг возникает преходящий атипичный сердечный ритм, параллельно развивается выраженная дисфункция дыхательной системы с пачечной формой дыхания. Данный симптомокомплекс

возникает у 75% 10–14-суточных крысят и полностью отсутствует у 15–16-суточных. Возрастная динамика выраженности разброса кардиоинтервалов после введения блокатора (рис. 4) коррелирует с экспрессией кальциевых каналов Cav3.2, описанной в ранний период перинатального онтогенеза [10, 17, 28].

В процессе развития происходят изменения I_{CaT} , который регистрируется во всех исследованных эмбриональных и неонатальных клетках, но сохраняется лишь у нескольких видов животных во взрослых интактных клетках желудочков миокарда. В предсердиях крысы изменения плотности I_{CaT} связаны в основном с изменением плотности каналов без изменения проводимости или стробирования (гейтинга) одного канала. В отличие от отно-

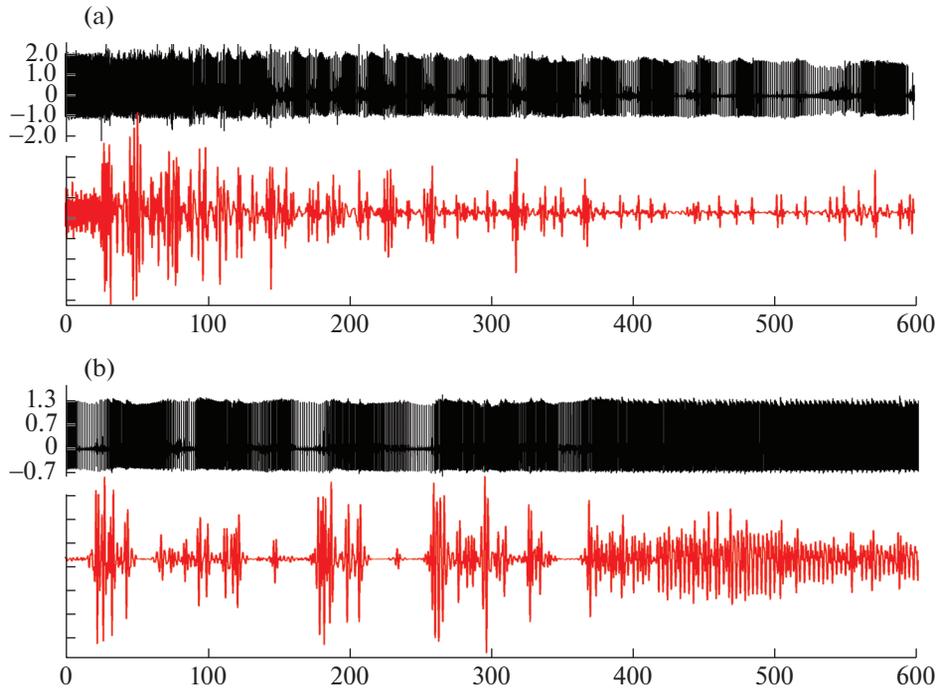


Рис. 2. Преходящие нарушения сердечного (верхняя кривая) и дыхательного (нижняя кривая) ритма у 3-дневного крысенка через 170 с (а) и 1250 с (б) после инъекции NiCl_2 в дозе 273 мг/кг.

сительно стабильного уровня плотности кальциевого тока L-типа, плотность I_{CaT} в предсердных миоцитах крыс достигает максимального уровня к 5-й неделе после рождения и затем начинает резко снижаться [29]. В опытах на изолированных миоцитах предсердий и желудочков крыс было осуществлено измерение плотности кальциевых токов L- и T-типа, начиная с 4-дневного (P4) и до взрослого (P120) возраста. Установлено, что I_{CaT} в клетках предсердия регистрируется уже в 4-дневных миоцитах предсердий крыс и достигает максимального уровня в 8-дневных. Плотность I_{CaT} снижается через 3 недели и остается низкой в миоцитах предсердий взрослых крыс. В клетках желудочков ситуация иная. Протекающий через T-VDCC ток также наблюдается у 8-дневных крысят, но затем исчезает у 3-недельных крыс, несмотря на наличие мРНК субъединиц $\alpha 1\text{G}$ ($\text{Cav}3.1$) и $\alpha 1\text{H}$ ($\text{Cav}3.2$) [25]. Сходные результаты получили и авторы другого исследования, в котором было показано, что I_{CaT} выражен в основном в кардиомиоцитах желудочков плода (E16–E18) и остается стабильным до рождения. Плотность I_{CaT} снижается вскоре после рождения (P1–P5) и не обнаруживается у 21-дневных крысят [17].

Во время созревания сердца существует взаимная связь между его морфогенезом и сократимостью. В раннем эмбриональном миокарде саркоплазматический ретикулум развит слабо, и кальциевые каналы плазматической мембраны имеют

решающее значение для поддержания как сократимости, так и возбудимости. На 6–9-е сутки постнатального периода в кардиомиоцитах крыс впервые визуализируются короткие T-трубочки, которые проникают вглубь цитоплазмы к 14–15-м суткам постнатального периода. Поперечная исчерченность саркоплазмы кардиомиоцитов крыс полностью формируется к 21-м суткам после рождения [30]. В первые 5 дней после рождения преобладает сарколеммальный поток Ca^{2+} , тогда как в возрасте 3 нед наиболее важным является Ca^{2+} -индуцированный выброс Ca^{2+} (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release, CICR) из саркоплазматического ретикулума. Исчезновение I_{CaT} совпадает с появлением CICR механизма электромеханической связи. У новорожденного животного сарколеммальный Ca^{2+} почти в равной степени проходит через Ca^{2+} -каналы T- и L-типа, а также через NCX. В опытах на изолированных сердцах крыс было показано, что введение Ni^{2+} вызывает снижение кальциевого транзientа на 93% в 1–3-и сутки и на 35% – на 3-й неделе. Мибефрадил, блокирующий преимущественно T-VDCC, снижает кальциевые токи на 75 и 16% соответственно. Это может свидетельствовать о возрастном снижении I_{CaT} при сохранении $I_{\text{Na-Ca}}$ [31]. Следует отметить, что исчезновение атипичного сердечного ритма, наблюдаемого нами на P15–16 после инъекции крысятам NiCl_2 , совпадает по времени с описанным выше торможением I_{CaT} .

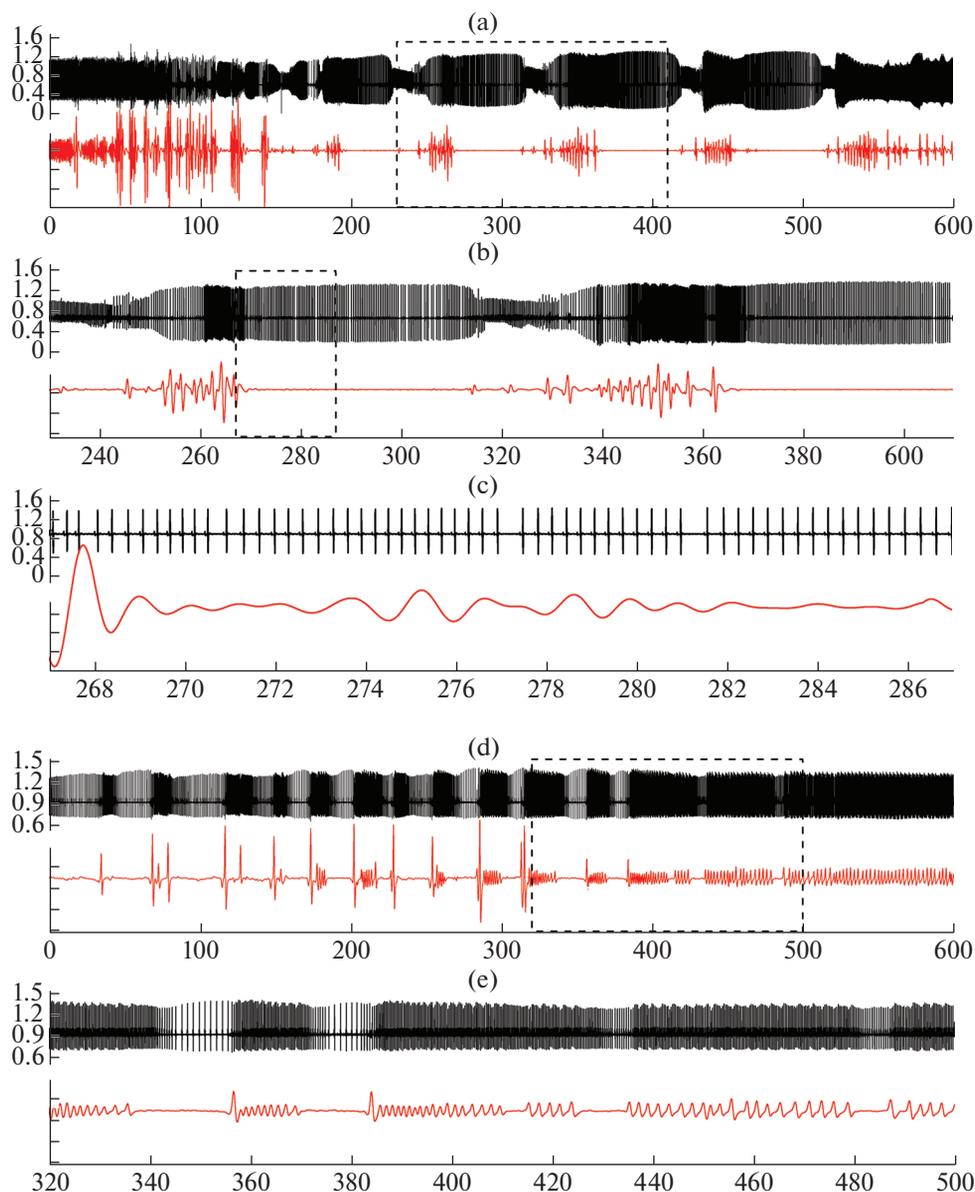


Рис. 3. Синхронизация комплексов сердечных сокращений (верхняя кривая) и всплеск дыхательного ритма (нижняя кривая) у 13-дневного крысенка через 150 с (а, b, c) и 1100 с (d, e) после инъекции NiCl₂ в дозе 109 мг/кг. На (b, d) – фрагменты записей (а, c), отмеченные прямоугольником; на (c) – фрагмент (b) с амплитудой пьезограммы дыхания, умноженной в 5 раз.

