СОДЕРЖАНИЕ

Обзорные и проблемные статьи

Роль микроРНК, NO-синтаз, киназ, $K_{АТФ}$-каналов в инфаркт-лимитирующем эффекте адаптации к гипоксии
Н. В. Нарыжная, Н. С. Воронков, А. А. Скрябина, Ю. В. Бушов, Л. Н. Маслов 3

Экспериментальные статьи

Влияние блокады вегетативных ганглиев, М-холино- и β-адренорецепторов миокарда на вариабельность сердечного ритма крыс
Е. В. Курьянова, А. В. Трясучев, В. О. Ступин, Ю. Д. Жукова, Н. А. Горст 17

Нарушения дыхания во сне у людей разных возрастных групп
А. Ю. Соломаха, Н. А. Лисовская, М. В. Бочкарев, Л. С. Коростовцева, Н. А. Петрова, Г. И. Образцова, Ю. В. Свиряев 31

Максимальная амплитуда электромиограмм сгибателей и разгибателей рук в серии сеансов управления силовым джойстиком у здоровых добровольцев
Э. Р. Джелдубаева, Е. А. Бирюкова, С. А. Махин, Н. Д. Бабанов, Е. Н. Чуян, О. В. Кубряк 44

Характеристика жизнеспособности сперматозоидов у потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа при действии иммобилизационного стресса
Г. В. Брюхин, С. Д. Антонов 55

Поведенческие и гормонально-метаболические характеристики самок крыс, селекционированных по длительности пассивно-оборонительной реакции
Т. А. Алехина, Н. А. Пальчикова, Д. В. Клочков 66

Влияние коллагеназы на активность гиалуронидазы 1-го типа в почечном сосочке и сыворотке крови белых крыс
С. Г. Дзгоев 78

Объективные и психологические факторы оценки своего сна у пациентов с инсомнией и синдромом апноэ во сне
Е. И. Рассказова, Г. В. Ковров, А. И. Мачулина 84

Влияние С-пептида проинсулина и инсулина на гонадную и тиреоидную системы у самцов крыс с мягкой формой сахарного диабета 1-го типа
К. В. Деркач, В. М. Бондарева, А. О. Шпаков 97

Влияние активации ванилоидных рецепторов эводиамином на содержание кальцитонин-ген-родственного пептида в крови крыс в норме и при гипертензии, вызванной потреблением фруктозы
З. С. Толочко, В. К. Спиридонов 110

Методические статьи

Методы определения социальных рангов животных в малых группах
И. С. Матюлько, Е. П. Муртазина, Б. В. Журавлев 121

CONTENTS

Reviews and Topical Articles

The Role of MicroRNAs, NO Synthases, Kinases, K_{ATP} Channels in the Infarction-Limiting Effect of Adaptation to Hypoxia
N. V. Naryzhnaya, N. S. Voronkov, A. A. Scriabina, Yu. V. Bushov, and L. N. Maslov 3

Experimental Articles

Influence of Blockade of the Vegetative Ganglions, of Myocardial M-Cholinoreceptors and Beta-Adrenoreceptors on the Heart Rate Variability in Rats
E. V. Kuryanova, A. V. Tryasuchev, V. O. Stupin, Yu. D. Zhukova, and N. A. Gorst 17

Sleep-Disordered Breathing in Different Age Categories
A. Yu. Solomakha, N. A. Lisovskaya, M. V. Bochkarev, L. S. Korostovtseva, N. A. Petrova, G. I. Obraztsova, and Yu. V. Sviryaev 31

Electromyogram Maximum Amplitudes in Arm Flexors and Extensors in Healthy Volunteers in a Series of the Power Joystick Control Training Sessions
E. R. Dzheldubaeva, E. A. Biryukova, S. A. Makhin, N. D. Babanov, E. N. Chuyan, and O. V. Kubryak 44

Characterisation of Sperm Viability in the Offspring of Female Rats with Experimental Type 1 Diabetes under the Influence of Immobilization Stress
G. V. Bryukhin and S. D. Antonov 55

Behavioral, Hormonal and Metabolic Characteristics of Female Rats Selectively Bred for the Duration of the Passive Defensive Reaction
T. A. Alekhina, N. A. Palchikova, and D. V. Klochkov 66

Effect of Collagenase on Type 1 Hyaluronidase Activity in Renal Papilla and Serum of White Rats
S. G. Dzgoev 78

Objective and Psychological Predictors of Appraisal of Sleep in Patients with Insomnia and Sleep Apnea Syndrom
E. I. Rasskazova, G. V. Kovrov, and A. I. Machulina 84

The Influence of Proinsulin C-Peptide and Insulin on the Gonadal and Thyroid Systems in Male Rats with Mild Type 1 Diabetes
K. V. Derkach, V. M. Bondareva, and A. O. Shpakov 97

The Influence of Vanilloid Receptor Activation by Evodiamine on the CGRP Content in Blood of Normal and Fructose-Fed Rats
Z. S. Tolochko and V. K. Spiridonov 110

Methodical Articles

The Technique for Determination of Social Rank in Laboratory Animals in Small Groups
I. S. Matiulko, E. P. Murtazina, and B. V. Zhuravlev 121

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 1, с. 3–16

ОБЗОРНЫЕ И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

РОЛЬ микроРНК, NO-СИНТАЗ, КИНАЗ, $K_{АТФ}$-КАНАЛОВ В ИНФАРКТ-ЛИМИТИРУЮЩЕМ ЭФФЕКТЕ АДАПТАЦИИ К ГИПОКСИИ

© 2020 г. Н. В. Нарыжная[1], Н. С. Воронков[1, 2], А. А. Скрябина[2], Ю. В. Бушов[2], Л. Н. Маслов[1, *]

[1]Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск, Россия

[2]Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

*****E-mail: Maslov@cardio-tomsk*

Поступила в редакцию 18.11.2019 г.
После доработки 18.12.2019 г.
Принята к публикации 18.12.2019 г.

Установлено, что хроническая гипоксия (ХГ) существенно изменяет экспрессию микроРНК в миокарде. Показано, что miR-138 и miR-184 усиливают толерантность кардиомиоцитов к гипоксии, а microRNA-199a-5p и miR-23b снижают устойчивость этих клеток к гипоксии. ХГ усиливала экспрессию индуцибельной (iNOS) и эндотелиальной NO-синтазы (eNOS). Показано, что кардиопротекторный эффект ХГ связан с активацией iNOS. Установлено, что изоформы δ и ε протеинкиназы С участвуют в кардиопротекторном эффекте адаптации к гипоксии. Показано, что ХГ вызывает усиление экспрессии киназ CaMKII, p-ERK1/2, p-p38, p-Akt, гексокиназы-1, гексокиназы-2. Гипоксия усиливает транслокацию гексокиназы-2 в митохондрии. У животных, адаптированных к гипоксии, не удалось обнаружить увеличения экспрессии киназ: ПКА, p-GSK3β, AMPK и JNK. Представлены данные, указывающие на то, что киназы ERK1/2, MEK1/2 участвуют в кардиопротекторном эффекте адаптации к гипоксии. Гипертрофия миокарда, вызванная хронической гипоксией, связана с активацией Rho-киназы. Вопрос о роли PI3, Akt JNK, PKG, Rho-киназы, mTOR и p38 в защитном эффекте адаптации к гипоксии является спорным. Установлено, что инфаркт-лимитирующий эффект ХГ зависит от активации митоК$_{АТФ}$-каналов. Цель обзора: анализ данных о роли микроРНК, NO-синтазы и киназ в кардиопротекторном эффекте ХГ.

Ключевые слова: сердце, хроническая гипоксия, микроРНК, NO-синтазы, $K_{АТФ}$-каналы

DOI: 10.31857/S0869813920010112

Хорошо известно, что адаптация к хронической гипоксии (ХГ) усиливает толерантность сердца к аритмогенному влиянию ишемии/реперфузии (И/Р) [1–3]; ограничивает размер инфаркта, возникающего при коронароокклюзии и реперфузии [4, 5]; улучшает сократимость сердца в реперфузионном периоде [4, 6]. Установлено, что в регуляции толерантности сердца к действию И/Р важную роль играют NO-синтаза (NOS), киназы и АТФ-чувствительные K^+-каналы ($K_{АТФ}$-каналы) [7–9].

МикроРНК и ХГ. МикроРНК (miRNAs) составляют многочисленную группу небольших некодирующих РНК длиной в 21–22 нуклеотида, которые являются посттранскрипционными регуляторами экспрессии генов у животных, растений и простейших [10]. miRNAs происходят из областей транскриптов РНК, которые

сворачиваются обратно в себя, образуя короткие шпильки [11]. miRNAs взаимодействуют с 3-нетранслируемой областью мРНК, ингибируя взаимодействие мРНК с рибосомами и ускоряя энзиматическую деградацию мРНК [10], что ведет к снижению синтеза молекулы белка, кодируемой мРНК. Полагают, что miRNAs участвуют в регуляции толерантности сердца к И/Р [12–15].

Установлено, что экспрессия microRNA-138 (miR-138) увеличена в правом желудочке пациентов с цианозным врожденным пороком сердца [16]. Было установлено, что miR-138 предупреждает апоптоз клеток H9C2 в условиях гипоксии за счет ингибирования киназы JNK [16]. Установлено, что хроническая периодическая гипоксия (ХПГ) вызывает снижение уровня miRNA-214 в миокарде крыс [17]. Однако неясно, имеет ли эта микроРНК отношение к толерантности сердца при И/Р. Установлено, что уровень miR-184 снижен в образцах правого желудочка пациентов с цианозом и дефектом сердечных клапанов (ДСК) [18]. Показано, что ингибитор miR-184 снижает выживаемость клеток H9C2 в условиях гипоксии и стимулирует апоптоз этих клеток за счет усиления экспрессии каспазы-3 и каспазы-9 [18]. Представленные данные косвенно указывают на то, что miR-184 обеспечивает толерантность кардиомиоцитов к гипоксии. Установлено, что уровень microRNA-199a-5p снижен в образцах правого желудочка пациентов с пороками сердца и в кардиомиоцитах человека, которые культивировали в условиях гипоксии [19]. Показано, что microRNA-199a-5p-mimic усиливает апоптоз кардиомиоцитов в условиях гипоксии, а microRNA-199a-5p-ингибитор подавляет апоптоз кардиомиоцитов в условиях гипоксии. Эти данные свидетельствуют, что microRNA-199a-5p играет негативную роль в регуляции толерантности кардиомиоцитов к гипоксии. Высокий уровень miR-23b был найден при биопсии правого желудочка у пациентов с цианозом и ДСК по сравнению с пациентами с ДСК без цианоза [20]. Продолжительная гипоксия вызывает увеличение экспрессии miR-23b в клетках H9C2. Было показано, что miR-23b вызывал индуцированный гипоксией апоптоз клеток H9C2. Авторы заключили, что избыточная экспрессия miR-23b может способствовать апоптозу кардиомиоцитов в условиях гипоксии [20]. ХПГ клеток H9C2 вызывает гипертрофию клеток, усиливает экспрессию miR-31 и протеинкиназы Cε [21]. Полагают, что miR-31 может индуцировать гипертрофию кардиомиоцитов. Было показано, что ХПГ вызывает увеличение уровня miR-21в ткани предсердий [22]. Однако остается неясным, имеет ли miR-21отношение к увеличению резистентности сердца к И/Р.

Таким образом, установлено, что ХГ существенно изменяет экспрессию микроРНК в миокарде. В условиях ХГ экспрессия miR-138, miR-23b miR-31 и miR-21в усиливается, а экспрессия miR-184, microRNA-199a-5p снижается. Показано, что miR-138 и miR-184 усиливают толерантность кардиомиоцитов к гипоксии, а microRNA-199a-5p и miR-23b усиливают апоптоз кардиомиоцитов в условиях гипоксии.

NO-синтаза. **Экспрессия изоформ NOS**. NO-синтаза катализирует синтез оксида азота ($NO^{\bullet}$), который играет роль внутриклеточного мессенджера и обеспечивает межклеточную сигнализацию [23, 24]. NOS участвует в реализации феномена ишемического пре- и посткондиционирования [7–9], поэтому были основания предполагать, что ХГ вызывает усиление экспрессии NOS. В ряде исследований было установлено, что ХГ стимулирует экспрессию индуцибельной (iNOS) [25–30] и эндотелиальной NOS (eNOS) в миокарде [31–39]. Есть сообщение о том, что ХГ увеличивает экспрессию митохондриальной NOS (mtNOS) в сердце [40]. Последняя является нейрональной NOS (nNOS), связанной с внутренней мембраной митохондрий [41]. P.H.La Padula и соавт. показали, что ХГ способствует усилению экспрессии nNOS [39]. Другие исследователи сообщили, что ХГ не влияет на экспрессию nNOS [33]. Есть данные о том, что ХГ не влияет на уровень eNOS в миокарде,

Таблица 1. Влияние хронической гипоксии на экспрессию NO-синтазы в миокарде
Table 1. The effect of chronic hypoxia on the expression of NO-synthase in the myocardium

Название изоформ NO-синтаза NO-synthase isoforms	Авторы Authors
nNOS↑, eNOS↑	La Padula P.H. et al., 2018 [39]
eNOS↑	Wang N. et al., 2017 [38]
eNOS↓, iNOS↑	Yuan X. et al., 2015 [30]
p-eNOS/eNOS при ХНГ↓	Milano G. et al., 2010 [4]
p-eNOS/eNOS нет эффекта при ХПГ	Milano G. et al., 2010 [4]
eNOS нет эффекта при ХПГ и ХНГ	Milano G. et al., 2010 [4]
iNOS ↑, nNOS нет эффекта	Thompson L. et al., 2009 [33]
mtNOS↑	La Padula P. et al., 2008 [40]
eNOS↑	Quing M et al., 2007 [37]
eNOS↑	Thompson L.P., Dong Y., 2005 [32]
eNOS ↑	Forkel J. et al., 2004 [36]
iNOS↑	Grilli A. et al., 2003a [28]
iNOS↑	Grilli A. et al., 2003b [29]
iNOS↑	Ferreiro C.R. et al., 2001 [27]
eNOS↑	Felaco M. et al., 2000 [35]
eNOS↑	Shi Y. et al., 2000 [34]
eNOS↑	Thompson L.P. et al, 2000 [31]
iNOS↑	Jung F. et al., 2000 [26]
iNOS↑	Rouet-Benzineb P. et al., 1999 [25]

eNOS – эндотелиальная NO-синтаза; iNOS – индуцибельная NO-синтаза; nNOS – нейрональная NO-синтаза; mtNOS – митохондриальная NO-синтаза; ХПГ – хроническая периодическая гипоксия; ХНГ – хроническая непрерывная гипоксия.
eNOS, endothelial NO-synthase; iNOS, inducible NO-synthase; nNOS, neuronal NO-synthase; mtNOS, mitochondrial NO-synthase; CIH, chronic intermittent hypoxia; CCH, chronic continuous hypoxia.

но снижает экспрессию p-eNOS [4]. Приводятся данные о снижении экспрессии eNOS в миокарде после ХГ [30]. Установлено, что в качестве индуктора синтеза белка iNOS выступает транскрипционный фактор hypoxia inducing factor 1α (HIF-1α) [26].

Таким образом, большинство исследователей полагает, что ХГ увеличивает экспрессию eNOS и iNOS в миокарде (табл. 1).

NO-синтаза и кардиопротекция при ХГ. Установлено, что ХГ вызывает увеличение активности NOS в миокарде [25, 42]. Увеличение активности NOS было найдено в миокарде детей с цианозными врожденными пороками сердца [27]. Активация продукции NO при ХГ имеет генерализованный характер, наблюдается не только в миокарде, но и в изолированных mesenteric arteries [43]. Мы обнаружили увеличение уровня метаболитов NO – нитритов и нитратов в сыворотке крови и миокарде крыс после хронической непрерывной гипоксии (ХНГ) [5]. Увеличение нитритов и нитратов в миокарде адаптированных к гипоксии крыс отмечали и другие исследователи [33].

Увеличение продукции NO обеспечивает повышение толерантности сердца к действию И/Р. Так, было показано, что ингибитор NOS L-NAME устраняет повышение толерантности изолированного сердца к действию И/Р у адаптированных к ХГ кроликов [44]. Мы установили, что L-NAME, неселективный ингибитор NOS, устраняет инфаркт-лимитирующий эффект ХНГ [5]. Также действует ингибитор iNOS S-methylisothiourea [5]. Ингибитор nNOS 7-nitroindazole не влиял на кардиопротекторный эффект ХНГ [5].