Обращает на себя внимание отсутствие явных различий в характере нарушений сердечного и дыхательного ритмов при введении хлорида никеля в дозе 109 мг/кг и выше (164–273). В работе Kang и соавт., выполненной в условиях *in vitro* на ооцитах лягушки, было показано, что дозозависимое ингибирующее действие никеля на Cav3.2 носит обратный экспоненциальный характер [20]. Это в какой-то мере согласуется и с тем, что влияние никеля на Cav3.2 характеризуется низким значением концентрации полумаксимального ингибирования [9]. Не исключено, что и на уровне целого ор-

ганизма сохраняется подобная зависимость “доза–эффект”, при которой дальнейшее увеличение дозы препарата не вызывает значимых изменений в характере реакций. Замещение первоначально возникающей пачечной формы сердечного ритма длительной многочасовой брадикардией может быть связано с различной аффинностью Cav3.1 и Cav3.2 подтипов T-VDCC или других ионных каналов (Cav2.3, NCX) к ионам никеля и, как следствие, с разделенным по времени нарушениям механизмов симпатической и парасимпатической иннервации.

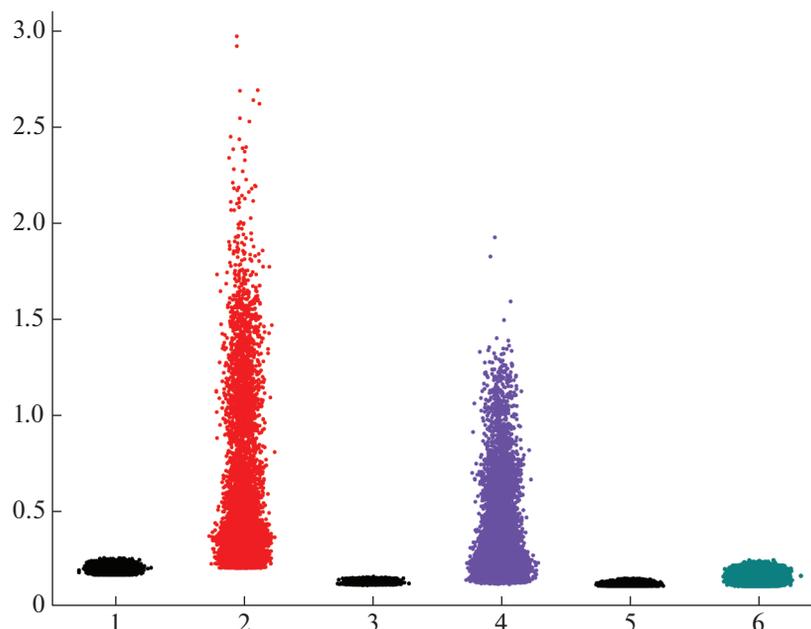


Рис. 4. Скаттерограмма RR-интервалов у крысят разных возрастных групп в фоне и после введения NiCl_2 в дозе 109 мг/кг. По оси абсцисс – группы животных: 1 – 3 сут, фон; 2 – 3 сутки, NiCl_2 , 3 – 10–14 сут, фон; 4 – 10–14 сут, NiCl_2 ; 5 – 15–16 сут, фон; 6 – 15–16 сут, NiCl_2 . По оси ординат – длительность сердечного цикла (с).

Возникающий у крысят после введения хлористого никеля атипичный сердечный ритм феноменологически сходен с тем, который мы наблюдали ранее при отравлении крысят ингибиторами ацетилхолинэстеразы фосфаколом или эзерином [2, 3], а также при активации центральных Н-холинореактивных структур [1, 32]. Участие холинорецепторов в регуляции кальциевого гомеостаза подтверждено опытами, выполненными в условиях *in vitro*. В экспериментах на морских свинках было показано, что NiCl_2 , как и М-холинолитик атропин, частично блокирует дополнительно усиленное параоксоном (фосфаколом) неквантовое высвобождение (non-quantal release, NQR) ацетилхолина из парасимпатических нейронов гладкой мускулатуры дыхательных путей, в которых присутствует и Ca^{2+} -зависимое неквантовое высвобождение ацетилхолина. Установлено, что торможение сократительной способности гладких мышц не связано с истощением нейронных везикул, а реализуется через неспецифические катионные каналы, в том числе и кальциевые [33].

Наряду с определенным сходством развития патологического процесса после введения хлорида никеля или после инъекции холиномиметиков [2, 3], существуют и явные различия. Так, при активации холинореактивных структур характерно возникновение синоатриальных и атриовентрикулярных блокад, которых не обнаружено после введения NiCl_2 . Еще одним отличием является длительность эффекта. После введения холиноми-

метиков нарушение ритма начинается через 10–15 мин и может продолжаться до 1.5–2 ч, часто заканчиваясь возникновением длительных периодов асистолии и остановкой сердца и дыхания. В случае инъекции хлорида никеля, амплитуда QRS комплекса ЭКГ сохраняется, аритмия возникает через 5–10 мин и, независимо от дозы препарата, заканчивается не более чем через 20–25 мин. Возникающая у 3–14-дневных крысят пачечная форма дыхания никогда нами не наблюдалась у животных после холинергической активации. Данные факты могут свидетельствовать как о наличии общих звеньев, так и различий в механизмах развития дизритмии. Мы надеемся, что дальнейшее исследование с предварительной блокадой холинорецепторов и последующим введением NiCl_2 позволит нам получить более четкое представление о возможных механизмах возникновения атипичного сердечного ритма у крысят.

Нам не удалось найти публикаций, свидетельствующих о возникновении функциональных нарушений дыхательной системы при отравлении хлоридом никеля. В опытах на взрослых крысах линии Sprague-Dawley, находящихся под уретановой анестезией и искусственной вентиляцией легких, было показано, что билатеральная микроинъекция NiCl_2 в каудальный отдел вентролатеральной области продолговатого мозга и комплекс пре-Бетцингера (preBötC) сопровождается уменьшением амплитуды разрядов диафрагмального нерва, но не вызывает замедления фазы выдоха и последующего прекращения дыхания, как это происходит в

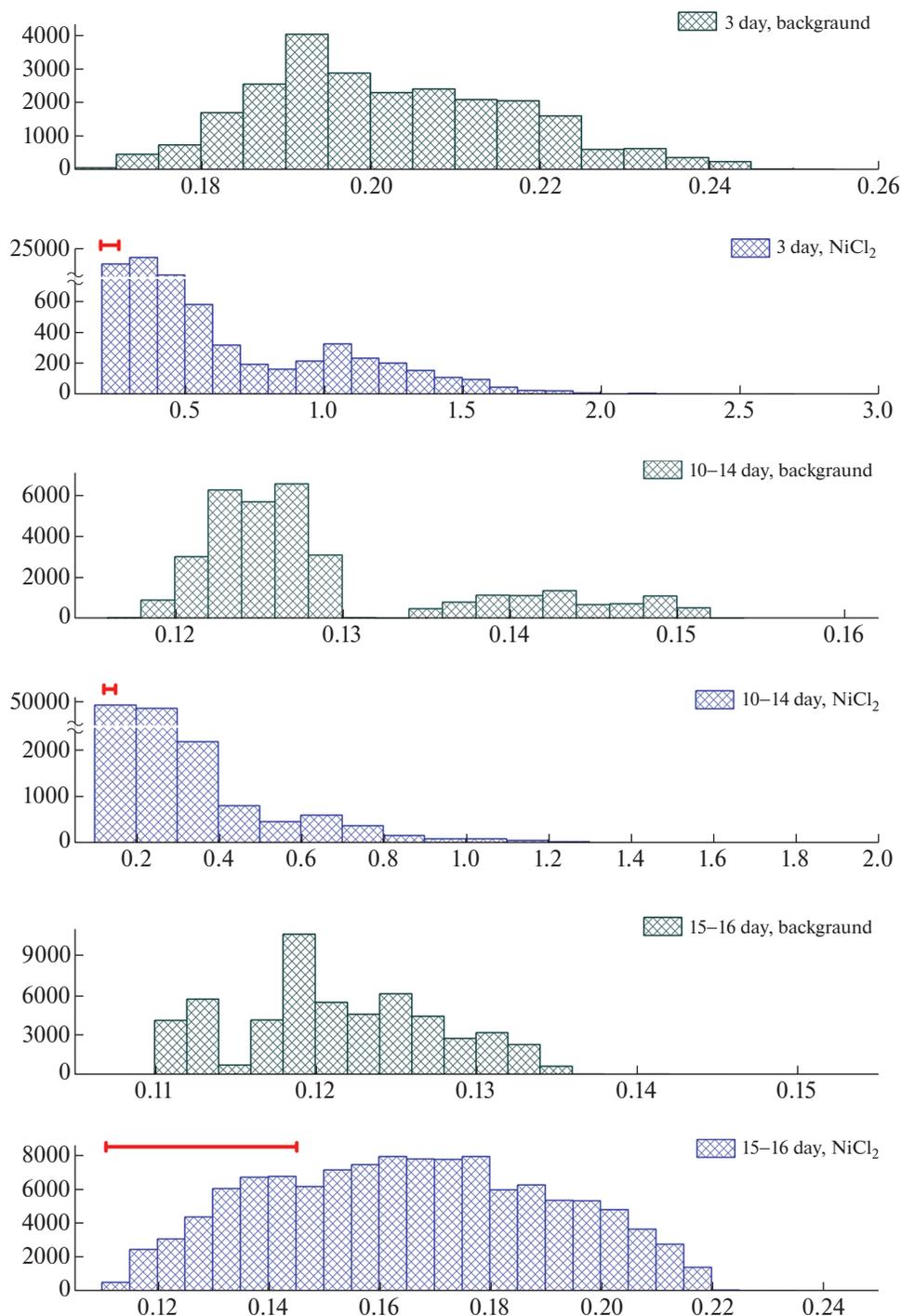


Рис. 5. Гистограммы распределения RR-интервалов у крысят разного возраста в фоне и после введения NiCl₂ в дозе 109 мг/кг.