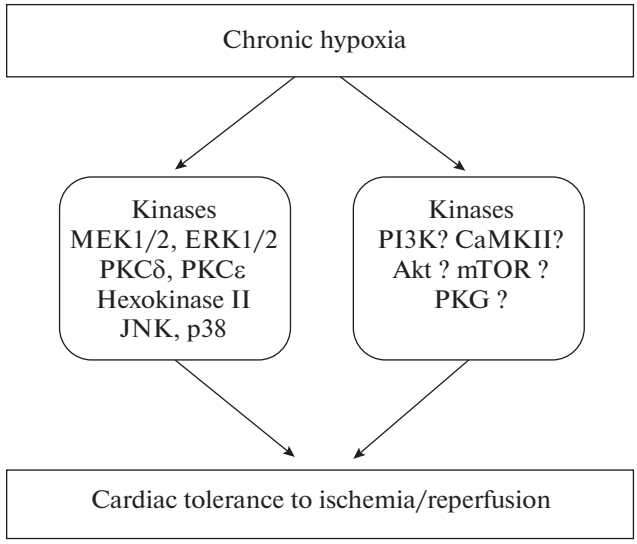

Рис. 1. Вовлечение киназ в кардиопротекторный эффект хронической гипоксии.

Аббревиатуры: MEK1/2, mitogen-activated protein kinase kinase; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinase; PKC, protein kinase C; JNK, c-Jun N-terminal kinase; p38, p38 kinase; PI3K, phosphatidylinositol-3-kinase; Akt, Akt kinase; CaMKII, Ca^{2+}-calmodulin kinase II; mTOR, mammalian target of rapamycin; PKG, protein kinase G.

Fig. 1. An involvement of kinases in cardioprotective effect of chronic hypoxia.

Abbreviation: MEK1/2, mitogen-activated protein kinase kinase; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinase; PKC, protein kinase C; JNK, c-Jun N-terminal kinase; p38, p38 kinase; PI3K, phosphatidylinositol-3-kinase; Akt, Akt kinase; CaMKII, Ca^{2+}-calmodulin kinase II; mTOR, mammalian target of rapamycin; PKG, protein kinase G.

Таким образом, установлено, что ХГ вызывает увеличение продукции NO в миокарде. Инфаркт-лимитирующий эффект ХГ связан с активацией iNOS.

Протеинкиназа С (ПКС). Известно, что ПКС принимает участие в кардиопротекторном эффекте ишемического прекондиционирования и посткондиционирования [7, 8], поэтому исследователи обратили внимание на роль этого фермента в инфаркт-лимитирующем эффекте адаптации к гипоксии (рис. 1). У детей с пороком сердца и цианозом и у новорожденных кроликов, находившихся в условиях гипоксии, была обнаружена транслокация (активация) ПКСε в клеточные органеллы [45]. У крыс, находящихся длительное время в условиях гипоксии, наблюдается увеличение уровня ПКСδ, ПКСε, ПКСζ [46]. Установлено, что инфаркт-лимитирующий эффект хронической периодической гипоксии (ХПГ) не проявляется после блокады ПКС хелеритрином [47]. Селективной блокатор ПКСδ роттлерин уменьшал, но не устранял инфаркт-лимитирующий эффект ХПГ [47]. ХПГ индуцировала транслокацию ПКСδ в митохондрии и ядра клеток. Мы установили, что роттлерин устраняет адаптационное повышение толерантности кардиомиоцитов к действию аноксии/реоксигенации [48]. Эти факты указывают на важную роль ПКСδ в кардиопротекторном эффекте ХГ. Установлено, что ХГ способствует увеличению в миокарде уровня активатора ПКС диацилглицерола [49]. Возможно, что он индуцирует активацию ПКС. Вместе с тем, есть данные о том, что увеличение активности ПКСδ может быть результатом окислительного стресса, который наблюдается после воздействия ХПГ [50]. Так, было установлено, что ежедневное введение крысам антиоксиданта N-ацетилцистеина устраняет инфаркт-лимитиру-

ющий эффект ХПГ и устраняет транслокацию ПКСδ в клеточные органеллы [50]. Действительно, образование нитротирозина, который является маркером окислительного стресса, усиливается при ХПГ в миокарде, особенно в митохондриях [51]. Способность активных форм кислорода активировать ПКС является известным фактом [52], который хорошо согласуется с данными исследований, выполненных на адаптированных к ХПГ крысах [50]. Следует отметить, что ПКСδ принимает участие в кардиопротекторном эффекте хронической непрерывной гипоксии (ХНГ) [48]. Установлено, что уровень ПКСδ в мембранной фракции отрицательно коррелирует с размером инфаркта после адаптации к гипоксии [53]. Установлено, что ХПГ повышает устойчивость кардиомиоцитов к действию аноксии/реоксигенации и уменьшает Ca^{2+}-перегрузку кардиомиоцитов после аноксии/реоксигенации [54]. Хелеритрин, ингибитор ПКС, устраняет эти защитные эффекты [54]. Представленные данные убедительно свидетельствуют об участии ПКСδ в кардиопротекторном эффекте ХГ (табл. 2).

Вместе с тем, есть данные о том, что ПКСε также участвует в повышении толерантности сердца к действию И/Р после адаптации к непрерывной гипоксии [55]. Адаптация крыс к гипоксии приводила к усилению толерантности кардиомиоцитов к 25-минутному метаболическому ингибированию, которое достигалось с помощью NaCN и 2-дезоксиглюкозы. Было обнаружено, что ХГ приводит к усилению экспрессии ПКСε. Селективный ингибитор ПКСε КР-1633 устранял цитопротекторный эффект ХГ [55]. Возможно, что в кардиопротекторном эффекте ХГ участвуют другие изоформы ПКС. Так, было обнаружено, что ХПГ приводит к усилению экспрессии в миокарде ПКСα и фосфорилированной (активной) ПКСα [56]. Хроническая непрерывная гипоксия (ХНГ) приводила к усилению транслокации РКСβII и РКСη в мембраны кардиомиоцитов [57] (табл. 2).

Таким образом, по меньшей мере, две изоформы ПКС участвуют в кардиопротекторном эффекте ХГ: ПКСε и ПКСδ.

AMPK. АМФ-активируемая протеинкиназа AMPK (AMP-activated protein kinase) играет важную роль в реализации феномена пре- и посткондиционирования [8] (рис.1). По всей видимости, AMPK не играет существенной роли в кардиопротекторном эффекте адаптации к гипоксии, поскольку у крыс, подвергнутых ХПГ, отмечается снижение уровня p-AMPK (активированная AMPK) в миокарде [58] (табл. 2).

CaMKII. Известно, что активация CaMKII (Ca^{2+}-calmodulin kinase II) усугубляет И/Р повреждения сердца [59], поэтому были основания предполагать, что ее активность в миокарде снижается при адаптации к гипоксии (рис.1). Однако было обнаружено, что экспрессия мРНК, кодирующей кальмодулин, CaMKIIγ, CaMKIIδ, в миокарде крыс после воздействия ХГ усиливается [60] (табл. 2). Усиление экспрессии CaMKII после воздействия ХГ отмечали и другие исследователи [61]. Получены данные, что повышенная экспрессия CaMKII может препятствовать повреждению кардиомиоцитов при Ca^{2+}-парадоксе [62], но может ли CaMKII обеспечивать инфаркт-лимитирующий эффект ХГ – неизвестно.

ERK и MEK. ERK (extracellular signal-regulated kinase) и MEK (mitogen-activated protein kinase) играют важную роль в пре- и посткондиционировании сердца [8], поэтому были основания полагать, что они могут участвовать в инфаркт-лимитирующем эффекте ХГ (рис.1). Установлено, что ХПГ приводит к увеличению экспрессии ERK2 в миокарде крыс [63]. ХПГ вызывает увеличение в миокарде уровня фосфорилированной (активной) ERK1/2 (p-ERK1/2) [64]. Ингибиторы MEK1/2 U0126 и PD-98059 устраняли инфаркт-лимитирующий эффект ХПГ [64]. Увеличение количества p-ERK1/2 в миокарде крыс после ХПГ отмечают и другие исследователи [22, 56]. Представленные данные указывают на то, что ERK1/2 и MEK1/2 участвуют в кардиопротекторном эффекте ХПГ (табл. 2).

Таблица 2. Влияние хронической гипоксии на экспрессию протеинкиназ в миокарде
Table 2. The effect of chronic hypoxia on the expression of protein kinases in the myocardium

Название киназ The name of the kinases	Авторы Authors
ПКСδ↑, ПКСε↑, ПКСζ↑	Morel O.E. et al., 2003 [46]
ПКСδ↑	Hlaváčková M. et al., 2007 [53]
ПКСε↑	Holzerova K. et al., 2015 [55]
ПКСα↑	Micova P. et al., 2016 [56]
p-AMPK↓	Xie S. et al., 2016 [58]
CaMKIIγ↑, CaMKIIδ↑	Zhao P.J. et al., 2008 [60]
ERK2↑	Strnisková M. et al., 2006 [63]
p-ERK1/2↑	Milano G. et al., 2010 [64]
p-ERK1/2↑	Micova P. et al., 2016 [56]
p-ERK1/2↑	Zhang K. et al., 2018 [22]
p-Akt↑	Strnisková M. et al., 2006 [63]
p-Akt↑	Kolar D. et al., 2017 [67]
PI3K↓, p-Akt↓	Zhang K. et al., 2018 [22]
ПКА нет эффекта	Larsen K.O. et al., 2008 [68]
p38↓, p-p38↓	Morel S. et al., 2006 [69]
p-p38 в ПЖ↓, p-p38 в ЛЖ↑	Strnisková M. et al., 2006 [63]
p-p38 в ЛЖ↑	Micova P. et al., 2016 [56]
p-p38↑	Quing M. et al., 2007 [37]
p-JNK в ЛЖ нет эффекта	Morel S. et al., 2006 [69]
JNK и p-JNK в ЛЖ нет эффекта	Strnisková M.et al., 2006 [63]
JNK и p-JNK в ПЖ нет эффекта	Strnisková M. et al., 2006 [63]
p-JNK↑	He S. et al., 2016 [72]
p-JNK/JNK↑	Zhao Y.S. et al., 2019 [73]
p-GSK3β нет эффекта	McCarthy J. et al., 2011 [76]
HK-1↑, HK-2↑	Waskova-Arnostova P. et al., 2015 [77]
HK-1↑, HK-2↑	Kolar D. et al., 2017 [67]
HK-1↑, HK-2↑	Nedvedova I. et al., 2018 [78]

ПКС – протеинкиназа С; AMPK – AMP-activated protein kinase; CaMKII – Ca^{2+}-calmodulin kinase II; ERK – extracellular signal-regulated kinase; Akt – Akt-киназа; PI3K – phosphatidylinositol-3-kinase; ПКА – протеинкиназа А; p38 – p38-киназа; JNK – c-Jun N-terminal kinase; PKG – протеинкиназа G; GSK3β – glycogen synthase kinase 3 β; HK – hexokinase.
PKC, protein kinase C; AMPK, AMP-activated protein kinase; CaMKII, Ca^{2+}-calmodulin kinase II; ERK, extracellular signal-regulated kinase; Akt, Akt-kinase; PI3K, phosphatidylinositol-3-kinase; PKA, protein kinase A; p38, p38-kinase; JNK, c-Jun N-terminal kinase; PKG, protein kinase G; GSK3β, glycogen synthase kinase 3 β; HK, hexokinase.

PI3K и Akt. PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase) и Akt принимают участие в пре- и посткондиционировании сердца [8], поэтому можно было предположить, что они участвуют в кардиопротекторном эффекте ХГ. Показано, что ХПГ вызывает увеличение экспрессии p-Akt в левом желудочке крыс [63]. Установлено, что ингибитор PI3K LY294002 устраняет инфаркт-лимитирующий эффект ХПГ [65] (рис. 1). Хроническая умеренная гипоксия вызывает увеличение уровня p-Akt в кардиомиобластах H9C2 [66]. В исследовании, выполненном на изолированных перфузируемых сердцах крыс, подвергнутых И/Р, было показано, что инфаркт-лимитирующий

эффект ХПГ связан с активацией PI3K [64]. Кроме того, показано, что ХНГ вызывает увеличение уровня p-Akt в миокарде крыс [67]. Вместе с тем, по данным некоторых авторов [22], ХПГ вызывает снижение в миокарде крыс уровня PI3K и p-Akt. Нам также не удалось подтвердить участие PI3K в инфаркт-лимитирующем эффекте ХНГ [5]. Нами было установлено, что блокада PI3K вортманнином не влияет на повышение толерантности изолированных кардиомиоцитов к действию аноксии/реоксигенации у адаптированных к ХНГ крыс [48]. Таким образом, вопрос о роли PI3K и Akt в кардиопротекторном эффекте хронической гипоксии является спорным (табл. 2).

ПКА. Протеинкиназа А (ПКА) является цАМФ-зависимой киназой, которая, по мнению некоторых авторов [8], принимает участие в кардиопротекторном эффекте пре- и посткондиционирования (рис.1). У мышей, подвергнутых воздействию ХНГ, не удалось обнаружить изменение количества изоформ ПКА [68] (табл. 2). Однако это пока единственная работа, в которой оценивали влияние длительной гипоксии на уровень ПКА, поэтому делать вывод роли ПКА в кардиопротекторном эффекте адаптации к гипоксии пока рано.

p38 также участвует в пре- и посткондиционировании [8]. Установлено, что ХПГ вызывает снижение уровня киназы p38 и p-p38 в миокарде [69]. ХНГ не оказывала подобного эффекта [69] (рис. 1). В то же время, согласно данным M. Strnisková и соавт. [63], при ХПГ уровень p-p38 в правом желудочке снижается, а в левом – повышается, уровень общей p38 не изменяется. Повышение уровня p-p38 в миокарде левого желудочка после ХПГ было отмечено в более поздней работе того же коллектива исследователей [56]. Показано, что уровень p-p38 увеличен в миокарде у детей с пороками сердца и цианозом, но не у больных с пороками сердца без цианоза [37] (табл. 2). Установлено, что блокирование p38 ингибитором SB203580 устраняет кардиопротекторный эффект ХНГ [45]. Представленные данные говорят о повышения уровня p-p38 в миокарде левого желудочка при ХПГ, что способствует повышению толерантности сердца к действию И/Р. Вместе с тем, следует отметить, что позитивная роль p38 в кардиопротекторном эффекте хронической гипоксии показана только в одной статье [45].

JNK. Принято считать, что JNK (c-Jun N-terminal kinase) играет негативную роль в регуляции толерантности сердца к действию И/Р [70] (рис. 1). Вместе с тем, есть данные о том, что этот фермент участвует в кардиопротекторном эффекте дистантного прекондиционирования [71]. Установлено, что куркумин, ингибитор JNK, устраняет кардиопротекторный эффект ХНГ у кроликов [45]. При ХПГ не удалось обнаружить увеличение уровня p-JNK в левом желудочке крыс [69]. В то же время другим исследователям не удалось обнаружить изменение уровня общей JNK и p-JNK в правом и левом желудочке адаптированных к ХПГ крыс [63]. Пребывание кардиомиобластов H9C2 в среде, содержащей 1% O_2, в течение 72 ч способствовало увеличению уровня p-JNK [72]. Установлено, что ХПГ приводит к увеличению соотношения p-JNK/JNK в миокарде [73] (табл. 2). Представленные данные свидетельствуют о том, что ХГ может приводить к увеличению уровня активной p-JNK в миокарде. Вместе с тем, данные об участии этой киназы в кардиопротекторном эффекте адаптации ограничены пока одной статьей [45], поэтому вопрос о роли JNK в защитном эффекте ХПГ остается открытым.

mTOR. Есть данные о том, что рапамицин, ингибитор mTOR (mammalian target of rapamycin), устраняет кардиопротекторный эффект ишемического прекондиционирования [74] (рис.1). Следовательно, были основания предполагать, что mTOR может принимать участие в кардиопротекторном эффекте хронической гипоксии. Установлено, что рапамицин устраняет гипертрофию сердца, вызванную ХПГ [58]. Эти данные указывают на то, что mTOR при ХПГ активируется. Вместе с тем, они не дают ответа на вопрос о роли mTOR в инфаркт-лимитирующем эффекте ХГ.

PKG. Известно, что PKG (cGMP-dependent protein kinase G) участвует в кардиопротекторном эффекте пре- и посткондиционирования [8], поэтому были основания предполагать, что эта киназа участвует в инфаркт-лимитирующем эффекте ХГ (рис. 1). Было установлено, что хроническая гипобарическая гипоксия вызывает увеличение в миокарде уровня цГМФ, активатора PKG [61]. Пока остается неизвестным, ведет ли увеличение содержания цГМФ в миокарде к повышению активности PKG. Неизвестно, какова роль этой киназы в инфаркт-лимитирующем эффекте хронической гипоксии.

GSK3β. Известно, что фосфорилирование GSK3β (glycogen synthase kinase 3 β) способствует инактивации этой киназы и повышению устойчивости сердца к действию И/Р [75] (рис.1). Установлено, что ХГ не влияет на уровень p-GSK3β в миокарде мышей [76] (табл. 2). Следовательно, GSK3β не играет существенной роли в инфаркт-лимитирующем эффекте ХГ. Вместе с тем, это пока единственное исследование, в котором оценивали роль GSK3β в кардиопротекторном эффекте адаптации к гипоксии.

Гексокиназа 2 (HK-2, hexokinase 2). Полагают, что связывание HK-2 с митохондриями предупреждает апоптоз кардиомиоцитов [8] (рис.1). Установлено, что ХПГ вызывает транслокацию гексокиназы в митохондрии [77]. Кроме того, было установлено, что ХПГ вызывает увеличение экспрессии HK-1 и HK-2 в миокарде [77]. ХНГ также повышала экспрессию HK-1 и HK-2 в миокарде, усиливала ассоциацию HK-2 с митохондриями [67]. Аналогичные эффекты ХНГ оказывала у крыс линии SHR [78] (табл. 2).

Rho-киназа (ROCK, Rho-associated protein kinase). Известно, Rho-киназа участвует в апоптозе кардиомиоцитов [79], а ее ингибирование способствует уменьшению размера инфаркта при И/Р сердца [80] (рис.1). Можно было ожидать, что экспрессия Rho-киназы снизится в миокарде крыс при адаптации. Однако оказалось, что гипертрофия правого желудочка при хронической гипоксии связана с активацией Rho-киназы [81]. Показано, что при ХПГ гипертрофия левого желудочка также связана активацией Rho-киназы [82]. Имеет ли указанная киназа отношение к кардиопротекторному эффекту хронической гипоксии, пока неясно.

Роль $K_{АТФ}$-каналов в кардиопротекторном эффекте ХГ. Известно, что в кардиомиоцитах существует два основных пула АТФ-чувствительных K^+-каналов ($K_{АТФ}$-каналов): сарколеммальные $K_{АТФ}$-каналы (сарк$K_{АТФ}$-каналы) и митохондриальные $K_{АТФ}$-каналы (митоК$_{АТФ}$-каналы) [83–85]. Оба субтипа $K_{АТФ}$-каналов участвуют в кардиопротекторном эффекте ишемического пре- и посткондиционирования [9, 84, 85]. Активаторы $K_{АТФ}$-каналов повышают устойчивость сердца к И/Р [83]. Следовательно, были основания предполагать, что $K_{АТФ}$-каналы могут принимать участие в кардиопротекторном эффекте ХГ.

В 1997 г. было установлено, что ХГ вызывает укорочение потенциала действия в волокнах Пуркинье сердца кролика в результате активации $K_{АТФ}$-каналов [86]. Факт активации сарк$K_{АТФ}$-каналов в ответ на ХГ был подтвержден в исследовании, выполненном на изолированных кардиомиоцитах мышей с dominant negative suppression of Kir6.2/SUR2A [87]. Установлено, что ХПГ повышает устойчивость изолированного сердца крыс к повреждению, вызванному Ca^{2+}-парадоксом за счет активации митоК$_{АТФ}$-каналов [62]. Длительная умеренная гипоксия кардиомиобластов H9C2 приводила к повышению устойчивости этих клеток к гипоксии/реоксигенации [88]. Селективный ингибитор сарк$K_{АТФ}$-каналов HMR 1098 устранял цитопротекторный эффект умеренной гипоксии [88]. Было показано, что умеренная гипоксия приводила к усилению экспрессии SUR2A, регуляторной субъединицы $K_{АТФ}$-канала, но не Kir6.2, субъединицы, формирующей пору $K_{АТФ}$-канала. Избыточная экспрессия HIF-1α не влияла на уровень SUR2A [88]. Этот факт

указывает на то, что HIF-1α не участвует в транскрипции мРНК, кодирующей SUR2A. Ингибитор mTOR рапамицин не влиял на экспрессию SUR2A в условиях умеренной гипоксии. LY 294002, ингибитор PI3K и PD 184352, ингибитор MEK устраняли подъем уровня SUR2A, вызванный гипоксией. Эти данные указывают на то, что экспрессия SUR2A в условиях гипоксии активируется при участии PI3K и MEK. Показано, что неселективный ингибитор $K_{АТФ}$-каналов глибенкламид устраняет повышенную устойчивость изолированного сердца адаптированных кроликов к И/Р [44]. МСС-134, блокатор митоК$_{АТФ}$-каналов и "открыватель" саркК$_{АТФ}$-каналов, устранял инфаркт-лимитирующий и антиаритмический эффект ХПГ [2]. Эти данные указывают на важную роль митоК$_{АТФ}$-каналов в кардиопротекторном эффекте ХГ. Важная роль $K_{АТФ}$-каналов в инфаркт-лимитирующем и антиаритмическом эффекте ХГ была подтверждена в нашем более позднем исследовании [89, 90]. Нами было установлено, что глибенкламид и селективный ингибитор митоК$_{АТФ}$-каналов 5-гидроксидеканоат устраняют инфаркт-лимитирующий эффект ХНГ [5, 91].

Следует отметить, что не все исследователи смогли подтвердить важную роль $K_{АТФ}$-каналов в адаптационном повышении толерантности сердца к И/Р. Так, согласно данным J. Forkel и соавт. [36], глибенкламид не устраняет повышение толерантности правого желудочка к И/Р у крыс, адаптированных к ХГ.

Таким образом, большинство исследований указывает, что инфаркт-лимитирующий эффект ХГ связан с активацией митоК$_{АТФ}$-каналов. Вместе с тем, мы не можем исключить возможность того, что другие кардиопротекторные эффект могут быть связаны с саркК$_{АТФ}$-каналами, которые также активируются при ХГ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что ХГ существенно изменяет экспрессию микроРНК в миокарде. В условиях ХГ экспрессия miR-138, miR-23b, miR-31 и miR-21в усиливается, а экспрессия miR-184, microRNA-199a-5p снижается. Показано, что miR-138 и miR-184 усиливают толерантность кардиомиоцитов к гипоксии, а microRNA-199a-5p и miR-23b усиливают апоптоз кардиомиоцитов в условиях гипоксии. Показано, что ХГ вызывает увеличение продукции NO в миокарде. Инфаркт-лимитирующий эффект ХГ связан с активацией iNOS. Представленные данные свидетельствуют, что при ХГ активируются саркК$_{АТФ}$-каналы и митоК$_{АТФ}$-каналы. ХГ приводит к усилению экспрессии в миокарде следующих киназ: ПКСδ, ПКСε, ПКСζ, ПКСα, CaMKII, p-ERK1/2, p-p38, p-Akt, HK-1, HK-2. Адаптация к гипоксии усиливает ассоциацию HK-2 с митохондриями и вызывает транслокацию ПКСδ, PKCβII и PKCη в мембраны кардиомиоцитов. В исследовании, выполненном на адаптированных к гипоксии животных, не удалось обнаружить усиления экспрессии киназ: ПКА, p-GSK3β, AMPK и JNK. Доказано, что ПКСδ, ПКСε, ERK1/2, MEK1/2 участвуют в кардиопротекторном эффекте ХГ. Роль киназ JNK, PKG, Rho-киназы, mTOR и p38 в кардиопротекторном эффекте адаптации к гипоксии требует дальнейшего изучения. Инфаркт-лимитирующий эффект ХГ связан с активацией митоК$_{АТФ}$-каналов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Статья подготовлена при поддержке гранта РНФ № 16-15-10001. Раздел, посвященный NO-синтазе, осуществлен в рамках гос. задания АААА-А15-115120910024-0.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Meerson F.Z., Ustinova E.E., Manukhina E.B.* Prevention of cardiac arrhythmias by adaptation to hypoxia: regulatory mechanisms and cardiotropic effect. Biomed. Biochim. Acta. 48(2–3): S83–S88. 1989.
2. *Kolar F., Neckár J., Ostádal B.* MCC-134, a blocker of mitochondrial and opener of sarcolemmal ATP-sensitive K+ channels, abrogates cardioprotective effects of chronic hypoxia. Physiol. Res. 54(4): 467–471. 2005.
3. *Naryzhnaya N.V., Mukhamedzyanov A.V., Lasukova T.V., Maslov L.N.* Involvement of autonomic nervous system in antiarrhythmic effect of intermittent hypobaric hypoxia. Bull. Exp. Biol. Med. 163(3): 299–301. 2017.
4. *Milano G., Corno A.F., Samaja M., Morel S., Vassalli G., von Segesser L.K.* Daily reoxygenation decreases myocardial injury and improves post-ischaemic recovery after chronic hypoxia. Eur. J. Cardiothorac. Surg. 37(4): 942–949. 2010.
5. *Tsibulnikov S.Y., Maslov L.N., Naryzhnaya N.V., Ma H., Lishmanov Y.B., Oeltgen P.R., Garlid K.* Role of protein kinase C, PI3 kinase, tyrosine kinases, NO-synthase, KATP channels and MPT pore in the signaling pathway of the cardioprotective effect of chronic continuous hypoxia. Gen. Physiol. Biophys. 37(5): 537–547. 2018.
6. *Maslov L.N., Naryzhnaya N.V., Prokudina E.S., Kolar F., Gorbunov A.S., Zhang Y., Wang H., Tsibulnikov S.Yu., Portnichenko A.G., Lasukova T.V., Lishmanov Yu.B.* Preserved cardiac mitochondrial function and reduced ischemia/reperfusion injury afforded chronic continuous hypoxia: role of opioid receptors. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 42(5): 496–501. 2015.
7. *Yellon D.M., Downey J.M.* Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. Physiol. Rev. 83(4): 1113–1151. 2003.
8. *Heusch G.* Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. Circ. Res. 116(4): 674–699. 2015.
9. *Cohen M.V., Downey J.M.* Signalling pathways and mechanisms of protection in pre- and postconditioning: historical perspective and lessons for the future. Br. J. Pharmacol. 172(8): 1913–3132. 2015.
10. *Fabian M.R., Sonenberg N., Filipowicz W.* Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. Annu. Rev. Biochem. 79: 351–379. 2010.
11. *McCreight J.C., Schneider S.E., Wilburn D.B., Swanson W.J.* Evolution of microRNA in primates. PLoS One. 12(6): e0176596. 2017.
12. *Han M., Toli J., Abdellatif M.* MicroRNAs in the cardiovascular system. Curr. Opin. Cardiol. 26(3): 181–189. 2011.
13. *Liu F., Li Y., Liu G.* MicroRNA-200c exacerbates the ischemia/reperfusion injury of heart through targeting the glutaminase (GLS)-mediated glutamine metabolism. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 21(14): 3282–3289. 2017.
14. *Chen Y., Ye X., Yan F.* MicroRNA 3113-5p is a novel marker for early cardiac ischemia/reperfusion injury. Diagn. Pathol. 14(1): 121. 2019.
15. *Tsibulnikov S.Y., Maslov L.N., Gorbunov A.S., Voronkov N.S., Boshchenko A.A., Popov S.V., Prokudina E.S., Singh N., Downey J.M.* A review of humoral factors in remote preconditioning of the heart. J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther. 24(5): 403–421. 2019.
16. *He S., Liu P., Jian Z., Li J., Zhu Y., Feng Z., Xiao Y.* miR-138 protects cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis via MLK3/JNK/c-jun pathway. Biochem. Biophys. Res. Commun. 441(4): 763–769. 2013.
17. *Chen Q., Huang J., Wang H., Zhao J., Chen G., Qi J., Lin X., Chen L., Lin Q.* Effects of chronic intermittent hypoxia on regulation of miRNA-214 in myocardial apoptosis in rats. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 95(16): 1214–1247. 2015.
18. *Huang J., Li X., Li H., Su Z., Wang J., Zhang H.* Down-regulation of microRNA-184 contributes to the development of cyanotic congenital heart diseases. Int. J. Clin. Exp. Pathol. 8(11): 14221–14227. 2015.
19. *Zhou Y., Jia W.K., Jian Z., Zhao L., Liu C.C., Wang Y., Xiao Y.B.* Downregulation of microRNA-199a-5p protects cardiomyocytes in cyanotic congenital heart disease by attenuating endoplasmic reticulum stress. Mol. Med. Rep. 16(3): 2992–3000. 2017.
20. *He W., Che H., Jin C., Ge S.* Effects of miR-23b on hypoxia-induced cardiomyocytes apoptosis. Biomed. Pharmacother. 96: 812–817. 2017.
21. *Ren J., Liu W., Li G.C., Jin M., You Z.X., Liu H.G., Hu Y.* Atorvastatin attenuates myocardial hypertrophy induced by chronic intermittent hypoxia in vitro partly through miR-31/PKCε pathway. Curr. Med. Sci. 38(3): 405–412. 2018.
22. *Zhang K., Ma Z., Wang W., Liu R., Zhang Y., Yuan M., Li G.* Beneficial effects of tolvaptan on atrial remodeling induced by chronic intermittent hypoxia in rats. Cardiovasc. Ther. 36(6): e12466. 2018.
23. *Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А.* Окислительный стресс.Прооксиданты и антиоксиданты. Москва. 2006. [*Menshchikova E.B., Lankin V.Z., Zenkov N.K., Bondar I.A., Krugovikh N.F., Trufakin V.A.* Okislitel`ny`j stress. Prooksidanty` i antioksidanty. [Oxidative Stress. Prooxidants and Antioxidants]. Moscow. 2006].

24. *Santolini J.* What does "NO-Synthase" stand for? Front. Biosci. (Landmark Ed). 24: 133–171. 2019.
25. *Rouet-Benzineb P., Eddahibi S., Raffestin B., Laplace M., Depond S., Adnot S., Crozatier B.* Induction of cardiac nitric oxide synthase 2 in rats exposed to chronic hypoxia. J. Mol. Cell Cardiol. 31(9): 1697–1708. 1999.
26. *Jung F., Palmer L.A., Zhou N., Johns R.A.* Hypoxic regulation of inducible nitric oxide synthase via hypoxia inducible factor-1 in cardiac myocytes. Circ. Res. 86(3): 319–325. 2000.
27. *Ferreiro C.R., Chagas A.C., Carvalho M.H., Dantas A.P., Jatene M.B., Bento De Souza L.C., Lemos Da Luz P.* Influence of hypoxia on nitric oxide synthase activity and gene expression in children with congenital heart disease: a novel pathophysiological adaptive mechanism. Circulation. 103(18): 2272–2276. 2001.
28. *Grilli A., De Lutiis M.A., Patruno A., Speranza L., Gizzi F., Taccardi A.A., Di Napoli P., De Caterina R., Conti P., Felaco M.* Inducible nitric oxide synthase and heme oxygenase-1 in rat heart: direct effect of chronic exposure to hypoxia. Ann. Clin. Lab. Sci. 33(2): 208–215. 2003.
29. *Grilli A., De Lutiis M.A., Patruno A., Speranza L., Cataldi A., Centurione L., Taccardi A.A., Di Napoli P., De Caterina R., Barbacane R., Conti P., Felaco M.* Effect of chronic hypoxia on inducible nitric oxide synthase expression in rat myocardial tissue. Exp. Biol. Med. (Maywood). 228(8): 935–942. 2003.
30. *Yuan X., Zhu D., Guo X.L., Deng Y., Shang J., Liu K., Liu H.G.* Telmisartan attenuates myocardial apoptosis induced by chronic intermittent hypoxia in rats: modulation of nitric oxide metabolism and inflammatory mediators. Sleep Breath. 19(2): 703–709. 2015.
31. *Thompson L.P., Aguan K., Pinkas G., Weiner C.P.* Chronic hypoxia increases the NO contribution of acetylcholine vasodilation of the fetal guinea pig heart. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 279(5): R1813–R1820. 2000.
32. *Thompson L.P., Dong Y.* Chronic hypoxia decreases endothelial nitric oxide synthase protein expression in fetal guinea pig hearts. J. Soc. Gynecol. Investig. 12(6): 388–395. 2005.
33. *Thompson L., Dong Y., Evans L.* Chronic hypoxia increases inducible NOS-derived nitric oxide in fetal guinea pig hearts. Pediatr. Res. 65(2): 188–192. 2009.
34. *Shi Y., Pritchard K.A., Holman P., Rafiee P., Griffith O.W., Kalyanaraman B., Baker J.E.* Chronic myocardial hypoxia increases nitric oxide synthase and decreases caveolin-3. Free Radic. Biol. Med. 29(8): 695–703. 2000.
35. *Felaco M., Grilli A., Gorbunov N., Di Napoli P., De Lutiis M.A., Di Giulio C., Taccardi A.A., Barsotti A., Barbacane R.C., Reale M., Conti P.* Endothelial NOS expression and ischemia-reperfusion in isolated working rat heart from hypoxic and hyperoxic conditions. Biochim. Biophys. Acta. 1524(2–3): 203–211. 2000.
36. *Forkel J., Chen X., Wandinger S., Keser F., Duschin A., Schwanke U., Frede S., Massoudy P., Schulz R., Jakob H., Heusch G.* Responses of chronically hypoxic rat hearts to ischemia: KATP channel blockade does not abolish increased RV tolerance to ischemia. Am J Physiol. Heart Circ. Physiol. 286(2): H545–H551. 2004.
37. *Quing M., Görlach A., Schumacher K., Wöltje M., Vazquez-Jimenez J.F., Hess J., Seghaye M.C.* The hypoxia-inducible factor HIF-1 promotes intramyocardial expression of VEGF in infants with congenital cardiac defects. Basic Res. Cardiol. 102(3): 224–232. 2007.
38. *Wang N., Chang Y., Chen L., Guo Y.J., Zhao Y.S., Guo Q.H., Ji E.S.* Tanshinone IIA protects against chronic intermittent hypoxia-induced myocardial injury via activating the endothelin 1 pathway. Biomed. Pharmacother. 95: 1013–1020. 2017.
39. *La Padula P.H., Etchegoyen M., Czerniczyniec A., Piotrkowski B., Arnaiz S.L., Milei J., Costa L.E.* Cardioprotection after acute exposure to simulated high altitude in rats. Role of nitric oxide. Nitric Oxide. 73: 52–59. 2018.
40. *La Padula P., Bustamante J., Czerniczyniec A., Costa L.E.* Time course of regression of the protection conferred by simulated high altitude to rat myocardium: correlation with mtNOS. J. Appl. Physiol. (1985). 105(3): 951–957. 2008.
41. *Ghafourifar P., Cadenas E.* Mitochondrial nitric oxide synthase. Trends Pharmacol. Sci. 26(4): 190–195. 2005.
42. *Baker J.E., Holman P., Kalyanaraman B., Griffith O.W., Pritchard K.A.* Adaptation to chronic hypoxia confers tolerance to subsequent myocardial ischemia by increased nitric oxide production. Ann. N. Y. Acad. Sci. 874: 236–253. 1999.
43. *Earley S., Walker B.R.* Increased nitric oxide production following chronic hypoxia contributes to attenuated systemic vasoconstriction. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 284(5): H1655–H1661. 2003.
44. *Fitzpatrick C.M., Shi Y., Hutchins W.C., Su J., Gross G.J., Ostadal B., Tweddell J.S., Baker J.E.* Cardioprotection in chronically hypoxic rabbits persists on exposure to normoxia: role of NOS and K_{ATP} channels. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 288(1): H62–H68. 2005.
45. *Rafiee P., Shi Y., Kong X., Pritchard K.A., Tweddell J.S., Litwin S.B., Mussatto K., Jaquiss R.D., Su J., Baker J.E.* Activation of protein kinases in chronically hypoxic infant human and rabbit hearts: role in cardioprotection. Circulation. 106(2): 239–245. 2002.
46. *Morel O.E., Buvry A., Le Corvoisier P., Tual L., Favret F., León-Velarde F., Crozatier B., Richalet J.P.* Effects of nifedipine-induced pulmonary vasodilatation on cardiac receptors and protein kinase C isoforms in the chronically hypoxic rat. Pflugers Arch. 446(3): 356–364. 2003.