По оси абсцисс – время (с), по оси ординат – совокупное количество циклов (Count bins).

Так как по оси абсцисс диапазоны значений в фоне и опыте различаются, для облегчения сопоставления результатов, горизонтальной линией над гистограммами показано расположение и диапазон RR-интервалов, соответствующий исходному (фоновому) состоянию.

случае применения антагониста NMDA-рецепторов кинурената или блокаторов высокопороговых Ca²⁺ каналов P/Q- и L-типа [34]. Кроме того, в

опытах на изолированных срезах каудального гипоталамуса взрослых крыс обнаружено угнетение никелем I_{CaT} , а также ритмической активности

нейронов, в условиях *in vivo* разряжающихся синхронно с дыхательными и сердечно-сосудистыми циклами [35]. Показано, что в первые 5 сут постнатального развития у крыс в *preBötC* обнаруживается очень мало пейсмекерных нейронов, у которых в основе генерации разрядов лежит Ca^{2+} -активируемый внутренний катионный ток [36], а функциональная значимость Ca^{2+} токов Т-типа возрастает во время онтогенетических преобразований механизмов генерации дыхательных ритмов [37]. Невозможно исключить, что наблюдаемые нами на P3–14 изменения ритма дыхания после воздействия хлоридом никеля связаны с возрастными особенностями колебаний кальциевых токов и перестройками нейрональной активности в *preBötC*. Вопрос о природе кардиореспираторных взаимодействий остается открытым и требует отдельного исследования.

Вопрос об участии NCX в возникновении атипичного сердечного ритма после введения $NiCl_2$ остается открытым и требует дальнейшего изучения. У крыс экспрессия натрий-кальциевого обменника возрастает в ходе эмбриогенеза, достигая максимальных значений на 18-е сутки пренатального периода и снижаясь до уровня взрослых к 20-му дню после рождения [38]. По данным других авторов максимальный уровень экспрессии NCX наблюдается у крысят в первые сутки после рождения и снижается до уровня взрослых уже к 12-му дню [16]. Ситуация осложняется еще и тем, что в нашем исследовании, при использовании системного введения ингибитора кальциевых каналов, мы неизбежно провоцируем изменения внутриклеточного гомеостаза кальция и, как следствие, изменения сопряженных с ним других ионных токов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В раннем постнатальном онтогенезе системное введение хлорида никеля, вызывающее нарушения кальциевого обмена, приводит к развитию патологического состояния с атипичным сердечным ритмом и нарушением дыхания. Возникающие дизритмии сходны с наблюдаемыми в перинатальный период у крыс после активации холинореактивных структур. Однако имеющиеся различия в характере возникающих патологических реакций могут свидетельствовать как о наличии общих звеньев, так и различий в механизмах развития аритмий.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны ведущему научному сотруднику Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН к.б.н. С.М. Короткову за ценные замечания при подготовке рукописи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-0152-22-00.

ВКЛАД АВТОРОВ

С.В.К. осуществлял планирование, сбор и обработку данных, написание статьи. Н.Н.К. осуществляла подготовку и проведение экспериментов, а также обработку данных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kuznetsov SV* (1994) Reproduction of the Primary Rhythms of Excitation in Cardiac Activity of Neonatal Rat Pups. *Bull Exp Biol Med* 117 (4): 421–423. <https://doi.org/10.1007/BF02444201>
2. *Kuznetsov SV, Goncharov NV, Glashkina LM* (2005) Change of Parameters of Functioning of the Cardiovascular and Respiratory Systems in Rats of Different Ages under Effects of Low Doses of the Cholinesterase Inhibitor Phosphacol. *J Evol Biochem Physiol* 41 (2): 201–210. <https://doi.org/10.1007/s10893-005-0055-x>
3. *Sizonov VA, Dmitrieva LE* (2018) Heart Rhythm Disturbances Caused by Injection of Cholinesterase Inhibitor Physostigmine to Rats during the Early Ontogeny. *Bull Exp Biol Med* 165 (1): 44–47. <https://doi.org/10.1007/s10517-018-4095-9>
4. *Кузнецов СВ, Кузнецова НН, Гайдукова ПА* (2019) Влияние блокады медленных кальциевых каналов L-типа на показатели сердечной, дыхательной и моторной деятельности у интактных и подвергшихся интоксикации эзеринном новорожденных крысят. *Обзоры клин фармакол и лекарств терапии* 17: 39–49. [*Kuznetsov SV, Kuznetsova NN, Gaydukova PA* (2019) Influence of L-type slow calcium channels blockers on cardiac, respiratory and motor activity at the intact and poisoned by physostigmine (eserine) of rats during the early ontogeny. *Rev Clin Pharmacol Drug Therapy* 17: 39–49. (In Russ)]. <https://doi.org/10.17816/RCF17339-49>
5. *Кузнецов СВ, Кузнецова НН* (2021) Влияние высоких доз убаина на показатели сердечной, дыхательной и моторной деятельности у новорожденных крысят. *Обзоры клин фармакол и лекарств терапии* 19: 395–403. [*Kuznetsov SV, Kuznetsova NN* (2021) Effects of high doses of ouabain on cardiac, respiratory, and motor activity at newborn rats. *Rev Clin Pharmacol Drug Therapy* 19: 395–403. (In Russ)]. <https://doi.org/10.17816/RCF194395-403>
6. *Кузнецов СВ, Кузнецова НН* (2020) Онтогенетические особенности влияния дантролена и кофеина на показатели сердечной, дыхательной и моторной деятельности у интактных и подвергшихся интоксикации эзеринном крысят. *Обзоры клин фармакол и ле-*

- карств терапии 18: 139–148. [Kuznetsov SV, Kuznetsova NN (2020) Ontogenetic peculiarities of the effect of dantrolene and caffeine on the cardiac, respiratory and motor performance of intact and poisoned by physostigmine of rats. *Rev Clin Pharmacol Drug Therapy* 18: 139–148. (In Russ)].
<https://doi.org/10.17816/RCF182139-148>
7. Massie BM (1997) Mibefradil: A Selective T-Type Calcium Antagonist. *Am J Cardiol* 80 (9A): 231–321.
[https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(97\)00791-1](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(97)00791-1)
 8. Hüser J, Blatter LA, Lipsius SL (2000) Intracellular Ca²⁺ release contributes to automaticity in cat atrial pacemaker cells. *J Physiol* 524 (Pt2): 415–422.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00415.x>
 9. Perez-Reyes E (2003) Molecular physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels. *Physiol Rev* 83: 117–161.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2002>
 10. Mangoni ME, Traboulsi A, Leoni AL, Couette B, Marger L, Le Quang K, Kupfer E, Cohen-Solal A, Vilar J, Shin HS, Escande D, Charpentier F, Nargeot J, Lory P (2006) Bradycardia and slowing of the atrioventricular conduction in mice lacking Ca_v3.1/α1G T-type calcium channels. *Circ Res* 98: 1422–1430.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000225862.14314.49>
 11. Mangoni ME, Nargeot J (2008) Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiol Rev* 88: 919–982.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2007>
 12. Ferron L, Capuano V, Ruchon Y, Deroubaix E, Coulombe A, Renaud JF (2003) Angiotensin II signaling pathways mediate expression of cardiac T-type calcium channels. *Circ Res* 93: 1241–1248.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000106134.69300.B7>
 13. Schaffer SW, Jong CJ (2015) Regulation of Cardiac Hypertrophy by T-Type Ca²⁺ Channel. In: *T-type Calcium Channels in Basic and Clinical Science* Springer-Verlag Wien 73–84.
<https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1413-1>
 14. Vassort G, Talavera K, Alvarez JL (2006) Role of T-type Ca²⁺ channels in the heart. *Cell Calcium* 640: 205–220.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.04.025>
 15. Suzuki S, Ohkusa T, Ono K, Sato T, Yoshida M, Yano M, Takebayashi S, Matsuzaki M (2007) Beneficial effects of the dual L- and T-type Ca²⁺ channel blocker efonidipine on cardiomyopathic hamsters. *Circ J* 71 (12): 1970–1976.
<https://doi.org/10.1253/circj.71.1970>
 16. Studer R, Reinecke H, Vetter R, Holtz J, Drexler H (1997) Expression and function of the cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger in postnatal development of the rat, in experimental-induced cardiac hypertrophy and in the failing human heart. *Basic Res Cardiol* 92 (1): 53–58.
<https://doi.org/10.1007/BF00794068>
 17. Ferron L, Capuano V, Deroubaix E, Coulombe A, Renaud JF (2002) Functional and molecular characterization of a T-type Ca⁽²⁺⁾ channel during fetal and postnatal rat heart development. *J Mol Cell Cardiol* 34: 533–546.
<https://doi.org/10.1006/jmcc.2002.1535>
 18. Satoh H (1995) Role of T-type Ca²⁺ channel inhibitors in the pacemaker depolarization in rabbit sino-atrial nodal cells. *Gen Pharmacol* 26 (3): 581–587.
[https://doi.org/10.1016/0306-3623\(94\)00214-8](https://doi.org/10.1016/0306-3623(94)00214-8)
 19. Lee JH, Gomora JC, Cribbs LL, Perez-Reyes E (1999) Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block α1H. *Biophys J* 77 (6): 3034–3042.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77134-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77134-1)
 20. Kang HW, Park JY, Jeong SW, Kim JA, Moon HJ, Perez-Reyes E, Lee JH (2006) A Molecular Determinant of Nickel Inhibition in Cav3.2 T-type Calcium Channels. *J Biol Chem* 281 (8): 4823–4830.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M510197200>
 21. Haverinen J, Hassinen M, Dash NS, Vornanen M (2018) Expression of calcium channel transcripts in the zebrafish heart: dominance of T-type channels. *J Exp Biol* 221 (Pt10): jeb179226.
<https://doi.org/10.1242/jeb.179226>
 22. Kimura J, Miyamae S, Noma A (1987) Identification of sodium-calcium exchange current in single ventricular cells of guinea-pig. *J Physiol* 384: 199–222.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1987.sp016450>
 23. Reppel M, Fleischmann BK, Reuter H, Pillekamp F, Schunkert H, Hescheler J (2007) Regulation of Na⁺/Ca²⁺ exchange current in the normal and failing heart. *Ann N Y Acad Sci* 1099: 361–372.
<https://doi.org/10.1196/annals.1387.065>
 24. Cheng H, Smith GL, Hancox JC, Orchard CH (2011) Inhibition of spontaneous activity of rabbit atrioventricular node cells by KB-R7943 and inhibitors of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase. *Cell Calcium* 49 (1): 56–65.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2010.11.008>
 25. Henderson RG, Durando J, Oller AR, Merkel DJ, Marone PA, Bates HK (2012) Acute oral toxicity of nickel compounds. *Regul Toxicol Pharmacol* 62 (3): 425–432.
<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.02.002>
 26. Singh PP, Junnarkar AY (1991) Behavioural and toxic profile of some essential trace metal salts in mice and rats. *Ind J Pharmacol* 23: 153–159.
 27. Yan XM, Tao ZQ, Liang YY, Chen ZJ, Zhang JS, Xu XH (1998) Effect of catecholamic acid on detoxication and distribution of NiCl₂ in mice and rats. *Acta Pharmacol Sinica* 19 (1): 80–84.
 28. Leuranguer V, Monteil A, Bourinet E, Dayanithi G, Nargeot J (2000) T-type calcium currents in rat cardiomyocytes during postnatal development: contribution to hormone secretion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H2540–H2548.
<https://doi.org/10.1152/10.1152/ajpheart.2000.279.5.H2540>
 29. Xu X, Best PM (1992) Postnatal changes in T-type calcium current density in rat atrial myocytes. *J Physiol* 454 (1): 657–672.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1992.sp019285>
 30. Seki S, Nagashima M, Yamada Y, Tsutsuura M, Kobayashi T, Namiki A, Tohse N (2003) Fetal and postnatal development of Ca²⁺ transients and Ca²⁺ sparks in rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 58 (3): 535–548.
[https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(03\)00255-4](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(03)00255-4)
 31. Escobar AL, Ribeiro-Costa R, Villalba-Galea C, Zoghbi ME, Perez CG, Mejia-Alvarez R (2004) Developmental changes of intracellular Ca²⁺ transients in beating rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286 (3): H971–H978.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00308.2003>

32. *Kuznetsov SV* (1995) N-cholinergic activation of periodic activity of excitable structures in early postnatal ontogenesis. *J Evol Biochem Physiol* 31 (2): 100–105.
33. *Chavez J, Vargas MH, Cruz-Valderrama JE, Montaña LM* (2011) Non-quantal release of acetylcholine in guinea-pig airways: role of choline transporter. *Exp Physiol* 96 (4): 460–467.
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.2010.056440>
34. *Miyawaki T, Goodchild AK, Pilowsky PM* (2003) Maintenance of sympathetic tone by a nickel chloride-sensitive mechanism in the rostral ventrolateral medulla of the adult rat. *Neuroscience* 116 (2): 455–464.
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00705-4](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00705-4)
35. *Fan Y-P, Horn EM, Waldrop TG* (2000) Biophysical characterization of rat caudal hypothalamic neurons: calcium channel contribution to excitability. *J Neurophysiol* 84: 2896–2903.
<https://doi.org/10.1152/jn.2000.84.6.2896>
36. *Del Negro CA, Morgado-Valle C, Hayes JA, Mackay DD, Pace RW, Crowder EA, Feldman JL* (2005) Sodium and Calcium Current-Mediated Pacemaker Neurons and Respiratory Rhythm Generation. *J Neurosci* 25 (2): 446–453.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2237-04.2005>
37. *Onimaru H, Ballanyi K, Richter DW* (1996) Calcium-dependent responses in neurons of the isolated respiratory network of newborn rats. *J Physiol* 491 (Pt 3): 677–695.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1996.sp021249>
38. *Koban MU, Moorman AF, Holtz J, Yacoub MH, Boheler KR* (1998) Expression analysis of the cardiac Na-Ca exchanger in rat development and senescence. *Cardiovasc Res* 37 (2): 405–423.
[https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(97\)00276-9](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(97)00276-9)

Effects Of Ni²⁺ On Cardiac And Respiratory Rhythms In Newborn Rats

S. V. Kuznetsov^{a,#}, and N. N. Kuznetsova^a

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

[#]*e-mail: ksv@iephb.ru*

The effect of Ni²⁺, a T-type low-threshold calcium channel (T-VDCC) and Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) blocker, on cardiac and respiratory rhythm parameters was studied in newborn rats aged 3–16 days (P3–16). A clear age dependence of the intensity of the arrhythmogenic effect arising from calcium channel blockade was found. In 3-day-old rats injected with NiCl₂ at a dose of 109 mg/kg (ED₁₀₀), a transient atypical cardiac rhythm, representing alternating periods of moderate bradycardia with a pathologically slow (up to 20–60 bpm) cardiac rhythm, occurs in 100% of animals. In parallel, a pronounced respiratory system dysfunction with a burst form of breathing develops. This symptom complex occurs in 75% of 10–14-day-old rats and is completely absent in 15–16-day-old animals. Phenomenologically similar cardiac rhythm disorders are observed in newborn rats after nickel chloride injection, during poisoning with acetylcholinesterase inhibitors, and activation of the central N-cholinergic structures. The obtained data suggest that in the early period of rat postnatal ontogenesis, impaired mechanisms of calcium metabolism may play a certain role in the development of arrhythmogenic disorders.

Keywords: newborn rats, dysrhythmia, heart rate, respiration, calcium channels, nickel chloride

ДИНАМИКА ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ И ТЕМПЕРАТУРЫ ТЕЛА У ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫХ ЛЕСНЫХ И ДОМАШНИХ КОТОВ В ОСЕННЕ-ЗИМНИЙ ПЕРИОД

© 2022 г. В. М. Ковальзон^{1,*}, А. Д. Комарова¹, Г. С. Алексеева¹,
М. Н. Ерофеева¹, С. В. Найденко¹

¹ Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия

*e-mail: kovalzon@sevin.ru

Поступила в редакцию 09.06.2022 г.

После доработки 22.07.2022 г.

Принята к публикации 24.07.2022 г.

У трех дальневосточных лесных котов (*Prionailurus bengalensis euptilura*) и четырех домашних котов (*Felis catus*) с предварительно вживленными (под общим наркозом) датчиками регистрировали глубокую подкожную температуру спины и двигательную активность в условиях вольерного содержания в течение двух месяцев в осенне-зимний период. Обнаружено, что осенью при положительной дневной температуре циркадианный ритм температуры тела отсутствует у дальневосточных лесных котов и слабо выражен у домашних котов. Однако он возникает в период зимних холодов в виде синхронных у всех животных колебаний с амплитудой 3–4°C, акрофазой в середине светлого периода суток и минимумом в середине ночи. При этом реальной связи с двигательной активностью у лесных котов не просматривается. Проведенная для сравнения регистрация активности и температуры “сердцевины” тела у двух домашних кошек, находящихся в это же время года в условиях лаборатории, не выявила никаких сопоставимых ритмов. Сделан вывод о том, что циркадианные биоритмы активности-покоя и подкожной температуры не являются постоянными характеристиками организма дальневосточных лесных и домашних котов, а могут возникать, исчезать и радикально изменяться при изменении окружающей температуры.

Ключевые слова: дальневосточный лесной кот, домашний кот, температура тела, двигательная активность

DOI: 10.31857/S0044452922050059

Дальневосточный (амурский) лесной кот (*Prionailurus bengalensis euptilura*) является северным подвидом бенгальской кошки. Этот малоизученный дикий вид обладает рядом интересных эколого-физиологических адаптаций, позволяющих ему переносить длительную и морозную зиму, хотя это животное не обладает способностью перемещаться по рыхлому снегу и не может охотиться в этот сезон [1–4]. Мы впервые предприняли попытку зарегистрировать с помощью вживленных датчиков циркадианные ритмы активности-покоя и температуры тела дальневосточных лесных котов в условиях вольерного содержания в осенне-зимний период.