47. *Neckar J., Marková I., Novák F., Nováková O., Szárszoi O., Ost'ádal B., Kolár F.* Increased expression and altered subcellular distribution of PKC-δ in chronically hypoxic rat myocardium: involvement in cardioprotection. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 288(4): H1566–H1572. 2005.
48. *Нарыжная Н.В., Маслов Л.Н., Халиулин И.Г., Пей Ж.-М., Жанг Н., Цепокина А.В., Хуторная М.В., Кутихин А.Г., Лишманов Ю.Б.* Адаптация с помощью хронической нормобарической гипоксии увеличивает толерантность кардиомиоцитов крыс к аноксии-реоксигенации: роль протеинкиназ. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 102(12): 1462–1471. 2016. [*Naryzhnaia N.V., Maslov L.N., Khaliulin I.G., Pei J.M., Zhang Y., Tsepokina A.V., Khutornaya M.V., Kutikhin A.G., Lishmanov Y.B.* Chronic continuous normobaric hypoxia augments cell tolerance to anoxia/reoxygenation: the role of protein kinases. Russ. J. Physiol. 102(12): 1462–1471. 2016. (In Russ)].
49. *El Alwani M., Usta J., Nemer G., El Sabban M., Nasser M., Bitar H., Souki R., Dbaibo G.S., Bitar F.F.* Regulation of the sphingolipid signaling pathways in the growing and hypoxic rat heart. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 78(1–4): 249–263. 2005.
50. *Kolar F., Jezková J., Balková P., Breh J., Neckár J., Novák F., Nováková O., Tomásová H., Srbová M., Ost'ádal B., Wilhelm J., Herget J.* Role of oxidative stress in PKC-δ upregulation and cardioprotection induced by chronic intermittent hypoxia. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 292(1): H224–H230. 2007.
51. *Hlaváčková M., Kožichová K., Neckář J., Kolář F., Musters R.J., Novák F., Nováková O.* Up-regulation and redistribution of protein kinase C-δ in chronically hypoxic heart. Mol. Cell. Biochem. 345(1–2): 271–282. 2010.
52. *Krylatov A.V., Maslov L.N., Voronkov N.S., Boshchenko A.A., Popov S.V., Gomez L., Wang H., Jaggi A.S., Downey J.M.* Reactive oxygen species as intracellular signaling molecules in the cardiovascular system. Curr. Cardiol. Rev. 14(4): 290–300. 2018.
53. *Hlaváčková M., Neckár J., Jezková J., Balková P., Stanková B., Nováková O., Kolár F., Novák F.* Dietary polyunsaturated fatty acids alter myocardial protein kinase C expression and affect cardioprotection induced by chronic hypoxia. Exp. Biol. Med. (Maywood). 232(6): 823–832. 2007.
54. *Ma H.J., Li Q., Ma H.J., Guan Y., Shi M., Yang J., Li D.P., Zhang Y.* Chronic intermittent hypobaric hypoxia ameliorates ischemia/reperfusion-induced calcium overload in heart via Na^+/Ca^{2+} exchanger in developing rats. Cell Physiol. Biochem. 34(2): 313–324. 2014.
55. *Holzerova K., Hlaváčková M., Žurmanová J., Borchert G., Neckář J., Kolář F., Novák F., Nováková O.* Involvement of PKCε in cardioprotection induced by adaptation to chronic continuous hypoxia. Physiol. Res. 64(2): 191–201. 2015.
56. *Micova P., Hahnova K., Hlavackova M., Elsnicova B., Chytilova A., Holzerova K., Zurmanova J., Neckar J., Kolar F., Novakova O., Novotny J.* Chronic intermittent hypoxia affects the cytosolic phospholipase A2α/cyclooxygenase 2 pathway via β2-adrenoceptor-mediated ERK/p38 stimulation. Mol. Cell Biochem. 423(1-2): 151–163. 2016.
57. *Zeng C., Liang B., Jiang R., Shi Y., Du Y.* Protein kinase C isozyme expression in right ventricular hypertrophy induced by pulmonary hypertension in chronically hypoxic rats. Mol. Med. Rep. 16(4): 3833–3840. 2017.
58. *Xie S., Deng Y., Pan Y.Y., Ren J., Jin M., Wang Y., Wang Z.H., Zhu D., Guo X.L., Yuan X., Shang J., Liu H.G.* Chronic intermittent hypoxia induces cardiac hypertrophy by impairing autophagy through the adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase pathway. Arch. Biochem. Biophys. 606: 41–52. 2016.
59. *Ling H., Gray C.B., Zambon A.C., Grimm M., Gu Y., Dalton N., Purcell N.H., Peterson K., Brown J.H.* CaMKIIδ mediates myocardial ischemia/reperfusion injury through nuclear factor-κB. Circ. Res. 112(6): 935–944. 2013.
60. *Zhao P.J., Pan J., Li F., Sun K.* Effects of chronic hypoxia on the expression of calmodulin and calcicum/calmodulin-dependent protein kinase II and the calcium activity in myocardial cells in young rats. Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi. 10(3): 381–385. 2008.
61. *Nehra S., Bhardwaj V., Kar S., Saraswat D.* Chronic hypobaric hypoxia induces right ventricular hypertrophy and apoptosis in rats: therapeutic potential of nanocurcumin in improving adaptation. High Alt. Med. Biol. 17(4): 342–352. 2016.
62. *Xie Y., Zhu W.Z., Zhu Y., Chen L., Zhou Z.N., Yang H.T.* Intermittent high altitude hypoxia protects the heart against lethal Ca^{2+} overload injury. Life Sci. 76(5): 559–772. 2004.
63. *Strnisková M., Ravingerová T., Neckár J., Kolár F., Pastoreková S., Barancík M.* Changes in the expression and/or activation of regulatory proteins in rat hearts adapted to chronic hypoxia. Gen. Physiol. Biophys. 25(1): 25–41. 2006.
64. *Milano G., von Segesser L.K., Morel S., Joncic A., Bianciardi P., Vassalli G., Samaja M.* Phosphorylation of phosphatidylinositol-3-kinase-protein kinase B and extracellular signal-regulated kinases 1/2 mediate reoxygenation-induced cardioprotection during hypoxia. Exp. Biol. Med. (Maywood). 235(3): 401–410. 2010.
65. *Ravingerová T., Matejíková J., Neckár J., Andelová E., Kolár F.* Differential role of PI3K/Akt pathway in the infarct size limitation and antiarrhythmic protection in the rat heart. Mol. Cell. Biochem. 297(1–2): 111–120. 2007.
66. *Jia W., Jian Z., Li J., Luo L., Zhao L., Zhou Y., Tang F., Xiao Y.* Upregulated ATF6 contributes to chronic intermittent hypoxia-afforded protection against myocardial ischemia/reperfusion injury. Int. J. Mol. Med. 37(5): 1199–1208. 2016.

67. *Kolar D., Gresikova M., Waskova-Arnostova P., Elsnicova B., Kohutova J., Hornikova D., Vebr P., Neckar J., Blahova T., Kasparova D., Novotny J., Kolar F., Novakova O., Zurmanova J.M.* Adaptation to chronic continuous hypoxia potentiates Akt/HK2 anti-apoptotic pathway during brief myocardial ischemia/reperfusion insult. Mol. Cell Biochem. 432(1–2): 99–108. 2017.
68. *Larsen K.O., Lygren B., Sjaastad I., Krobert K.A., Arnkvaern K., Florholmen G., Larsen A.K., Levy F.O., Taskén K., Skjønsberg O.H., Christensen G.* Diastolic dysfunction in alveolar hypoxia: a role for interleukin-18-mediated increase in protein phosphatase 2A. Cardiovasc. Res. 80(1): 47–54. 2008.
69. *Morel S., Milano G., Ludunge K.M., Corno A.F., Samaja M., Fleury S., Bonny C., Kappenberger L., von Segesser L.K., Vassalli G.* Brief reoxygenation episodes during chronic hypoxia enhance posthypoxic recovery of LV function: role of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. Basic Res. Cardiol. 101(4): 336–345. 2006.
70. *Milano G., Morel S., Bonny C., Samaja M., von Segesser L.K., Nicod P., Vassalli G.* A peptide inhibitor of c-Jun NH2-terminal kinase reduces myocardial ischemia-reperfusion injury and infarct size in vivo. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 292(4): H1828–H1835. 2007.
71. *Heidbreder M., Naumann A., Tempel K., Dominiak P., Dendorfer A.* Remote vs. ischaemic preconditioning: the differential role of mitogen-activated protein kinase pathways. Cardiovasc. Res. 78(1): 108–115. 2008.
72. *He S., Liu S., Wu X., Xin M., Ding S., Xin D., Ouyang H., Zhang J.* Protective role of downregulated MLK3 in myocardial adaptation to chronic hypoxia. J. Physiol. Biochem. 73(3): 371–380. 2016.
73. *Zhao Y.S., An J.R., Yang S., Guan P., Yu F.Y., Li W., Li J.R., Guo Y., Sun Z.M., Ji E.S.* Hydrogen and oxygen mixture to improve cardiac dysfunction and myocardial pathological changes induced by intermittent hypoxia in rats. Oxid. Med. Cell Longev. 2019: 7415212. 2019.
74. *Wagner C., Tillack D., Simonis G., Strasser R.H., Weinbrenner C.* Ischemic post-conditioning reduces infarct size of the in vivo rat heart: role of PI3-K, mTOR, GSK-3beta, and apoptosis. Mol. Cell Biochem. 339(1–2): 135–147. 2010.
75. *Miura T., Miki T.* GSK-3β, a therapeutic target for cardiomyocyte protection. Circ. J. 73(7): 1184–1192. 2009.
76. *McCarthy J., Lochner A., Opie L.H., Sack M.N., Essop M.F.* PKCε promotes cardiac mitochondrial and metabolic adaptation to chronic hypobaric hypoxia by GSK3β inhibition. J. Cell Physiol. 226(9): 2457–2468. 2011.
77. *Waskova-Arnostova P., Elsnicova B., Kasparova D., Hornikova D., Kolar F., Novotny J., Zurmanova J.* Cardioprotective adaptation of rats to intermittent hypobaric hypoxia is accompanied by the increased association of hexokinase with mitochondria. J. Appl. Physiol. (1985). 119(12): 1487–1493. 2015.
78. *Nedvedova I., Kolar D., Elsnicova B., Hornikova D., Novotny J., Kalous M., Pravenec M., Neckar J., Kolar F., Zurmanova J.M.* Mitochondrial genome modulates myocardial Akt/Glut/HK salvage pathway in spontaneously hypertensive rats adapted to chronic hypoxia. Physiol. Genomics. 50(7): 532–541. 2018.
79. *Zhang J., Li X.X., Bian H.J., Liu X.B., Ji X.P., Zhang Y.* Inhibition of the activity of Rho-kinase reduces cardiomyocyte apoptosis in heart ischemia/reperfusion via suppressing JNK-mediated AIF translocation. Clin. Chim. Acta. 401(1–2): 76–80. 2009.
80. *Bao W., Hu E., Tao L., Boyce R., Mirabile R., Thudium D.T., Ma X.L., Willette R.N., Yue T.L.* Inhibition of Rho-kinase protects the heart against ischemia/reperfusion injury. Cardiovasc. Res. 61(3): 548–558. 2004.
81. *Gosal K., Dunlop K., Dhaliwal R., Ivanovska J., Kantores C., Desjardins J.F., Connelly K.A., McNamara P.J., Jain A., Jankov R.P.* Rho kinase mediates right ventricular systolic dysfunction in rats with chronic neonatal pulmonary hypertension. Am. J. Respir. Cell Mol Biol. 52(6): 717–727. 2015.
82. *Wang Z.H., Zhu D., Xie S., Deng Y., Pan Y., Ren J., Liu H.G.* Inhibition of Rho-kinase attenuates left ventricular remodeling caused by chronic intermittent hypoxia in rats via suppressing myocardial inflammation and apoptosis. J. Cardiovasc. Pharmacol. 70(2): 102–109. 2017.
83. *Grover G.J., Garlid K.D.* ATP-Sensitive potassium channels: a review of their cardioprotective pharmacology. J. Mol. Cell Cardiol. 32(4): 677–695. 2000.
84. *Peart J.N., Gross G.J.* Sarcolemmal and mitochondrial K_{ATP} channels and myocardial ischemic preconditioning. J. Cell Mol. Med. 6(4): 453–464. 2002.
85. *Gross G.J., Peart J.N.* K_{ATP} channels and myocardial preconditioning: an update. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 285(3): H921–H930. 2003.
86. *Baker J.E., Contney S.J., Gross G.J., Bosnjak Z.J.* K_{ATP} channel activation in a rabbit model of chronic myocardial hypoxia. J. Mol. Cell Cardiol. 29(2): 845–848. 1997.
87. *Zhu Z., Burnett C.M., Maksymov G., Stepniak E., Sierra A., Subbotina E., Anderson M.E., Coetzee W.A., Hodgson-Zingman D.M., Zingman L.V.* Reduction in number of sarcolemmal KATP channels slows cardiac action potential duration shortening under hypoxia. Biochem. Biophys. Res. Commun. 415(4): 637–641. 2011.
88. *Crawford R.M., Jovanović S., Budas G.R., Davies A.M., Lad H., Wenger R.H., Robertson K.A., Roy D.J., Ranki H.J., Jovanović A.* Chronic mild hypoxia protects heart-derived H9c2 cells against acute hypoxia/reoxygenation by regulating expression of the SUR2A subunit of the ATP-sensitive K^+ channel. J. Biol. Chem. 278(33): 31444-31455. 2003.

89. *Kolar F., Nekar J., Ostadal B., Maslov L.N., Stakheev D.L., Tayurskaya A.S., Lishmanov Y.B.* Role of ATP-sensitive K+-channels in antiarrhythmic and cardioprotective action of adaptation to intermittent hypobaric hypoxia. Bull. Exp. Biol. Med. 145(4): 418–421. 2008.
90. *Нарыжная Н.В., Некар Я., Маслов Л.Н., Лишманов Ю.Б., Колар Ф., Ласукова Т.В.* Роль сарколеммальных и митохондриальных $K_{АТФ}$-каналов в реализации кардиопротективного и антиаритмического эффектов разных режимов гипобарической адаптации. Рос физиол журн им. И.М. Сеченова. 95(8): 837–849. 2009. [*Naryzhnaia N.V., Neckar J., Maslov L.N., Lishmanov Iu.B., Kolar F., Lasukova T.V.* The role of sarcolemmal and mitochondrial K_{ATP}-channels in realization of the cardioprotection and antiarrhythmic effect of different regimens of hypobaric adaptation. Russ. J. Physiol. 95(8): 837–849. 2009. (In Russ].
91. *Lishmanov Y.B., Naryzhnaya N.V., Tsibul'nikov S.Y., Wang H., Maslov L.N.* Role of ATP-Sensitive K+ channels in myocardial infarct size-limiting effect of chronic continuous normobaric hypoxia. Bull. Exp. Biol. Med. 163(1): 22–24. 2017.