Для сравнения аналогичная регистрация была параллельно проведена у домашних котов (*Felis catus*) в тех же условиях. Хотя кошки обоего пола были одним из самых распространенных лабораторных животных весь XX век и основным объектом сомнологических экспериментов, эколого-физиологические исследования на них никогда не проводились. Неизвестно, как ведет себя организм не

только дальневосточных лесных, но и домашних котов при постоянном пребывании в естественных или полустественных условиях. Есть только несколько довольно старых работ, где сопоставлялись циркадианные ритмы активности-покоя и температуры тела у кошек в лабораторных условиях, результаты которых весьма противоречивы и не очень убедительны [5–7]. Некоторые авторы полагают, что у домашних кошек вообще полностью отсутствуют закономерные суточные колебания цикла бодрствование-сон и температуры тела [8]. Чтобы убедиться в наличии (или отсутствии) циркадианной ритмики у этих животных в домашних условиях, результаты были сопоставлены с данными, полученными у двух лабораторных кошек.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все экспериментальные процедуры, выполненные в данном исследовании, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми ак-

тами РФ и принципам Базельской декларации, и одобрены биоэтической комиссией Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН.

Несколько дальневосточных лесных и домашних котов с момента рождения находятся в условиях постоянного содержания в просторных индивидуальных вольерах в лесном массиве в Центре коллективного пользования “Живая коллекция диких видов млекопитающих” на территории научно-экспериментальной базы “Черноголовка” Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН. В каждой вольере имеется небольшой домик-укрытие с подстилкой из сена. Вольеры находятся при естественном освещении; ни в самих вольерах, ни на прилегающей территории дополнительной подсветки нет. Животные получают нормированный корм (200 г куриного фарша) раз в день около 18 ч 6 дней в неделю. Трех взрослым дальневосточным лесным котам (возраст 2–3 года, масса тела 5–6 кг) и четырьмя взрослым домашними котами (возраст 2–3 года, масса тела 4 кг) под наркозом (для дальневосточных лесных котов – 0.1 мг золетила + 0.7/0.8 мг рометара на животное; для домашних котов – 0.08 мг золетила + 0.6/0.7 мг рометара на животное; в/м) вживили через небольшой разрез на холке экологгеры (миниатюрные автономные термодатчики, снабженные акселерометрами, производства ООО “Эмби Ресерч”, Новосибирск [9]) между мышцами межлопаточной области спины, на глубину 2–3 см от поверхности тела. Разрез зашили, животным ввели антибиотик и поместили обратно в свои вольеры.

Глубокую подкожную температуру тела измеряли в °C, а двигательную активность – в условных единицах (долях G, где dG – результирующее ускорение по трем направлениям). Датчики температуры и двигательной активности производят измерения каждую минуту, усредняют их за период, установленный пользователем, и хранят на внутреннем накопителе. В данном исследовании этот период составлял 10 мин. В таком режиме заряда батареи экологгера хватает на 9–10 нед. Регистрация продолжалась 65 сут в осенне-зимний период, с 28.10.2021 по 05.01.2022. По окончании опыта животные были вновь наркотизированы таким же образом, датчики извлечены, разрез зашит, животным введен антибиотик, и они помещены обратно в свои вольеры.

Для сравнения у двух лабораторных кошек с хронически вживленными (для целей другого эксперимента) интрагастральными фистулами по И.П. Павлову была проведена аналогичная регистрация путем помещения экологгеров внутрь фистулы. У одной кошки (№ 1) регистрация была проведена в летне-осенний (22.08–01.10.2019), у другой (№ 2) – в осенне-зимний (22.10–28.12.2021)

период. Все это время кошки находились в лабораторном помещении при комнатной температуре и, главным образом, естественном освещении (верхний свет не включался), вода и пища были доступны постоянно.

Данные с накопителей датчиков были считаны специальным устройством и обработаны в программе Excel с определением средних значений и стандартной ошибки ($M \pm SEM$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Как видно из фрагментов записей дальневосточных лесных котов (рис. 1), динамика регистрируемых показателей в осенний (31.10–10.11.2021) и зимний (26.12.2021–03.01.2022) периоды сильно различалась. Посуточное усреднение данных (рис. 2, левая часть) это наблюдение подтверждает. В осенний период, когда средняя температура воздуха составляла +6°C днем и +4°C ночью, никакого циркадианного ритма температуры тела не наблюдалось. Глубокая подкожная температура спины демонстрировала случайные колебания около “установленной точки” 36.1°C. Двигательная активность, напротив, претерпевала закономерный циркадианный сдвиг с более низкими значениями в светлое время суток, что естественно для ночных хищников. Однако с наступлением холодов (–9°C днем и –13°C ночью) динамика глубокой подкожной температуры спины значительно изменялась (рис. 2, правая часть). Ночью, с ежесуточным понижением окружающей температуры, подкожная температура дальневосточных лесных котов опускалась до 33.2°C. Примерно с полуночи начинался быстрый рост температуры тела, достигавший максимума (36.5°C) с наступлением рассвета и сохранявшийся в виде плато в течение пяти наименее холодных дневных часов. Затем с началом похолодания начинался ее постепенный спад, завершавшийся в период между полуночью и часом ночи. Среднее значение глубокой подкожной температуры спины у дальневосточных лесных котов в зимнее время составляло 35.1°C, на 1°C ниже, чем в осенний период. Эти колебания температуры тела происходили синхронно и синфазно у всех трех животных, отражая, в целом, динамику температуры окружающего воздуха в зимнее время – максимальную после полудня и минимальную в ночные предутренние часы. При этом ритм двигательной активности животных сглаживался, и различие между уровнем дневной и ночной активности исчезало.

У домашних котов (рис. 3 и 4) в осенний период глубокая подкожная температура спины колебалась около “установленной точки” 36.9°C. При этом ночью, с понижением температуры воздуха, она немного опускалась, достигая минимума (36.2°C) к 5 ч утра, и затем быстро поднималась, достигая к рассвету (6:30–7 ч) 37.5°C. После рассвета

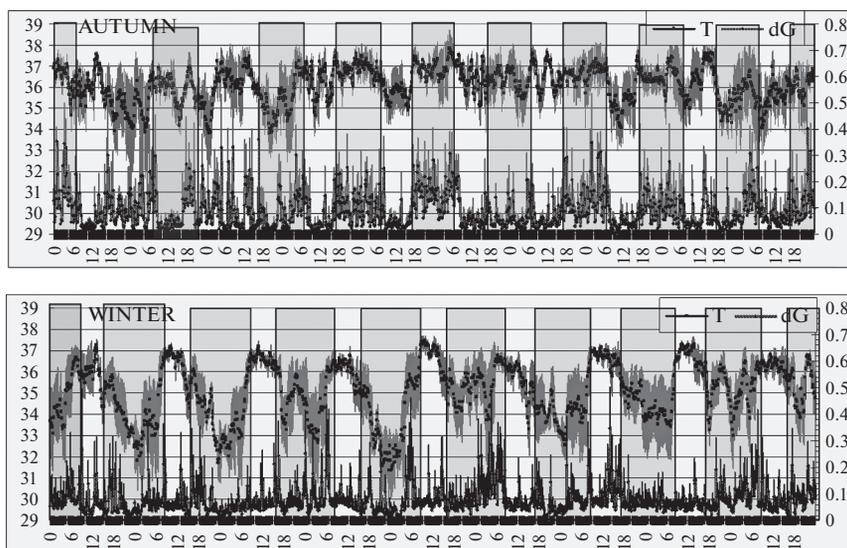


Рис. 1. Коты дальневосточные лесные. Фрагменты 2-месячной записи. Вверху: температура тела (Т, верхние кривые) и двигательная активность (dG, нижние кривые) в осенний период (с 31.10 по 10.11. 2021). Усредненные данные по трем животным ($M \pm SEM$). По оси абсцисс – время суток в часах. По левой ординате – глубокая подкожная температура межлопаточной области спины (масштаб $10^\circ\text{C}/\text{шкалу}$). По правой ординате – показания акселерометра (масштаб $0.8 \text{ dG}/\text{шкалу}$). Затемненные участки – ночные периоды.

Внизу: то же в зимний период, с 26.12.2021 по 04.01.2022.

подкожная температура резко падала до 36.4°C и вновь возрастала до 38°C к 13 ч (полдень по местному солнечному времени). Затем подкожная температура домашних котов претерпевала постепенное волнообразное снижение. Двигательная активность существенно не менялась, однако заметно, что оба подъема температуры тела (в 6 и 13 ч) сочетались с небольшим повышением значения dG.

В зимнее время подкожная температура спины ночью опускалась до 34.4°C . Примерно с 3 ч ночи, несмотря на предельно низкую окружающую температуру, начинался подъем подкожной температуры, достигавший акрофазы (38.3°C) к 14 ч (когда отмечалось максимальное значение температуры окружающего воздуха), после чего происходил резкий спад, завершавшийся около 19 ч. С 19 до 3 ч температура тела домашних котов сохранялась на низком уровне 34.4°C – 35°C . Среднее значение глубокой подкожной температуры спины у домашних котов в зимнее время составляло 35.8°C , на 1.1°C ниже, чем в осенний период. Что касается двигательной активности, то отмечался ее выраженный пик, максимум которого совпадал с акрофазой температуры тела. Все эти колебания происходили синхронно и синфазно у всех четырех котов.

У лабораторных кошек, содержащихся при комнатной температуре и естественном освещении, значительных и закономерных колебаний температуры датчика, находящегося в фистуле желудка, не отмечалось, за исключением небольшого (на 0.3°C) спада температуры тела в момент восхода солнца (рис. 5 и 6). В целом температура в поло-

сти желудка была гораздо выше, чем между мышцами спины (в среднем 38.5°C – 38.6°C против 36.9°C) и более стабильна, отражая, очевидно, терморегуляцию “сердцевины” тела. Показатель двигательной активности у кошки № 1 демонстрировал небольшие аperiодические подъемы, но никакой закономерной связи со световым циклом не проявлялось.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Циркадианные ритмы активности и температуры тела находятся под воздействием внешних факторов – окружающей температуры и освещенности. Однако лишь у представителей нескольких видов млекопитающих проводились сезонные исследования активности – покоя и температуры тела – у овцы [10] и лошади [11], у гигантской африканской крысы [12], росомахи [13] и антилопы орикс [14]. У кошачьих подобные исследования в литературе не представлены. Настоящее исследование показывает, что циркадианные биоритмы активности-покоя и глубокой подкожной температуры тела не являются постоянными характеристиками организма дальневосточных лесных и домашних котов, а могут возникать, исчезать и радикально изменяться при изменении окружающей температуры. При положительных значениях температуры окружающего воздуха циркадианный ритмик подкожной температуры спины дальневосточных и домашних котов и кошек слабо выражена или полностью отсутствует. Обитающие в ана-

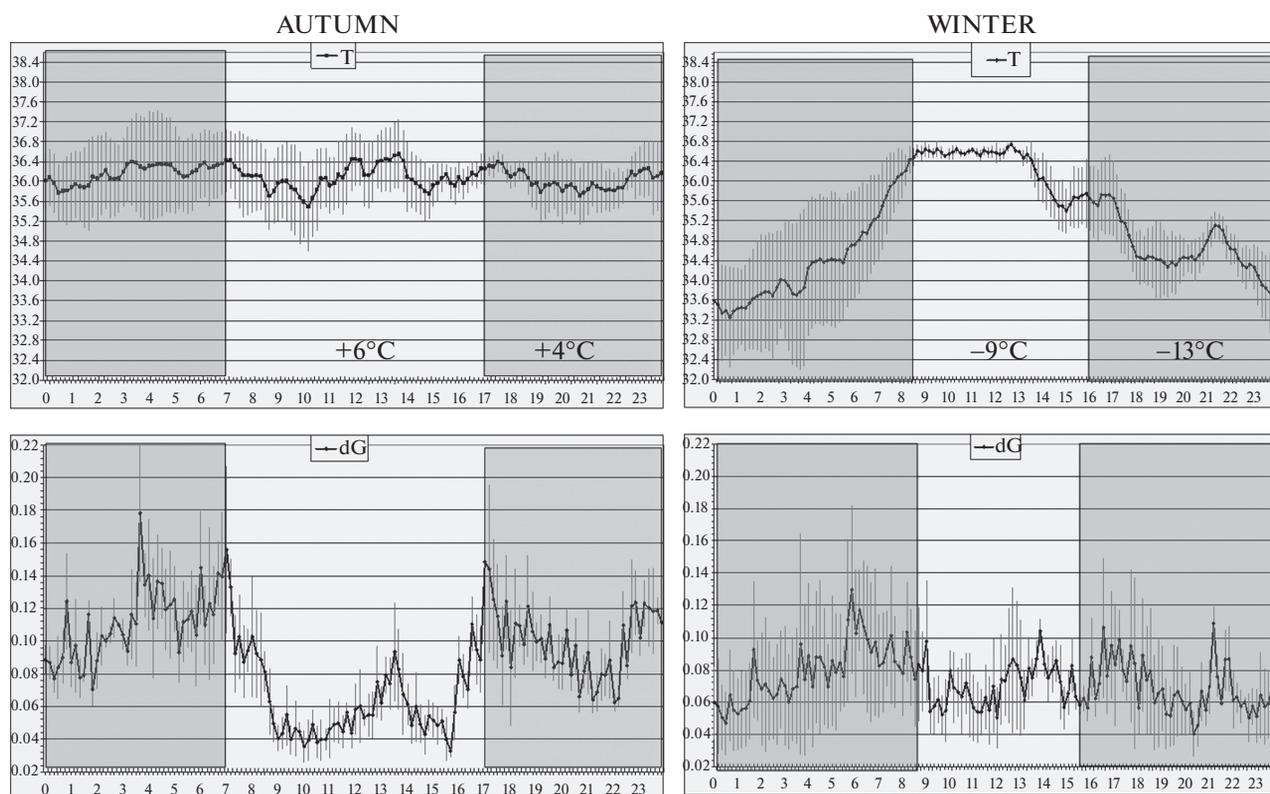


Рис. 2. Коты дальневосточные лесные. Внутрисуточная динамика температуры тела (вверху) и двигательной активности (внизу), усреднение по 3 животным \times 10 сут ($M \pm SEM$) осенью (слева, среднесуточная температура $+6^{\circ}\text{C}$ днем и $+4^{\circ}\text{C}$ ночью) и зимой (справа, среднесуточная температура -9°C днем и -13°C ночью). По осям абсцисс – время суток в часах. По осям ординат, вверху – глубокая подкожная температура спины (масштаб $6.4^{\circ}\text{C}/\text{шкалу}$), внизу – показания акселерометра (масштаб $0.2 \text{ dG}/\text{шкалу}$). Затемненные участки – ночные периоды.

логичных условиях на научно-экспериментальной базе “Черноголовка” мелкие хищники – соболя и хорьки – также демонстрируют в осенний период слабо выраженную циркадианную ритмику активности – покоя и температуры брюшной полости, нечетко связанную с изменением освещенности [15]. Однако при отрицательных окружающих температурах у котов возникают ритмические колебания подкожной температуры. При этом синхронность и синфазность возникающих биоритмов у всех животных указывают на то, что они подчиняются определенному внешнему ритмоводителю (ритмоводителем). Судя по полученным нами данным, такими ритмоводителями являются суточные колебания внешней температуры и смена дня и ночи. Очевидно, что с наступлением морозной погоды организм животного, живущего в вольерных условиях, вынужден приспосабливаться, сохраняя относительно постоянство температуры “сердцевины” тела. Для этого животное предельно снижает теплоотдачу, сокращая периферический кровоток, что отражается в динамике глубокой подкожной температуры. Эти циклические колебания, в свою очередь, отражают температуру окружающего воздуха (максимальную в послеполуденное время и

минимальную – в ночные предутренние часы). Интересно, что аналогичная динамика подкожной температуры, отражающая температуру окружающей среды, отмечается и при адаптации к высоким температурам у орикса [14].

Что касается двигательной активности, то дальневосточные лесные коты, накопившие к зиме толстый подкожный жировой слой, не демонстрируют никакой потребности в дополнительном мышечном разогреве. Их двигательная активность зимой в ночное время несколько снижается, а в дневное – повышается, так что в целом она зимой не выше, чем осенью. Домашние же коты, не имеющие столь мощной “термоизоляции”, вынуждены перемещаться по вольеру для дополнительного разогрева. Неожиданным при этом оказалось повышение двигательной активности в *дневное* время в осенний и, в особенности, зимний период у “ночных” хищников – домашних котов.

Наши опыты с регистрацией температуры “сердцевины” тела у пары домашних кошек подтверждают точку зрения Jouvet и других авторов об отсутствии циркадианных ритмов активности-покоя и температуры тела у этих животных при постоянном пребывании в условиях комнатной тем-

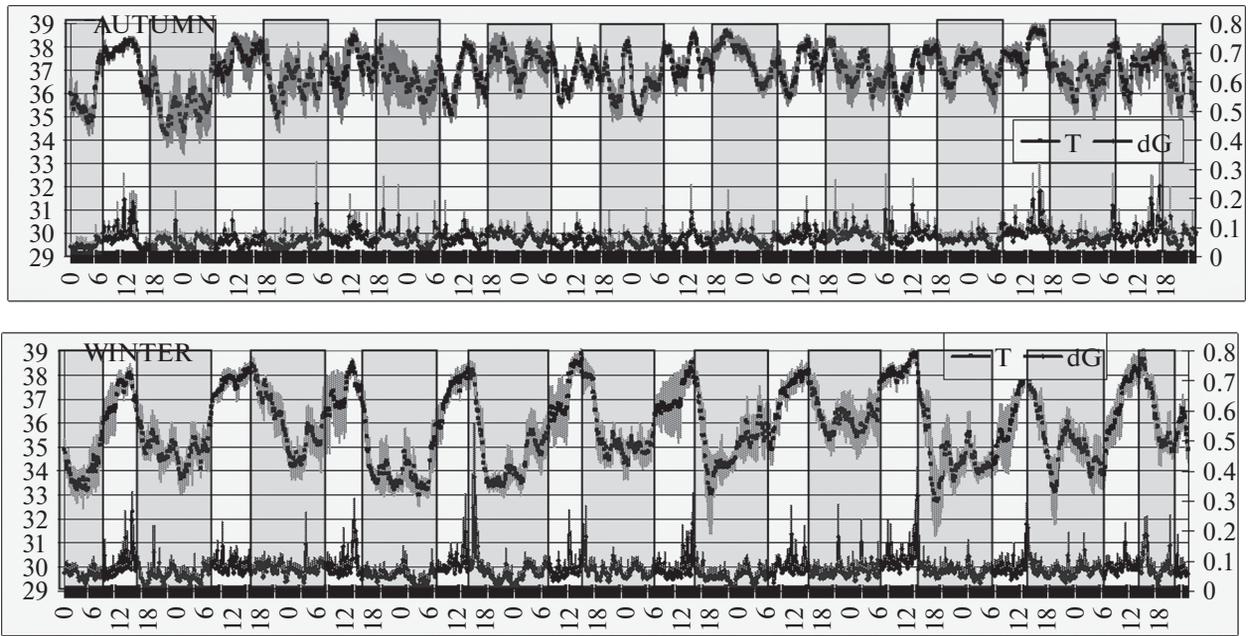


Рис. 3. Коты домашние. Усредненные данные по 4 животным ($M \pm SEM$). Обозначения – как на рис. 1.