The Role of MicroRNAs, NO Synthases, Kinases, K_{ATP} Channels in the Infarction-Limiting Effect of Adaptation to Hypoxia

N. V. Naryzhnaya[a], N. S. Voronkov[a, b], A. A. Scriabina[b], Yu. V. Bushov[b], and L. N. Maslov[a, *]

[a] *Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the RAS, Tomsk, Russia*

[b] *National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia*

**e-mail: Maslov@cardio-tomsk.ru*

It has been established that chronic hypoxia (CH) significantly alters the expression of microRNAs in the myocardium. It was shown that miR-138 and miR-184 increase the tolerance of cardiomyocytes to hypoxia, while microRNA 199a 5p and miR-23b decrease the resistance of cardiomyocytes to hypoxia. CH enhanced expression of inducible NO synthase (iNOS) and endothelial NO synthase (eNOS). It was shown the cardioprotective effect of CH is associated with the activation of iNOS. It was found that the infarction-limiting effect of chronic CH depends on mitoK_{ATP} channel opening. It was established that the δ and ε isoforms of protein kinase C are involved in the cardioprotective effect of adaptation to hypoxia. Chronic hypoxia has been shown to increase expression of kinases: CaMKII, p-ERK1/2, p-p38, p-Akt, hexokinase-1, hexokinase-2. Hypoxia enhances the hexokinase-2 translocation to mitochondria. In animals adapted to hypoxia, it was not detected an increase in the expression of kinases: PKA, p-GSK3β, AMPK and JNK. Presented data are indicated that ERK1/2, MEK1/2 kinases are involved in the cardioprotective effect of adaptation to hypoxia. Myocardial hypertrophy caused by chronic hypoxia is associated with the activation of Rho kinase. The role of PI3K, Akt JNK, PKG, Rho kinase, mTOR, and p38 kinase in the protective effect of adaptation to hypoxia is controversial. The purpose of the review: analysis of data on the role of miRNAs, NO synthase, and kinases in the cardioprotective effect of CH.

Keywords: heart, chronic hypoxia, microRNA, NO synthase, K_{ATP} channels

ЦИТИРОВАТЬ:

Нарыжная Н.В., Воронков Н.С., Скрябина А.А., Бушов Ю.В., Маслов Л.Н. Роль микроРНК, NO-синтаз, киназ, $K_{АТФ}$-каналов в инфаркт-лимитирующем эффекте адаптации к гипоксии. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(1): 3–16.

DOI: 10.31857/S0869813920010112

TO CITE THIS ARTICLE:

Naryzhnaya N.V., Voronkov N.S., Scriabina A.A., Bushov Yu.V., Maslov L.N. The Role of microRNAs, NO Synthases, Kinases, K_{ATP} Channels in the Infarction-Limiting Effect of Adaptation to Hypoxia. Russian Journal of Physiology. 106(1): 3–16.

DOI: 10.31857/S0869813920010112

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 1, с. 17–30

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ВЛИЯНИЕ БЛОКАДЫ ВЕГЕТАТИВНЫХ ГАНГЛИЕВ, М-ХОЛИНО- И β-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ МИОКАРДА НА ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ СЕРДЕЧНОГО РИТМА КРЫС

© 2020 г. Е. В. Курьянова[1, *], А. В. Трясучев[1], В. О. Ступин[1], Ю. Д. Жукова[1], Н. А. Горст[1]

[1]Астраханский государственный университет, Астрахань, Россия

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

Поступила в редакцию 15.05.2019 г.
После доработки 17.09.2019 г.
Принята к публикации 08.10.2019 г.

Анализ вариабельности сердечного ритма (ВСР) у крыс выявил, что блокада вегетативных узлов (гексаметоний, 7 мг/кг) повышает ЧСС на 12–16%, снижает мощность очень низкочастотных волн на 85% ($p < 0.001$), низкочастотных – на 60% ($p < 0.05$), высокочастотных – на 40% ($p < 0.05$). Блокада М-холинорецепторов (атропин, 1 мг/кг) повышает ЧСС на 30% ($p < 0.001$) и снижает мощность всех волн ВСР ритма на 96–98% ($p < 0.001$). Блокада β-адренорецепторов (анаприлин, 2 мг/кг) снижает ЧСС на 25% ($p < 0.001$) и мощность очень низкочастотных волн на 70% ($p < 0.05$). На фоне блокады вегетативных ганглиев введение атропина снижает мощность волн сердечного ритма в меньшей мере, а введение анаприлина мало изменяет ЧСС, но потенцирует рост мощности высокочастотных волн. Таким образом, регуляторные влияния через М-холинорецепторы кардиомиоцитов отвечают за формирование мощности всех волн вариабельности сердечного ритма. Взаимодействие холинергических механизмов с сигналами, поступающими через вегетативные узлы и β-адренорецепторы, определяет мощность низкочастотных волн. Активность вегетативных узлов влияет на характер и выраженность изменений сердечного ритма при воздействии на холино- и адренорецепторы миокарда.

Ключевые слова: вариабельность сердечного ритма, спектральный анализ, блокада вегетативных узлов, блокада М-холинорецепторов, блокада β-адренорецепторов, гексаметоний, атропин, анаприлин

DOI: 10.31857/S0869813920010070

Методы анализа вариабельности сердечного ритма (ВСР) весьма широко используются для оценки вегетативного баланса организма в медико-биологических и клинических исследованиях [1–7], что требует высокой точности и объективности физиологической интерпретации показателей ВСР. Традиционно мощность высокочастотных или дыхательных волн (HF-волн) рассматривается в качестве показателя активности парасимпатических влияний, а мощность низкочастотных или вазомоторных волн (LF-волн) – как критерий активности симпатических влияний на сердце [1–5, 8]. Однако блокада М-холинорецепторов атропином снижает мощность не только HF-волн, но и других волн спектра ВСР [4, 6, 8–12]. В свою очередь мощность LF-волн после введения блокаторов β-адренорецепторов изменяется неоднозначно, может как повышаться, так и снижаться [6, 12–14]. То есть,

по данным литературы, исключительно парасимпатическая природа HF-волн и симпатическая природа LF-волн до сих пор не нашли четкого подтверждения. Поэтому вопрос о роли холинергических и адренергических механизмов в формировании волн спектра ВСР требует продолжения исследований для уточнения известных трактовок параметров ВСР, поскольку от этого зависит адекватность заключений, имеющих значение для прогнозирования состояния организма, выбора тактики лечения и т.п. В этой связи важно выяснить причины неоднозначного изменения мощности волн ВСР в фармакологических пробах (анаприлиновой, атропиновой и др.). Следует отметить, что при изучении физиологической природы волн ВСР внимание ученых сконцентрировано в основном на адрено- и холинорецепторах кардиомиоцитов [3, 4, 6, 8, 10, 12, 13, 15], роль вегетативных ганглиев рассматривается редко [9, 16]. Между тем вегетативные ганглии являются мощными периферическими нервными центрами, интегрирующими и передающими к сердцу сигналы от отделов ЦНС и различных рефлексогенных зон. Через вегетативные узлы замыкаются местные рефлекторные дуги, благодаря чему они оказывают самостоятельное регуляторное влияние на периферические органы [17–19]. Поэтому для уточнения представлений о вегетативных нервных механизмах вариабельности кардиоинтервалов необходимо моделирование воздействий не только на периферические холино- и адренорецепторы, но на вегетативные ганглии. Возможно, это позволит лучше понять причины неоднозначных эффектов традиционных фармакологических проб в отношении ВСР и раскрыть роль взаимодействия ганглионарного и эффекторного уровней в формировании ВСР. В этой связи цель настоящей работы – исследовать роль ганглионарного и эффекторного уровней вегетативной регуляции функций в формировании волн ВСР с применением однократного и комбинированного введения блокаторов N- и M-холинорецепторов, β-адренорецепторов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнены на 70 половозрелых крысах-самцах 4–5-месячного возраста из вивария при лаборатории экспериментальной физиологии Астраханского государственного университета. До и в период эксперимента животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды (температура воздуха 24–26°C, относительная влажность 35–40%, освещение в помещениях – искусственное, с фиксированным режимом 12 ч день и 12 ч ночь), в пластиковых клетках с мелкой древесной стружкой на стандартном рационе – комбикорм гранулированный полнорационный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ 50258-92 производства ООО “Лабораторкорм”. Животные потребляли корм и воду ad libitum.

Все эксперименты выполнялись в соответствии с Национальным стандартом РФ ГОСТ Р-53434-2009 “Принципы надлежащей лабораторной практики”, Приказом Минздрава РФ от 01.04.2016 г. № 199н “Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики” и Европейской конвенции Directive 2010/63/EU of 22 September 2010. Эксперименты проведены в осенне-зимний период.

ЭКГ регистрировали у бодрствующих нефиксированных крыс на аппаратно-программном комплексе “Варикард” (Рамена, Россия) с частотой дискретизации сигнала 1200 Гц. Отведение ЭКГ осуществляли с помощью миниатюрных электродов-зажимов при местном обезболивании лидокаином, как описано ранее [9, 11]. До введения препаратов у всех животных записывали ЭКГ и рассчитывали исходные показатели ВСР в состоянии спокойного бодрствования.

На первом этапе исследований для проведения фармакологических проб экспериментальные животные были разделены на три группы, которым однократно вво-

дили 1) блокатор N-холинорецепторов гексаметоний в дозе, достаточной для блокады передачи сигнала в вегетативных узлах (7 мг / кг, Sigma, $n = 12$), [9, 15, 16]; 2) неселективный блокатор М-холинорецепторов атропин (1 мг/кг, ГНЦЛС, Украина, $n = 12$) [6, 10, 12]; 3) неселективный блокатор β-адренорецепторов анаприлин (2 мг/кг, ИФА, Россия, $n = 12$) [6, 8, 12, 14]. Контролем служили животные ($n = 16$), получавшие однократную инъекцию физиологического раствора (0.1 мл/100 г).

На втором этапе исследований использовали комбинированные пробы, когда динамику показателей ВСР у животных экспериментальных групп (по 6 особей) анализировали при последовательном введении: 1) гексаметония (7 мг/кг) и М-холиноблокатора атропина (1 мг/кг) [2], 2) гексаметония (7 мг/кг) и β-адреноблокатора анаприлина (2 мг/кг). Для выявления особенностей эффектов атропина и анаприлина на фоне блокады вегетативных ганглиев контрольные животные (6 особей) также получали гексаметоний (7 мг/кг), а затем – инъекцию физиологического раствора (0.1 мл/100 г). Временной интервал между инъекциями гексаметония и блокатора М-холинорецепторов (или β-адренорецепторов) составлял 10–15 мин. Все препараты вводили внутрибрюшинно.

Регистрацию ЭКГ и анализ ВСР выполняли в течение первых 5–10 мин после введения препаратов, когда, согласно [20], развиваются их периферические эффекты.

Измерение R–R-интервалов и обработку данных осуществляли в компьютерной программе ИСКИМ6 (Рамена, Россия). Для анализа из каждой записи брали непрерывные и стационарные ряды из 350 R–R-интервалов. Определяли ЧСС (уд./мин), индекс напряжения (отн. ед.) [1, 9, 11] с учетом ширины класса гистограммы 7.8 мс: ИН = (АМо/2 × ΔХ × Мо) × (50/7.8) × 1000. Спектральный анализ ВСР проводили в диапазонах высокой частоты, high frequency – HF(0.9–3.5 Гц), низкой частоты, low frequency – LF (0.32–0.9 Гц), очень низкой частоты, very low frequency – VLF (0.15–0.32 Гц) [9, 11]. Рассчитывали абсолютную ($мс^2$) и относительную (%) мощность волн в каждом диапазоне, индекс централизации (IC) (отн. ед.) [1]: IC = (LF + VLF)/HF.

Результаты исследования обработаны статистически в программе Statistica 10.0 с использованием возможностей описательной статистики, параметрического критерия Стьюдента и непараметрического критерия Манна–Уитни. Из описательной статистики приведены средние значения и их ошибки ($M \pm m$). Достоверность изменений показателей ВСР в результате экспериментальных воздействий по сравнению с исходным состоянием оценивали по критерию U Манна–Уитни. Достоверность различий между контрольной и экспериментальными группами определяли по критерию t Стьюдента. Различия между средними считали достоверными при $p < 0.05$. Выявленные различия подтверждены результатами дисперсионного анализа (ANOVA, Statistica 10.0). При представлении результатов в графическом виде учтены стандартные отклонения средних и квартили.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исходном состоянии у самцов крыс ЧСС колебалась в пределах 300–360 уд./мин, ИН – 12–30 отн. ед., мощность волн спектра ВСР соответствовала ранее опубликованным данным (5–20 $мс^2$) [9, 11]. У большинства крыс HF-волны составляли 30–50%, а волны LF и VLF в совокупности 50–70% от общей мощности спектра, поэтому индекс централизации был выше 1 отн. ед. (табл. 1).

После однократного введения гексаметония в течение 10 мин ЧСС повысилась на 12% ($p < 0.01$). Одновременно индекс напряжения увеличился почти в 2.8 раза ($p < 0.001$) и стал значительно выше, чем у контрольных животных ($p < 0.001$) (табл. 1). Быстрое нарастание напряженности ритма сердца у крыс определялось весьма зна-

Таблица 1. Изменения параметров ВСР крыс после однократного введения блокаторов N-холинорецепторов, М-холинорецепторов и β-адренорецепторов, $M \pm m$
Table 1. Changes of Heart Rate Variability Parameters of Rats After a Single Injection of N- and M-Acetylcholine Receptor и β-Adrenergic Receptors Blockers, $M \pm m$

Показатели Parameters	Группы Groups	Исходное состояние The initial state	После введения препарата After the introduction of drug
ЧСС, уд./мин Heart rate frequency, beats/min	Контроль Control (n = 16)	321.1 ± 6.7	310.6 ± 5.9
	Гексаметоний Hexametonium (n = 12)	309.2 ± 6.4	346.9 ± 9.7**, ##
	Атропин Atropine (n = 12)	330.1 ± 10.7	426.8 ± 16.4***, ###
	Анаприлин Anapriline (n = 12)	337.3 ± 14.8	264.8 ± 11.0**, ###
Индекс напряжения, отн.ед. Stress Index, rel. units	Контроль Control (n = 16)	29.1 ± 2.9	29.0 ± 4.9
	Гексаметоний Hexametonium (n = 12)	26.9 ± 4.1	76.8 ± 11.2***, ###
	Атропин Atropine (n = 12)	23.1 ± 3.8	256.5 ± 41.9***, ###
	Анаприлин Anapriline (n = 12)	22.6 ± 3.7	39.0 ± 6.4*
HF-волны, мс^2 HF-waves, ms^2	Контроль Control (n = 16)	6.5 ± 0.9	8.4 ± 1.3
	Гексаметоний Hexametonium (n = 12)	7.6 ± 2.7	4.7 ± 1.9
	Атропин Atropine (n = 12)	8.5 ± 1.9	0.5 ± 0.1***, ###
	Анаприлин Anapriline (n = 12)	6.8 ± 1.1	5.1 ± 1.9*
LF-волны, мс^2 LF-waves, ms^2	Контроль Control (n = 16)	3.8 ± 0.7	4.3 ± 0.9
	Гексаметоний Hexametonium (n = 12)	2.4 ± 0.4	0.8 ± 0.3**, ##
	Атропин Atropine (n = 12)	7.3 ± 1.2	0.1 ± 0.03***, ##
	Анаприлин Anapriline (n = 12)	7.4 ± 1.1	4.3 ± 1.1*
VLF- волны, мс^2 VLF-waves, ms^2	Контроль Control (n = 16)	4.4 ± 0.9	4.8 ± 1.2
	Гексаметоний Hexametonium (n = 12)	4.2 ± 0.7	0.7 ± 0.1***, ##
	Атропин Atropine (n = 12)	6.8 ± 1.4	0.2 ± 0.1***, ###
	Анаприлин Anapriline (n = 12)	8.3 ± 1.3	2.4 ± 0.9***

Таблица 1. Окончание

Показатели Parameters	Группы Groups	Исходное состояние The initial state	После введения препарата After the introduction of drug
%HF	Контроль Control ($n = 16$)	48.0 ± 4.4	54.1 ± 3.3
	Гексаметоний Hexametonium ($n = 12$)	48.3 ± 5.9	66.9 ± 4.2$^{*, \#}$
	Атропин Atropine ($n = 12$)	38.1 ± 5.7	65.2 ± 4.2$^{**, \#}$
	Анаприлин Anapriline ($n = 12$)	32.1 ± 3.9	44.2 ± 4.9
%LF	Контроль Control ($n = 16$)	24.4 ± 2.7	21.5 ± 1.7
	Гексаметоний Hexametonium ($n = 12$)	18.6 ± 2.2	14.8 ± 1.7$^{\#}$
	Атропин Atropine ($n = 12$)	33.9 ± 5.4	14.4 ± 1.2$^{***, \#\#}$
	Анаприлин Anapriline ($n = 12$)	31.9 ± 2.1	36.5 ± 3.7$^{\#\#\#}$
%VLF	Контроль Control ($n = 16$)	27.7 ± 3.4	25.2 ± 3.0
	Гексаметоний Hexametonium ($n = 12$)	33.3 ± 4.4	18.3 ± 3.8*
	Атропин Atropine ($n = 12$)	34.2 ± 5.9	20.4 ± 3.9
	Анаприлин Anapriline ($n = 12$)	36.1 ± 3.1	19.1 ± 2.8***
Индекс централизации, отн. ед. Centralization Index, rel. units	Контроль Control ($n = 16$)	1.4 ± 0.2	1.0 ± 0.1
	Гексаметоний Hexametonium ($n = 12$)	1.4 ± 0.3	0.6 ± 0.1*
	Атропин Atropine ($n = 12$)	2.5 ± 0.6	0.6 ± 0.1**
	Анаприлин Anapriline ($n = 12$)	2.7 ± 0.5	2.0 ± 0.7

Примечание. Достоверность различий по сравнению с исходным состоянием в каждой группе рассчитана по U-критерию Манна–Уитни: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$); достоверность различий по сравнению с контрольной группой рассчитана по t-критерию Стьюдента: $^{\#}$ ($p < 0.05$), $^{\#\#}$ ($p < 0.01$), $^{\#\#\#}$ ($p < 0.001$). Достоверность влияния гексаметония, атропина, анаприлина на ВСР подтверждена дисперсионным анализом (ANOVA, Statistica.10).

The significant differences in comparison with an initial condition in each group were calculated by Mann–Whitney U-test: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$); the significant differences in comparison with an control group were calculated by Student's t test: $^{\#}$ ($p < 0.05$), $^{\#\#}$ ($p < 0.01$), $^{\#\#\#}$ ($p < 0.001$). Reliability of influence of Hexametonium, Atropine, Anapriline on HRV were confirmed by analysis of variance (ANOVA, Statistica.10).

чительным ослаблением LF- и VLF-волн (на 66%, $p < 0.01$ и 83%, $p < 0.001$ соответственно), а также некоторым снижением мощности HF-волн (на 38%). В результате изменилось соотношение спектральных компонент: доля VLF сократилась до 15% ($p < 0.05$), а доля HF выросла до 67% ($p < 0.05$). Индекс централизации снизился на 57% ($p < 0.05$), что обычно расценивается как признак ослабления централизации управления ритмом сердца [1]. То есть, блокада вегетативных узлов вызвала падение мощности волн низкочастотной части спектра, особенно VLF, а также, хотя и в меньшей мере, отразилась на мощности волн HF-диапазона (дыхательных волнах), что в совокупности обусловило значительный рост напряженности ритма сердца. Приведенные данные вполне согласуются с ранее опубликованными [9], и дают основание говорить, что сигналы, поступающие к сердцу через вегетативные узлы, влияют на формирование преимущественно LF-и VLF-колебаний длительности кардиоинтервалов.

После введения атропина в течение первых 2–3 мин ЧСС у животных выросла почти на треть от исходной ($p < 0.001$) и превысила в покое 400 уд./мин, индекс напряжения увеличился в 11 раз ($p < 0.001$) (табл. 1). Кардиоинтервалограмма практически выровнялась, поскольку вариабельность кардиоинтервалов снизилась во всех спектральных диапазонах: LF – на 98% ($p < 0.001$), VLF – на 97% ($p < 0.001$), HF – на 96.5% ($p < 0.001$). Мощности всех волн на фоне атропина не превышали 0.1–0.5 мс^2, причем наименьшие величины регистрировались в низкочастотной области спектра, несколько большей была мощность HF-волн (табл. 1). Соответственно в структуре спектра ВСР доля HF-волн достигла 65% ($p < 0.05$) от суммарной мощности, вклад медленных волн сократился до 14–20%, индекс централизации стал ниже исходного на 76% ($p < 0.01$). То есть, эффекты атропина сходны по характеру изменений ВСР с эффектами гексаметония, но выражены значительно сильнее, распространяются на весь спектральный диапазон, включая не только HF, но LF и VLF-волны.

Введение блокатора β-адренорецепторов анаприлина в течение 5–7 мин привело, как и ожидалось, к урежению ЧСС (на 21.5%, $p < 0.01$) (табл. 1). Вариабельность кардиоинтервалов изменилась в сторону снижения, ослабление мощности HF- и LF-волн произошло на 37–38% ($p < 0.05$), в VLF-диапазоне мощность колебаний снизилась более резко (на 68%, $p < 0.001$). В связи с этим доля VLF-волн в спектре сократилась до 20% ($p < 0.001$), а вклад HF-волн несколько увеличился. Снижение индекса централизации после введения анаприлина было статистически незначимыми. Очевидно, в сравнении с блокаторами N- и M-холинорецепторов, блокатор β-адренорецепторов вызвал наименее выраженные изменения ВСР. Несмотря на урежение ЧСС, мощность волн спектра ВСР при введении анаприлина также снизилась, особенно в VLF-диапазоне.

Таким образом, при разнонаправленном воздействии на ЧСС блокаторы N- и M-холинорецепторов и блокатор β-адренорецепторов вызвали снижение вариабельности кардиоинтервалов, особенно сильно в низкочастотных диапазонах (VLF, LF). HF-волны при блокаде вегетативных узлов и β-адренорецепторов снизилась в меньшей степени – всего на 30–40%, и только при блокаде M-холинорецепторов – на 96%. По выраженности эффектов в отношении мощности волн ВСР блокаторы можно расположить в порядке: атропин $\gg$ гексаметоний $>$ анаприлин. Обнаруженные изменения свидетельствуют, что регуляторные влияния через M-холинорецепторы, β-адренорецепторы и вегетативные узлы в той или иной мере вовлечены в формирование волн всех частотных диапазонов спектра ВСР.

На втором этапе работы анализировалась динамика параметров ВСР при последовательном введении гексаметония и блокаторов M-холинорецепторов, β-адренорецепторов (рис. 1, 2). Как и в первой серии, введение гексаметония привело к росту ЧСС на 7–16% ($p < 0.01$) и ИН в 2–3.5 раза ($p < 0.01$). При этом мощность волн спек-

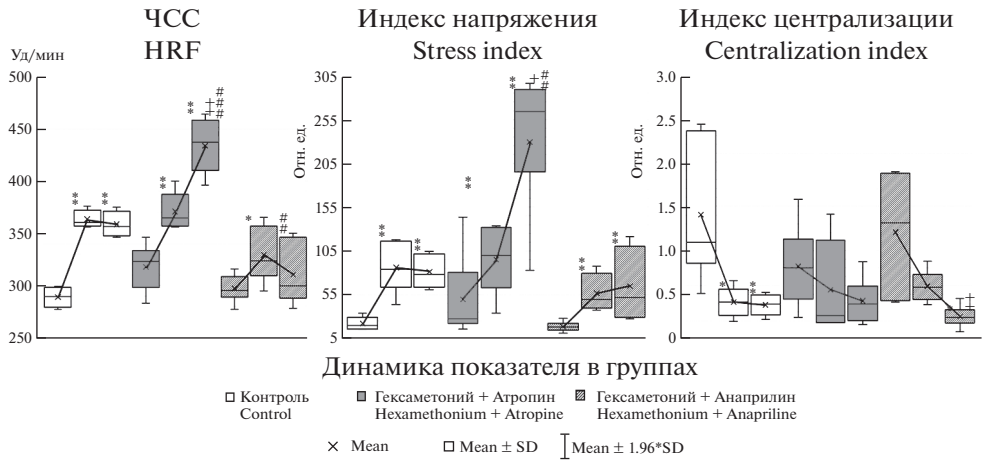

Рис. 1. Динамика ЧСС, индекса напряжения и индекса централизации при последовательном введении гексаметония и блокаторов М-холинорецепторов (атропина), β-адренорецепторов (анаприлина). Из программы Statistica 10.0. На графиках в каждой группе первая точка – исходное состояние ($n = 6$), вторая точка – после введения гексаметония ($n = 6$), третья точка – после введения атропина (анаприлина) в эксперименте или физиологического раствора в контроле ($n = 6$). Достоверность различий по сравнению с исходным состоянием в каждой группе рассчитана по U-критерию Манна–Уитни: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$); достоверность различий по сравнению с состоянием после введения гексаметония в каждой группе рассчитана по U-критерию Манна–Уитни: + ($p < 0.05$), ++ ($p < 0.01$), +++ ($p < 0.001$); достоверность различий по сравнению с контрольной группой рассчитана по *t*-критерию Стьюдента: #($p < 0.05$), ## ($p < 0.01$), ### ($p < 0.001$). Достоверность влияния гексаметония, атропина, анаприлина на ВСР подтверждена дисперсионным анализом (ANOVA, Statistica.10).

Fig. 1. Dynamics of heart rate frequency (HRF), stress index and centralization index with the sequential administration of hexamethonium and blockers of M-cholinergic receptors (atropine), β-adrenergic receptors (anapriline). From the program Statistica 10.0. On the *graphs* in each group, the first point is the initial state ($n = 6$), the second point after the introduction of hexamethonium ($n = 6$), the third point after the introduction of atropine (anapriline) in the experiment or physiological saline in the control ($n = 6$). The significant differences compared with the initial state in each group was calculated using the Mann–Whitney U-test: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$); the significant differences compared with the state after the introduction of hexamethonium in each group was calculated according to the Mann–Whitney U-test: + ($p < 0.05$), ++ ($p < 0.01$), +++ ($p < 0.001$); the significant differences compared with the control group was calculated using the Student *t*-test: # ($p < 0.05$), ## ($p < 0.01$), ### ($p < 0.001$). The significant effects of hexamethonium, atropine, anapriline on HRV was confirmed by analysis of variance (ANOVA, Statistica.10).

тра снизилась в диапазоне VLF – на 82–88% и LF – на 53–83% ($p < 0.05 - p < 0.01$), в меньшей мере в диапазоне HF – на 50–60% от исходной. В результате у всех животных на фоне гексаметония доля HF в спектре выросла до 65–70%, а вклад LF и VLF сократился до 12–16% и 14–20% соответственно. Индекс централизации стал ниже 1 отн. ед. ($p < 0.1 - p < 0.05$) из-за особенно сильного снижения мощности низкочастотных волн.

На фоне блокады вегетативных узлов введение атропина привело в течение первых 2–5 мин к дальнейшему росту ЧСС (еще на 16.8%, $p < 0.01$), в результате она достигла 420–450 уд./мин, то есть суммарный прирост ЧСС составил 36% от исходной ($p < 0.01$). Индекс напряжения после введения атропина увеличился еще в 2.3 раза ($p < 0.05$) и превысил 200 отн.ед. в покое. Мощность волн ВСР продолжила сниже-

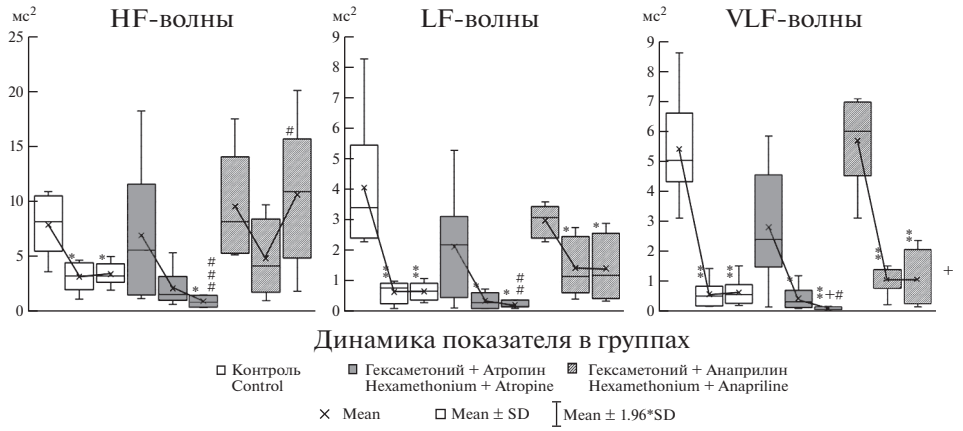

Рис. 2. Динамика мощности волн HF, LF и VLF при последовательном введении гексаметония и блокаторов М-холинорецепторов (атропина), β-адренорецепторов (анаприлина). Из программы Statistica 10.0. На графиках в каждой группе первая точка – исходное состояние ($n = 6$), вторая точка – после введения гексаметония ($n = 6$), третья точка – после введения атропина (анаприлина) в эксперименте или физиологического раствора в контроле ($n = 6$). Достоверность различий по сравнению с исходным состоянием в каждой группе рассчитана по U-критерию Манна–Уитни: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$); достоверность различий по сравнению с состоянием после введения гексаметония в каждой группе рассчитана по U-критерию Манна–Уитни: + ($p < 0.05$), ++ ($p < 0.01$), +++ ($p < 0.001$); достоверность различий по сравнению с контрольной группой рассчитана по *t*-критерию Стьюдента: # ($p < 0.05$), ## ($p < 0.01$), ### ($p < 0.001$). Достоверность влияния гексаметония, атропина, анаприлина на ВСР подтверждена дисперсионным анализом (ANOVA, Statistica 10).

Fig. 2. Dynamics the power of the HF, LF и VLF-waves with the sequential administration of hexamethonium and blockers of M-cholinergic receptors (atropine), β-adrenergic receptors (anapriline). From the program Statistica 10.0. On the graphs in each group, the first point is the initial state ($n = 6$), the second point after the introduction of hexamethonium ($n = 6$), the third point after the introduction of atropine (anapriline) in the experiment or physiological saline in the control ($n = 6$). The significant differences compared with the initial state in each group was calculated using the Mann–Whitney U-test: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$); the significant differences compared with the state after the introduction of hexamethonium in each group was calculated according to the Mann–Whitney U-test: + ($p < 0.05$), ++ ($p < 0.01$), +++ ($p < 0.001$); the significant differences compared with the control group was calculated using the Student *t*-test: # ($p < 0,05$), ## ($p < 0,01$), ### ($p < 0.001$). The significant effects of hexamethonium, atropine, anapriline on HRV was confirmed by analysis of variance (ANOVA, Statistica10).

ние, хотя на фоне блокады вегетативных узлов в LF и VLF-диапазонах она уже составляла не более 0.5 мс^2. Введение атропина ослабило мощность HF-и LF- волн еще на 50% ($p < 0.01$), VLF – на 75% ($p < 0.05$) от тех величин, которые были зарегистрированы на фоне гексаметония (рис. 1, 2). В итоге последовательной блокады N- и М-холинорецепторов мощность HF-волн снизилась на 86% ($p < 0.05$) и находилась в пределах 1 мс^2, мощности LF- и VLF-волн сократились на 90% ($p < 0.05$) и 96% ($p < 0.01$) соответственно, а их абсолютные величины составили всего 0.1–0.2 мс^2. В этой связи доминирование HF-волн в спектре сохранилось и даже усилилось, а индекс централизации стал еще ниже (на 50%). Приведенные данные вполне согласуются с ранее полученными [9], что подтверждает характер эффектов, оказываемых блокаторами N- и М-холинорецепторов на ЧСС и мощность HF-, а также LF- и VLF-волн. Вместе с тем нужно отметить, что изменения ВСР после введения

атропина на фоне блокады вегетативных узлов проявились не столь резко, остаточная мощность волн спектра ВСР была несколько выше, чем после введения только атропина.

Введение анаприлина на фоне блокады вегетативных узлов, вопреки ожиданиям, не привело к существенному урежению ЧСС, хотя по сравнению с контрольной серией ЧСС была ниже ($p < 0.01$) (рис. 1, 2). Кроме того, ни в одном из диапазонов спектра ВСР дальнейшего снижения мощности колебаний не произошло, но в диапазоне HF наблюдалось усиление вариабельности (почти на 120%), поэтому мощность HF-волн оказалась выше, чем в контрольной серии, почти втрое ($p < 0.05$) (рис. 1, 2). По причине некоторого усиления HF-волн их доминирование в спектре ВСР стало еще значительнее (более 75%, $p < 0.05$), а величины индекса централизации – ниже. Эти результаты свидетельствуют об изменении эффектов анаприлина на фоне блокады N-холинергической передачи в вегетативных ганглиях не только в отношении мощности волн ВСР, но даже ЧСС.