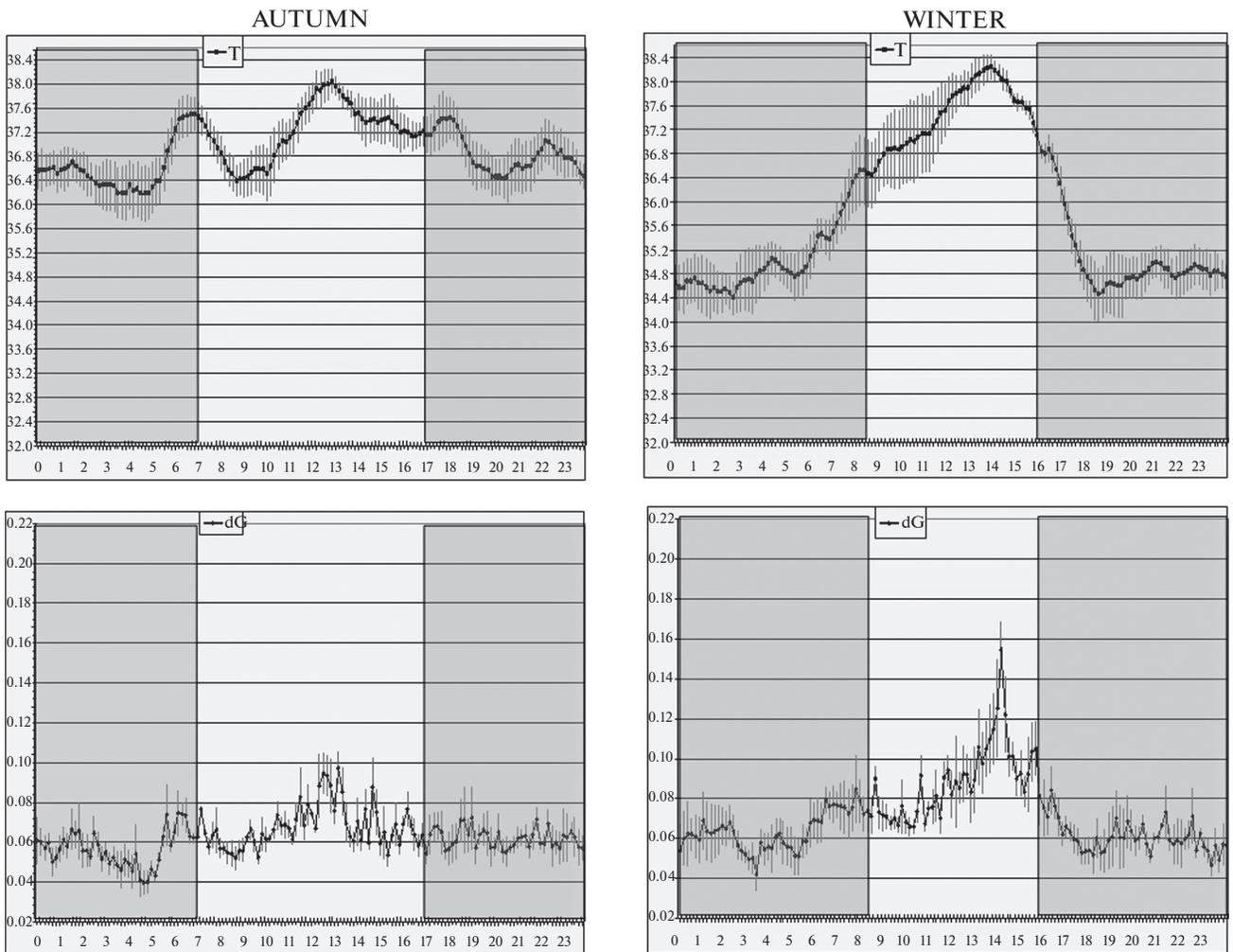


Рис. 4. Коты домашние. Усреднение по 4 животным \times 10 сут ($M \pm SEM$). Обозначения – как на рис. 2.

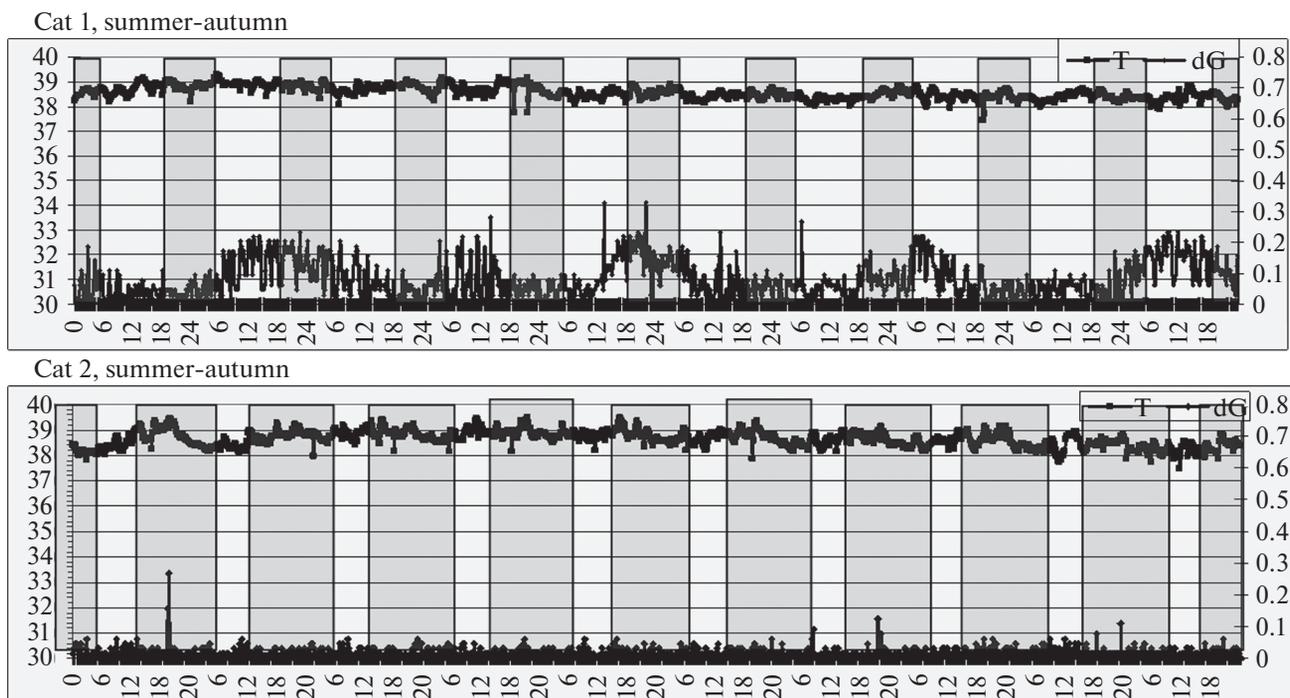


Рис. 5. Вверху: кошка домашняя лабораторная № 1. Фрагмент 1,5-месячной записи в летне-осенний период (30.08–11.09.2019) в масштабе 10°C/шкалу (как на рис. 1 и 3). Внизу: то же, кошка № 2, зимний период (17–26.12.2021). Прочие обозначения – как на рис. 1.

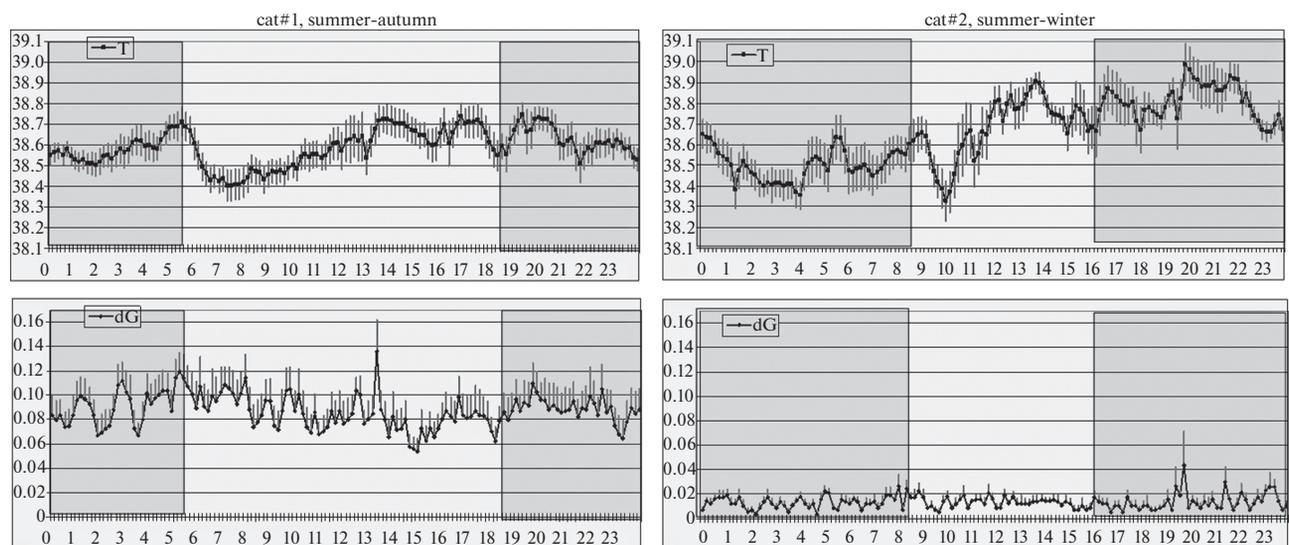


Рис. 6. Слева: кошка домашняя лабораторная № 1, летне-осенний период.

Справа: кошка домашняя лабораторная № 2, осенне-зимний период. Масштаб: 1°C/шкалу и 0.17 dG/шкалу для верхней и нижней оси ординат соответственно.

Прочие обозначения – как на рис. 2.