Таким образом, предварительная блокада вегетативных узлов гексаметонием несколько модифицировала эффекты блокады М-холинорецепторов и, довольно существенно, эффекты блокады β-адренорецепторов в отношении ЧСС и мощности волн ВСР. Полученные данные позволяют говорить, что функциональная активность вегетативных узлов модулирует реализацию регуляторных влияний через периферические М-холино- и, особенно β-адренорецепторы, то есть имеет место взаимодействие ганглионарного и эффекторного уровней вегетативных нервных влияний при формировании длительности кардиоинтервалов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Выполненное исследование подтвердило, что введение гексаметония в дозе, достаточной для блокады N-холинорецепторов вегетативных узлов [9, 16, 20], потенцирует рост ЧСС и существенное ослабление вариабельности R–R-интервалов во всех диапазонах спектра ВСР, особенно VLF и LF (на 83 и 67% соответственно). Эффекты гексаметония выявляются достаточно стабильно, согласуются с результатами предыдущей работы [9]. Известно, что блокада N-холинергической передачи ограничивает передачу сигналов и в симпатических, и в парасимпатических вегетативных узлах, которые являются периферическими нервными центрами, интегрирующими сигналы от рецепторов внутренних органов, других рецептивных полей, а также от гемодинамического и других центров и отделов мозга [17–19]. Поэтому снижение мощности волн ВСР можно рассматривать как проявление общего ослабления регуляторных влияний, которые обычно поступают к сердцу и другим органам через вегетативные ганглии.

Особо следует отметить, что сигналы, поступающие к сердцу через вегетативные узлы, в наибольшей мере влияют на формирование VLF- и LF-колебаний спектра ВСР. Это в целом согласуется с представлениями Р.М. Баевского и соавт. о природе ВСР [1], с фактами о роли симпатического механизма в образовании низкочастотных и очень низкочастотных волн ВСР, приведенными в статье Ю.Р. Шейх-Заде и соавт. [21] и представлениями об особенностях симпатических регуляторных влияний, поскольку, значительная часть вегетативных узлов являются симпатическими [17–19]. Вместе с тем, ослабление HF-волн почти на 40% позволяет говорить, что N-холинергическая передача также участвует в формировании дыхательных колебаний R–R-интервалов. Учитывая предыдущие исследований [9], полагаем, что в норме примерно половина мощности дыхательных волн ВСР определяется сигналами, поступающими через вегетативные узлы, также существенный вклад вносят внутрисердечные нервные и миогенные механизмы. Подтверждением этому является стойкая умеренная тахикардия, возникающая после вве-

дения гексаметония. Учитывая результаты предыдущих работ [17, 19, 21], она, по-видимому, является реакцией на снижение артериального давления и поддерживается за счет функционирования внутрисердечных рефлекторных дуг и миогенных механизмов в условиях блокады потока сигналов с пре- на постганглионарные нейроны, с учетом [17, 19, 21].

Изменения сердечного ритма после введения М-холиноблокатора оказались весьма резкими и более значительными, чем после N-холиноблокатора. Прирост ЧСС составил почти треть от исходной, мощность волн HF снизилась на 96%, LF и VLF – на 98–97%. Сходные данные по изменению мощности волн спектра ВСР после введения атропина приводятся и в других работах [4, 6, 8, 10–12, 15]. Преобладание эффектов атропина над эффектами гексаметония, имеет ряд причин: 1) М-холинорецепторы передают на клетки миокарда потоки сигналов, идущие не только со стороны ЦНС и рефлексогенных зон через вегетативные ганглии, но и от элементов внутрисердечной нервной системы; 2) атропин блокирует все подтипы миокардиальных М-холинорецепторов, посредством которых холинергические механизмы оказывают ионо- и метаботропные эффекты и влияют на длительность каждого кардиоинтервала [17, 19], модулируя миогенный механизм ВСР [21]. Полагаем, что этот фактор является определяющим в резком падении мощности всех волн спектра ВСР при атропиновой пробе; 3) блокада М-холинорецепторов нарушает взаимодействия на уровне норадренергических и холинергических терминалей путем ослабления холинергического контроля за выделением норадреналина [17, 19, 22]. В результате усиления норадренергических влияний тормозится миогенный и холинергический механизмы вариабельности кардиоинтервалов, особенно в диапазонов низких и очень низких частот спектра ВСР, учитывая данные, приведенные в работе [21]. Кроме того, в одной из недавних работ [11] нами показано, что атропин уменьшает связывание адреналина эритроцитами крови, в свою очередь это способно привести к росту концентрации свободных катехоламинов в крови и усилению адренергических влияний на сердце через гуморальный канал регуляции. Этот фактор, с учетом теории Р.М. Баевского [1], может быть определяющим в развитии сильной тахикардии.

На фоне блокады вегетативных узлов изменения ВСР после введения атропина в значительной мере были сходны с таковыми при его самостоятельном введении. В качестве особенностей можно отметить, что мощности волн HF и LF снизились в меньшей мере. Абсолютная мощность HF-волн в этой серии оказалась почти вдвое выше, чем в серии с введением только атропина. Вероятно, при блокаде N-холинергической передачи снижается выделение норадреналина из окончаний симпатических нервов, поэтому преобладание симпатических влияний над холинергическими после введения атропина выражено слабее. Следовательно, результаты опытов, по-видимому, показывают вклад норадренергических влияний в изменение мощности волн ВСР после введения атропина, и свидетельствуют об определяющей роли именно блокады М-холинорецепторов в этих сдвигах.

Введение блокатора β-адренорецепторов на фоне естественного функционирования вегетативных узлов вызвало урежение ЧСС на четверть от исходной, некоторое ослабление колебаний в HF- и LF-диапазонах и существенное снижение VLF-волн. Такое снижение вариабельности кардиоинтервалов не совпадает с представлениями о четком антагонизме холинергических и адренергических влияний на ритм сердца, при котором блокада β-адренорецепторов должна приводить к повышению мощности волн из-за сдвига вегетативного баланса к преобладанию парасимпатических влияний, согласно данным, приведенным в работах [4, 8, 15, 17]. Однако другие авторы [6, 12–14] также отмечали, что медленные волны изменяются весьма нестабильно при блокаде β-адренорецепторов, возможен и рост, и снижение их мощности. Причиной таких неоднозначных результатов являются, по-видимому,

характерные черты организации адренергических влияний на миокард. Прежде всего, это касается адренорецепторного аппарата кардиомиоцитов. В миокарде присутствуют не только β_1-, но и α_1-, β_2-адренорецепторы, рецепторы серотонина, дофамина [19, 20, 22]. Поэтому блокада β-адренорецепторов с помощью анаприлина не устраняет эффектов стимуляции других адренорецепторов и рецепторов моноаминов. Кроме того, влияния на сердце со стороны вегетативных узлов при блокаде периферических адренорецепторов могут усиливаться благодаря наличию обратных связей [18] с участием не только норадренергических, но и серотонинергических нейронов [22]. Тем не менее, факт снижения вариабельности кардиоинтервалов преимущественно в диапазоне VLF при блокаде β-адренорецепторов свидетельствует, что взаимодействие холинергических и адренергических механизмов в регуляции ритма сердца наиболее активно происходит в диапазоне низких частот ВСР.

Подтверждением значимости функционирования вегетативных узлов для проявления эффектов блокады адренорецепторов миокарда стали результаты комбинированной пробы, когда блокатор β-адренорецепторов на фоне гексаметония не вызвал значимого урежения ЧСС и снижения мощности волн, а напротив, потенцировал рост мощности в диапазоне HF. Последнее может рассматриваться как четкое преобладание автономного контура [1], характеризующегося синхронным взаимодействием миогенного и холинергического механизмов регуляции ритма сердца [21]. Сопоставляя результаты двух серий экспериментов с введением анаприлина, можно прийти к заключению, что блокада вегетативных узлов ослабляет регуляторные влияния (адренергические, серотонинергические и др.), которые могут тормозить или компенсировать сдвиг вегетативного баланса в сторону преобладания холинергических влияний, который ожидается при введении блокатора β-адренорецепторов [6, 8, 12, 14]. Поэтому для более детального анализ роли адренергических механизмов в формировании волн ВСР требуются комбинированные пробы и модели, учитывающие разнообразие рецепторного аппарата кардиомиоцитов и состояние вегетативных нервных узлов, среди которых много симпатических.

Обращаясь к индексу напряжения и индексу централизации необходимо отметить, что введение блокаторов N- и M-холинорецепторов и β-адренорецепторов вызвало в той или иной мере повышение индекса напряжения и снижение индекса централизации. Главной причиной роста индекса напряжения стало ослабление мощности волн ВСР. Самый высокий индекс напряжения зафиксирован в сериях с блокадой M-холинорецепторов, наименьший – в серии с введением анаприлина. При анализе результатов проб с атропином и анаприлином мы говорили о возможных механизмах повышения адренергических влияний и их вкладе в снижение мощности волн ВСР в области низких частот, что можно связать с ростом индекса напряжения. Но повышение индекса напряжения при блокаде вегетативных узлов, вероятнее всего, стало следствием общего ослабления регуляторных влияний на ритм сердца. В этой связи важно помнить, что индекс напряжения – это расчетный показатель, он является производным вариабельности кардиоинтервлаов, то есть мощности волн спектра ВСР.

Снижение индекса централизации во всех экспериментальных сериях вполне закономерно, поскольку в наибольшей мере во всех случаях слабела мощность LF и VLF-волн, так как все примененные блокаторы ограничивали потоки информации к водителю ритма сердца со стороны ЦНС и различных рефлексогенных зон. Весьма низкие величины индекса централизации подтверждают высокую значимость экстракардиальных холинергических и адренергических регуляторных влияний и их взаимодействий в формировании вариабельности кардиоинтервалов.

Проведенные исследования показали, что N-холинергическая передача сигналов через вегетативные узлы обеспечивает поддержание в покое оптимальной

ЧСС, вносит значительный вклад в формирование мощности VLF- и LF-волн и в меньшей мере влияет на мощность HF-волн спектра ВСР.

Резко выраженные изменения ЧСС и ВСР после введения атропина свидетельствуют о ведущей роли холинергических влияний посредством М-холинорецепторов в поддержании достаточно низкой ЧСС и формировании мощности волн всех частотных диапазонов спектра ВСР.

Существенное урежение ЧСС и снижение мощности волн ВСР, особенно VLF, при введении анаприлина подтверждает роль адренергических влияний через β-адренорецепторы не только в повышении ЧСС, но и в формировании волн низкочастотной области спектра ВСР.

Блокада N-холинергической передачи в вегетативных узлах несколько ослабляет эффекты блокатора М-холинорецепторов, но весьма существенно отражается на эффектах блокатора β-адренорецепторов в отношении волн ВСР и ЧСС. Результаты свидетельствуют, что очень резкое снижение мощности волн ВСР после введения атропина, снижение VLF-волн и других волн после введения анаприлина могут определяться усилением преимущественно адренергических влияний со стороны вегетативных узлов.

Низкие величины индекса централизации во всех экспериментальных сериях подтверждают ведущую роль экстракардиальных холинергических и адренергических регуляторных влияний в формировании вариабельности кардиоинтервалов.

Таким образом, ведущую роль в формировании ВСР во всех основных частотных диапазонах спектра (HF, LF, VLF) играют холинергические регуляторные влияния через М-холинорецепторы кардиомиоцитов. Их взаимодействие с сигналами, поступающими через вегетативные узлы и β-адренорецепторы, наиболее значимо для мощности LF и VLF-волн. Активность вегетативных узлов влияет на выраженность и характер изменений ритма сердца при воздействии на холино- и адренорецепторы миокарда, что свидетельствует о взаимодействии ганглионарного и эффекторного уровней вегетативной регуляции в формировании ЧСС и вариабельности кардиоинтервалов. Полученные данные позволяют более четко понимать природу основных волн вариабельности ритма сердца, связи между вегетативными индексами и мощностью волн и механизмы, приводящие к их изменениям при введении агонистов и антагонистов холино- и адренорецепторов в экспериментальной и клинической практике.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 14-04-00912).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Баевский Р.М., Иванов Г.Г., Чирейкин Л.В. Гаврилушкин А.П., Довгалевский П.Я., Кукушкин Ю.А., Миронова Т.Ф., Прилуцкий Д.А., Семенов А.В., Федоров В.Ф., Флейшман А.Н., Медведев М.М.* Анализ вариабельности сердечного ритма при использовании различных электрокардиографических систем (методические рекомендации). Вестник аритмологии. 24: 65–87. 2002. [*Baevsky R.M., Ivanov G.G., Chireikin L.V. Gavrilushkin A.P., Dovgalevsky P.Ya., Kukushkin Yu.A., Mironova T.F., Prilutsky D.A., Semenov A.V., Fedorov V.F., Fleishman A.N., Medvedev M.M.* Analysis of heart rate variability using different electrocardiographic systems (guidelines). J. Arrhythmol 24: 65–87. 2002. (In Russ.)].
2. *Мамалыга М.Л., Мамалыга Л.М.* Динамика суточной вариабельности сердечного ритма и артериального давления при хронической сердечной недостаточности. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 102(6): 680–687. 2016. [*Mamalyga M.L., Mamalyga L.M.* Dynamics daily variability of heart rate and blood pressure in chronic heart failure. Russ. J. Physiol. 102(6): 680–687. 2016. (In Russ.)].
3. *Elghozi J.L., Julien C.* Sympathetic control of short-term heart rate variability and its pharmacological modulation. Fundam. Clin. Pharmacol. 21(4): 337–347. 2007.

4. *Fontolliet T., Pichot V., Bringard A., Fagoni N. Adami A., Tam E., Furlan R., Barthélémy J.C., Ferretti G.* Testing the vagal withdrawal hypothesis during light exercise under autonomic blockade: a heart rate variability study. J. Appl. Physiol. 6: 1804–1811. 2018.
5. *Garabedian C., Champion C., Servan-Schreiber E., Butruille L. E. Aubry, Sharma D., Logier R., Deruelle P., Storme L., Houfflin-Debarge V., De Jonckheere J.* A new analysis of heart rate variability in the assessment of fetal parasympathetic activity: An experimental study in a fetal sheep model. PLoS One. 12(7): e0180653. 2017.
6. *Sergeeva O.V., Akimova I.A., Antonov I.S., Luzina L.S., Alipov N.N., Kuznetsova T.E.* Effect of adrenoblockers on slow (LF) waves in rabbit heart rate. Bull. Experim. Biol. Med. 157(3): 295–298. 2014.
7. *Taylor J.A., Myers C.W., Halliwill J.R., Seidel H., Eckberg D.L.* Sympathetic restraint of respiratory sinus arrhythmia: implications for vagal-cardiac tone assessment in humans. Am. J. Physiol Heart. Circ. Physiol. 280(6): H2804–H2814. 2001.
8. *Henze M., Tiniakov R., Samarel A., Holmes E., Scrogin K.* Chronic fluoxetine reduces autonomic control of cardiac rhythms in rats with congestive heart failure. Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 304(3): H444–H454. 2013.
9. *Курьянова Е.В., Жукова Ю.Д., Трясучев А.В., Горст Н.А.* Влияние скополамина, галантамина и их сочетаний с гексаметонием и атропином на спектральные характеристики сердечного ритма нелинейных крыс. Сибирск. научн. мед. журн. 26(3): 5–12. 2016. [*Kuryanova E.V., Zhukova Yu.D., Tryasuchev A.V., Gorst N.A.* The effect of scopolamine, galantamine and their combinations with hexametonium and atropine on the spectral characteristics of the heart rhythm of nonlinear rats. The Siberian Sci. Med. J. 26(3): 5–12. 2016. (In Russ.)].
10. *Kirillina T.N., Usacheva M.A., Belkina L.M.* Peculiarities of autonomic regulation assessed by variability of hemodynamic parameters in rats with different stress resistance. Bull. Experim. Biol. Med. 142(4): 398–402. 2006.
11. *Kuryanova E.V., Tryasuchev A.V., Stupin V.O., Teplyi D.L.* Effect of atropine on adrenergic responsiveness of erythrocyte and heart rhythm variability in outbred rats with stimulation of the central neurotransmitter systems. Bull. Experim. Biol. Med. 165(5): 597–601. 2018.
12. *Sergeeva O.V., Alipov N.N., Smirnov V.M.* Effect of atropine, propranolol, and atenolol on wave structure of heart rate oscillations in rats. Bull. Experim Biol. Med. 145(4): 387–390. 2008.
13. *Goldstein D.S., Bentho O., Park M.Y., Sharabi Y.* LF power of heart rate variability is not a measure of cardiac sympathetic tone but may be a measure of modulation of cardiac autonomic outflows by baroreflexes. Exp. Physiol. 96: 1255–1261. 2011.
14. *Rahman F., Pechnik S., Gross D., Sewell L., Goldstein D.S.* LF power reflects baroreflex function, not cardiac sympathetic innervation. Clin. Auton. Res. 21: 133–141. 2011.
15. *Mestivier D., Dabiré H., Chau N.P.* Effects of autonomic blockers on linear and nonlinear indexes of blood pressure and heart rate in SHR. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 281(3): H1113–H1121. 2001.
16. *Zhang R., Iwasaki K., Zuckerman J.H., Behbehani K.* Mechanism of blood pressure and R-R variability: insights from ganglion blockade in humans. J. Physiol. 543(1): 337–348. 2002.
17. *Леви М.Н., Мартин П.Ю.* Нейрогуморальная регуляция работы сердца (Физиология и патофизиология сердца). М. Медицина. 1990. [*Levi M.N., Martin P.Yu.* Nejrogumoralnaya regulyaciya raboty serdca (Fiziologiya i patofiziologiya serdca) [Neurohumoral regulation of the heart (Physiology and pathophysiology of the heart)]. Moscow. Medicine. 1990].
18. *Ноздрачев А.Д., Фатеев М.М.* Звездчатый ганглий. Структура и функции. СПб. Наука. 2002. [*Nozdrachev A.D., Fateev M.M.* Zvezdchatyj ganglij. Struktura i funkzii [The stellate ganglion. Structure and functions]. St.Peterburg. Nauka. 2002].
19. *Gordan R., Gwathmey J.K., Xie L.H.* Autonomic and endocrine control of cardiovascular function. World J. Cardiol. 7(4): 204–214. 2015.
20. *Katzung B.G., Masters S.B., Trevor A.J.* Basic and Clinical Pharmacology. McGraw-Hill Companies, Inc. 2012.
21. *Шейх-Заде Ю.Р., Мухамбеталиев Г.Х., Чередник И.Л.* Резонансная гипотеза происхождения вариабельности сердечного ритма. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 95(9): 944–954. 2009. [*Sheikh-Zade Yu.Rh., Mukhambetaliev G.H., Cherednik I.L.* Resonance hypothesis of heart rate variability origin. Russ. J. Physiol. 95(9): 944–954. 2009. (In Russ.)].
22. *Лычкова А.Э.* Серотонинергическая регуляция сердечно-сосудистой и бронхолегочной систем. М. РАМН. 2012. [*Lychkova A.E.* Serotoninergicheskaya regulyaciya serdechno-sosudistoj i bronholegochnoj sistem [Serotonergic regulation of the cardiovascular and bronchopulmonary systems]. Moscow. RAMN. 2012].