пературы [5, 8]. Эти ритмы формируются, очевидно, под воздействием внешних факторов, главным из которых является низкая окружающая температура. Обращает на себя внимание четкий температурный спад, возникающий с рассветом у домашних кошек. По усредненным данным этот спад

оказывался весьма сходен с таковым у домашних котят, живущих в вольерных условиях при значительно более низких осенних температурах, но в 5 раз меньше по амплитуде (ср. рис. 6 и рис. 4). Этот спад отмечался при усреднении у всех шести домашних животных, участвовавших в настоящем

исследовании, независимо от пола, окружающих условий и локализации датчика, и различался лишь по амплитуде. Это позволяет считать такое колебание реальным маркером циркадианной ритмики температуры тела домашних кошек.

Сопоставление настоящих результатов с нашими предыдущими [15] и литературными данными [16–19] показывает, что у млекопитающих существуют, по крайней мере, три различные стратегии адаптации к холоду.

(1) Гибернация и торпор [16–19].

(2) Повышение поведенческой активности, направленное на дополнительный разогрев тела, в 12-часовой активный период суток, с достижением максимальной температуры тела (брюшной полости) в *середине субъективной ночи*, что позволяет животному (факультативным гибернаторам – монгольским хомячкам) сохранять внутреннее тепло в 12-часовые периоды поведенческого покоя (субъективно – дневные). Отражается в повышении амплитуды синхронных циркадианских ритмов температуры тела (в три раза, от 0.5 до 1.6°C) и двигательной активности (в 2 раза) [15].

(3) Использование дрожательного и недрожательного термогенеза [18] без выраженной поведенческой активации в ночной и утренний периоды с достижением максимальной подкожной температуры в *середине дня* (дальневосточные лесные и домашние коты). Отражается в формировании четкого циркадианного ритма подкожной температуры (с амплитудой колебаний 3–4°C) без значительных изменений (по крайней мере, у дальневосточных лесных котов) показателя двигательной активности.

Таким образом, настоящее исследование представляет собой первую попытку зафиксировать такие фундаментальные характеристики, как циркадианские ритмы температуры тела и уровня двигательной активности при различной окружающей температуре, у дальневосточных лесных котов в сопоставлении с их домашними сородичами.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы благодарят Г.Н. Фесенко за участие в настоящем исследовании и анонимного рецензента журнала за внимательное прочтение текста и ценные замечания, позволившие его значительно улучшить.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (В.М.К. и С.В.Н.), сбор данных (А.Д.К., Г.С.А, М.Н.Е), обработ-

ка данных (В.М.К.), написание и редактирование манускрипта (В.М.К., С.В.Н.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Павлова ЕВ, Найдено СВ (2008) Неинвазивный мониторинг глюкокортикоидов в экскрементах дальневосточного лесного кота (*Prionailurus bengalensis euptilurus*). Зоол журн 87 (11): 1375–1381. [Pavlova EV, Naidenko SV (2008) Noninvasive monitoring of glucocorticoids in feces of the Bengal cat (*Prionailurus bengalensis euptilurus*). Zool J 87 (11): 1375–1381. (In Russ)].
2. Antonevich AL, Alekseeva GS, Vasilieva NA, Pavlova EV, Loshchagina JA., Duplyakina SYu, Naidenko SV (2019) Social play changes reflect differences in biology and development of three felids. Rus J Theriol 18 (2): 80–90. <https://doi.org/10.15298/rusjtheriol.18.2.02>
3. Seryodkin IV, Burkovskiy OA (2019) Food habit analysis of the Amur leopard cat *Prionailurus bengalensis euptilurus* in the Russian Far East. Biol Bull 46 (6): 648–653. <https://doi.org/10.1134/S1062359019660038>
4. Naidenko S, Chistopolova M, Hernandez-Blanco JA, Erofeeva M, Rozhnov V (2021) The effect of highway on spatial distribution and daily activity of mammals. Transp Res Part D 94: 102808. <https://doi.org/10.1016/j.trd.2021.102808>
5. Hawking F, Lobban MC, Gammage K, Worms MJ (1971) Circadian rhythms (activity, temperature, urine and microfilariae) in dog, cat, hen, duck, thamnomyx and gerbillus. J Interdiscipl Cycle Res 2 (4): 455–473. <https://doi.org/10.1080/09291017109359289>
6. Kuwabara N, Seki K, Aoki K (1986) Circadian, sleep and brain temperature rhythms in cats under sustained daily light-dark cycles and constant darkness. Physiol Behav 38 (2): 283–289.
7. Randall W, Cunningham JT, Randall S, Liittschwager J, Johnson RF (1987) A two-peak circadian system in body temperature and activity in the domestic cat, *Felis catus*. J Therm Biol 12 (1): 27–37.
8. Jouvet M (2016) Le sommeil, la conscience et l'éveil. Paris, Odile Jacob. [Рус. пер.: Жуве М (2021) Наука о сне. Кто познает тайну сна – познает тайну мозга! М. АСТ].
9. Петровский ДВ, Ромащенко АВ, Троицкий СЮ, Мошкин МП (2015) Межлинейные различия мышей по температурной реакции на интраназальное введение наночастиц оксида платины. Вавиловск журн ген сел 19 (4): 439–444. [Petrovskii DV, Romashchenko AV, Troitskii SYu, Moshkin MP (2015) Between-strain differences in hypothermic response in mice after intranasal administration of Pto nanoparticles. Vavilovsk Zhurn Genetiki Selektcii – Vavilov J Gen Breed 19 (4): 439–444. (In Russ)]. <https://doi.org/10.18699/VJ15.058>
10. Fuchs B, Sørheim KM, Chincarini M, Brunberg E, Stubbsjøen SM, Bratbergsengen K, Hvasshovd SO, Zimmermann B, Lande US, Grøva L (2019) Heart rate sensor validation and seasonal and diurnal variation of body temperature and heart rate in domestic sheep. Vet Anim Sci 8: 100075 <https://doi.org/10.1016/j.vas.2019.100075>

11. *Giannetto C, Aragona F, Arfuso F, Piccione G, De Caro S, Fazio F* (2022) Diurnal variation in rectal and cutaneous temperatures of horses housed under different management conditions. *Int J Biometeor* 66 (8): 1601–1611. <https://doi.org/10.1007/s00484-022-02304-3>
12. *Dzenda T, Ayo JO, Lakpini CAM, Adelaiye AB* (2011) Diurnal, seasonal and sex variations in rectal temperature of African giant rats (*Cricetomys gambianus*, Waterhouse). *J Therm Biol* 36: 255–263. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2011.03.010>
13. *Thiel A, Evans AL, Fuchs B, Arnemo JM, Aronsson M, Persson J* (2019) Effects of reproduction and environmental factors on body temperature and activity patterns of wolverines. *Front Zool* 16: 21. <https://doi.org/10.1186/s12983-019-0319-8>
14. *Davimes JG, Alagaili AN, Bhagwandin A, Bertelsen MF, Mohammed OB, Bennett NC, Manger PR, Gravett N* (2018) Seasonal variations in sleep of free-ranging Arabian oryx (*Oryx leucoryx*) under natural hyperarid conditions. *Sleep* 41: 5. <https://doi.org/10.1093/sleep/zsy038>
15. *Kovalzon VM, Averina OA, Minkov VA, Petrin AA, Vysokikh MYu* (2020) Unusual correlation between rest–activity and body temperature rhythms in the naked mole rat (*Heterocephalus glaber*) as compared to five other mammalian species. *J Evol Biochem Physiol* 56 (5): 451–458. <https://doi.org/10.1134/S0022093020050087>
16. *Пастухов ЮФ, Максимов АЛ, Хаскин ВВ* (2003) Адаптация к холоду и условиям субарктики: проблемы термофизиологии, Т. 1. Магадан. МНИЦ “Арктика”. [*Pastukhov YuF, Maksimov AL, Haskin VV* (2003) Adaptation to cold and subarctic conditions: the problems of thermophysiology, V. 1. Magadan. ISRC “Arktika”. (In Russ)].
17. *Mohr SM, Bagriantsev SN, Gracheva EO* (2020) Cellular, molecular, and physiological adaptations of hibernation: The solution to environmental challenges. *Annu Rev Cell Dev Biol* 36: 13.1–13.24. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-012820-09594>
18. *Frare C, Williams CT, Drew KL* (2021) Thermoregulation in hibernating mammals: The role of the “thyroid hormones system”. *Mol Cell Endocrinol* 519: 111054. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.111054>
19. *Junkins MS, Bagriantsev SN, Gracheva EO* (2022) Towards understanding the neural origins of hibernation. *J Exp Biol* 225 (1): jeb229542. <https://doi.org/10.1242/jeb.229542>

Motor Activity Dynamics and Body Temperature in Far Eastern Forest and Domestic Cats in the Fall–Winter Period

V. M. Kovalzon^{a, #}, A. D. Komarova^a, G. S. Alekseeva^a, M. N. Erofeeva^a, and S. V. Naidenko^a

^a *Severtsov Institute of Ecology and Evolution RAS, Moscow, Russia*

[#]*e-mail: kovalzon@sevin.ru*

In three Far Eastern male forest cats (*Prionailurus bengalensis euptilura*) and four male domestic cats (*Felis catus*) with preimplanted (under general anesthesia) loggers, deep subcutaneous back temperature and motor activity were recorded in captive conditions for two months in the fall–winter period. It was found that in fall, at positive daytime temperatures, the circadian rhythm of body temperature is absent in Far Eastern forest cats and weakly expressed in domestic cats. However, it reappears during the period of winter cold in the form of fluctuations synchronous in all animals, with an amplitude of 3–4°C and acrophase in the middle of the daylight period and a minimum in the middle of the night. For comparison, the recording of the “core” body temperature and activity in two female domestic cats kept in the same season in the laboratory revealed no comparable rhythms. It is concluded that the circadian biorhythms of rest–activity and deep subcutaneous temperature are not constant characteristics of the body of Far Eastern forest and domestic cats, but can appear, disappear and change radically with changes in ambient temperature.

Keywords: Far Eastern forest cat, domestic cat, body temperature, motor activity