Influence of Blockade of the Vegetative Ganglions, of Myocardial M-Cholinoreceptors and Beta-Adrenoreceptors on the Heart Rate Variability in Rats

E. V. Kuryanova[a], *, A. V. Tryasuchev[a], V. O. Stupin[a], Yu. D. Zhukova[a], and N. A. Gorst[a]

[a] *Astrakhan State University, Astrakhan, Russia*
**e-mail: fyzevk@rambler.ru*

The analysis of heart rate variability in rats revealed that the blockade of vegetative ganglions (hexametonium, 7 mg/kg) increases heart rate frequency (HRF) by 12–16%, reduces the power of very low-frequency waves by 85% ($p < 0.001$), low-frequency waves – by 60% ($p < 0.05$), high-frequency waves – by 40%. The blockade of M-cholinoreceptors (atropine, 1 mg/kg) increases the HRF by 30% ($p < 0.001$) and reduces the power of all waves of the heart rate variability by 96–98% ($p < 0.001$). The blockade of β-adrenoreceptors (anapriline, 2 mg/kg) reduces HRF by 25% ($p < 0.001$) and the power of very low-frequency waves by 70% ($p < 0.05$). Against the background of the blockade of vegetative ganglions, the introduction of atropine reduces the power of the heart rate waves to a lesser extent, and the introduction of anapriline changes the HRF little, but potentiates the growth of the power of high-frequency waves. Thus, regulatory influences through cardiomyocytes M-cholinoreceptors are responsible for the formation of the power of all waves of the heart rate variability. The interaction of cholinergic mechanisms with signals coming through vegetative ganglions and β-adrenoreceptors determines the power of low-frequency waves. The activity of the vegetative ganglions affects the nature and severity of changes in heart rhythm when exposed to myocardial cholino- and adrenoreceptors.

Keywords: heart rate variability, spectral analysis, blockade of vegetative ganglions, blockade of M-cholinoreceptors, blockade of β-adrenoreceptors, hexametonium, atropine, anapriline

ЦИТИРОВАТЬ:

Курьянова Е.В., Трясучев А.В., Ступин В.О., Жукова Ю.Д., Горст Н.А. Влияние блокады вегетативных ганглиев, м-холино- и β-адренорецепторов миокарда на вариабельность сердечного ритма крыс. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(1): 17–30.

DOI: 10.31857/S0869813920010070

TO CITE THIS ARTICLE:

Kuryanova E.V., Tryasuchev A.V., Stupin V.O., Zhukova Yu.D., Gorst N.A. Influence of Blockade of the Vegetative Ganglions, of Myocardial M-Cholinoreceptors and Beta-Adrenoreceptors on the Heart Rate Variability in Rats. Russian Journal of Physiology. 106(1): 17–30.

DOI: 10.31857/S0869813920010070

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 1, с. 31–43

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

НАРУШЕНИЯ ДЫХАНИЯ ВО СНЕ У ЛЮДЕЙ РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП

© 2020 г. А. Ю. Соломаха[1], Н. А. Лисовская[1], М. В. Бочкарев[1], Л. С. Коростовцева[1], Н. А. Петрова[1], Г. И. Образцова[1], Ю. В. Свиряев[1, 2, *]

[1]Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

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

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

Поступила в редакцию 04.07.2019 г.
После доработки 14.10.2019 г.
Принята к публикации 14.10.2019 г.

Синдром обструктивного апноэ (СОАС) является наиболее часто встречающимся нарушением дыхания во сне у взрослых и детей. Неизвестно, являются ли СОАС у детей и взрослых разными синдромами или это одно заболевание, начало которого было положено в грудном возрасте. В статье рассмотрены факторы риска и особенности апноэ обструктивного генеза в разных возрастных категориях: детей грудного возраста, родившихся недоношенными и страдающих бронхолегочной дисплазией, подростков с избыточной массой тела и взрослых 25–64 лет. В ходе исследования было определено, что во всех группах при нарушении дыхания во сне показатели сатурации ниже, чем в контрольных группах без этих нарушений. При наличии легочной гипертензии у недоношенных детей с бронхолегочной дисплазией наблюдается больше эпизодов десатурации, чем при отсутствии легочной гипертензии. Среди подростков с избыточной массой тела и ожирением наличие СОАС приводит к более высоким значениям артериального давления и липидного и углеводного обмена. У взрослых СОАС ассоциируется с более высокими значениями показателей липидного обмена и креатинина.

Ключевые слова: апноэ во сне, недоношенные дети, подростки, взрослые, бронхолегочная дисплазия

DOI: 10.31857/S0869813920010100

Нарушения дыхания во сне широко распространены в популяции. Наиболее часто встречающимся из них является синдром обструктивного апноэ во сне (СОАС), характеризующийся периодическим спадением верхних дыхательных путей на уровне глотки и прекращением легочной вентиляции при сохраняющихся дыхательных усилиях, снижением уровня кислорода крови, фрагментацией сна и избыточной дневной сонливостью. В медицинской литературе впервые он был описан 50 лет назад у взрослых [1] и впоследствии был выявлен также в детской популяции [2, 3]. До сих пор ведутся споры, являются ли СОАС у детей и взрослых разными синдромами или это одно заболевание, начало которого было положено еще в грудном возрасте. Некоторые исследователи высказывали предположения, что патофизиология, критерии диагностики и терапия СОАС в детской популяции отличаются от таковых у взрослых [4–7]. Другие исследователи обнаружили общие

факторы риска, клинических проявлений и последствий СОАС у пациентов разных возрастных категорий [8–11]. И хотя существуют многочисленные параллели между нарушениями дыхания во сне у взрослых и детей, данный диагноз сложнее в постановке у детей и может иметь более серьезные последствия в отношении физического и психического развития [12].

Особую группу составляют дети, родившиеся недоношенными, из-за структурно-функциональной незрелости органов и систем. Рождение на ранних сроках гестации приводит к развитию ряда патологических состояний, требующих терапевтической коррекции. Часто у недоношенных детей регистрируется хроническое заболевание легких (в частности, бронхолегочная дисплазия (БЛД)), вносящая свой вклад в формирование апноэ обструктивного генеза. У 4% детей с легкой формой и 33% детей со средней и тяжелой формой БЛД заболевание осложняется развитием легочной гипертензией, что сопровождается более длительной персистенцией апноэ (центрального генеза) и снижением сатурации кислорода крови [13]. Это способствует повышению отдаленной летальности [14], оказывает отрицательное влияние на неврологический статус [15] и способствует увеличению частоты заболеваний нижних респираторных путей [16]. В настоящее время клинические характеристики СОАС у детей младше 2 лет, в особенности у недоношенных детей, страдающих БЛД, четко не определены.

По мере роста ребенка на смену бронхолегочной патологии как причины СОАС на первый план выходят ожирение, наличие патологии ЛОР-органов (аденотонзиллярная гипертрофия, искривление носовой перегородки) или челюстно-лицевых аномалий. В настоящее время отмечается увеличение количества подростков с СОАС. Игнорирование этих факторов и неоказание соответствующей медицинской помощи в молодом возрасте приводит к сохранению и прогрессированию заболевания в старшем возрасте. Так, распространенность храпа в возрасте 2–6 лет составляет 10–14% [17], а апноэ во сне – до 3% [18], к 13 годам наблюдается увеличение частоты нарушений дыхания во сне до 35% [19]. Среди взрослых россиян храп отмечают 58% мужчин и 52% женщин [20].

СОАС диагностируется у 24–49% мужчин и 9–23% женщин среднего возраста в зависимости от популяции и критериев диагностики. У лиц старше 65 лет этот показатель может достигать 60% [21, 22]. Исследования с инструментальным подтверждением показали распространенность апноэ во сне 24–83.8% у мужчин и 9–60.8% у женщин в зависимости от популяции и критериев диагностики [21, 22].

Известно, что СОАС сочетается с развитием сердечно-сосудистой патологии. Лица, страдающие данным заболеванием, имеют значительно более высокую частоту фатальных и нефатальных сердечно-сосудистых событий по сравнению с лицами без нарушений дыхания во время сна. СОАС во взрослой популяции является независимым фактором риска артериальной гипертензии и предиктором ишемической болезни сердца [23].

В этой статье будут рассмотрены факторы риска и особенности обструктивного апноэ во сне в разных возрастных категориях.

Цель исследования – определить факторы риска и особенности апноэ обструктивного генеза во сне у людей разных возрастных групп.

МЕТОДИКА

В период с 2009 по 2017 гг. на базе сомнологической лаборатории и Перинатального центра ФГБУ “НМИЦ им. В.А. Алмазова” Минздрава России была проведена инструментальная оценка нарушений дыхания во сне у лиц трех возрастных категорий: 59 детей грудного возраста, родившихся недоношенными, 80 подростков с избыточной массой тела (12–18 лет) и 104 взрослых 25–64 лет из выборки эпидемиологиче-

ского исследования ЭССЕ-РФ в Санкт-Петербурге. Пациенты или их законные представители дали информированное согласие на проведение исследования. Исследования были одобрены этическим комитетом ФГБУ "НМИЦ им. В.А. Алмазова" Минздрава России.

В первую группу исследования были включены дети, родившиеся преждевременно на 23 0/7–32 0/7 неделях гестации и с массой тела при рождении менее 1700 г. У сорока трех недоношенных детей была диагностирована БЛД в соответствии с определением A. Jobe и E. Bancalari [25] и Федеральных клинических рекомендаций [26]. У 19 детей БЛД была осложнена легочной гипертензией по данным эхокардиографии (систолическое давление в легочной артерии составило ≥35 мм рт. ст. и среднее давление в легочной артерии ≥25 мм рт. ст. с признаками гемодинамической перегрузки правого желудочка [26]) и клинической картины заболевания. У 16 детей БЛД не диагностирована. В исследование не включались дети с наличием пороков развития верхних и нижних дыхательных путей, гемодинамически значимых врожденных пороков сердца (за исключением данных об открытом артериальном протоке в анамнезе), диафрагмальной грыжи, фенотипических признаков хромосомных аномалий.

Полиграфическое исследование недоношенных детей проводилось перед выпиской из стационара в 35–44 недель постменструального возраста с помощью аппарата Embletta (Natus, США), включающего регистрацию назального потока воздуха, пульсоксиметрию, одно отведение электрокардиографии, движения грудной клетки и брюшной стенки. Дети находились без кислородной поддержки более 5 дней и рутинного мониторирования средней сатурации проводился с помощью программы "RemLogic" в автоматическом режиме с последующей проверкой специалистом. Эхокардиография была выполнена на аппарате Philips (Нидерланды). Во время эхокардиографии рассчитывалось среднее давление легочной артерии (СрДЛА) на основании скорости трикуспидальной регургитации (V) и давления в правом предсердии (ДПП) по уравнению Бернулли (СрДЛА = $4V^2$ + ДПП). Апноэ определялись, согласно критериям Американской академии медицины сна, разработанным для подсчета случаев нарушения дыхания во сне для детей вне зависимости от возраста (редакция 2012 г.) [27], как задержки дыхания продолжительностью два и более пропущенных вдоха, сопровождающихся снижением SpO_2 на 3% и более или пробуждением, за исключением эпизодов, регистрируемых после вздоха. Центральное апноэ – одновременное прекращение дыхательных движений и потока воздуха в дыхательных путях; обструктивное апноэ - отсутствие потока воздуха в дыхательных путях при сохраненных дыхательных движениях; смешанное апноэ – нарушение потока воздуха в дыхательных путях в сочетании с периодами наличия и отсутствия дыхательных движений.

Во вторую группу исследования вошли подростки с повышенным индексом массы тела, соответствующим значениям пятого (85–97% – избыточная масса тела) и шестого (более 97% – ожирение) центильных коридоров для соответствующего пола и возраста [28], а также пациенты с экзогенно-конституциональным характером избыточной массы или ожирения, наблюдающиеся у эндокринолога, которые согласились на инструментальную диагностику СОАС. Критериями исключения являлись тяжелые соматические заболевания в стадии обострения, заболевания нервной системы, ассоциированные с когнитивными нарушениями, наличие ЛОР-патологии, способствующей развитию вторичных форм СОАС по заключению отоларинголога, семейные формы гиперхолестеринемий, сахарный диабет 1-го и 2-го типов, вторичные формы ожирения.

Оценка нарушений дыхания во сне среди подростков проводилось с помощью системы "Кардиотехника-04" (Инкарт, Россия) и включало регистрацию назального потока воздуха, пульсоксиметрию, 12 отведений электрокардиографии, дви-

жений грудной клетки методом реопневмографии. Анализ результатов проводился с помощью программы "KTResult3" в автоматическом режиме с последующим просмотром всех записей врачом-специалистом. Также этой группе пациентов было выполнено суточное мониторирование АД (аппаратом BPlab, ООО "Петр Телегин", Россия) осциллометрическим методом с измерением давления с интервалом 15 мин в дневное время (8:00–22:00 ч.) и 30 мин в ночное время. При анализе оценивались следующие параметры: средние показатели АДс и АДд днем и ночью, максимальные уровни АДс и АДс. Антропометрические измерения подростков включали оценку окружности талии, роста, массы тела с последующим расчетом индекса массы тела (ИМТ) по формуле Кеттле – масса тела (кг)/рост^2 (м). Продолжительность сна оценивалась в течение последнего месяца по данным опроса.

В третью группу вошли 1600 жителей Санкт-Петербурга обоих полов в возрасте от 25 до 64 лет, участники эпидемиологического исследования ЭССЕ-РФ [29], им было проведено анкетирование, измерение офисного АД и забор крови для лабораторных анализов. Из них 104 человека согласились на полисомнографическое исследование в условиях стационара (ПСГ, Embla N7000, Natus, США), при котором регистрировались следующие параметры: электроэнцефалограмма (отведения C3, C4, O1, O2), электроокулограмма, электромиограмма, электрокардиограмма, дыхательный поток, движения грудной клетки и брюшной стенки, пульсоксиметрия, движения нижних конечностей. Для сравнительного анализа были включены следующие составляющие ПСГ: эффективность сна, латентность ко сну, количество пробуждений, время бодрствования после засыпания (wake after sleep onset WASO), среднее значение индекса апноэ/гипопноэ (ИАГ – число эпизодов апноэ/гипопноэ в час сна) с указанием медианы, разброса значений минимума и максимума. Анализ результатов проводился с помощью программы "RemLogic" в автоматическом режиме с последующим просмотром всех записей врачом-специалистом. При расшифровке записей исследования применялись критерии Американской академии медицины сна редакции 2012 г., разработанные для детей и для взрослых [27].

Также проводилось взятие крови у взрослых и подростков из локтевой вены натощак, после 12 ч голодания, у недоношенных детей из пятки. Сыворотку крови получали путем низкоскоростного центрифугирования крови при 900 *g* в течение 20 мин при температуре 4°C. При проведении биохимического исследования крови оценивались следующие показатели (подростки и взрослые): общий холестерин (ОХ), липопротеины низкой плотности (ЛПНП), липопротеины высокой плотности (ЛПВП), триглицериды (ТГ), глюкоза и креатинин на биохимическом анализаторе Abbot Architect c8000 (США) с использованием диагностических наборов фирмы Abbot Diagnostic (США).

Статистическая обработка данных осуществлялась на персональном компьютере с помощью пакета прикладных программ SPSS (версия 16.0). Каждый показатель для всех групп проверялся на нормальность распределения с использованием критерия Колмогорова–Смирнова, в зависимости от результатов которого показатели представлялись либо в виде среднего значения и стандартного отклонения, либо медианы и минимального/максимального значения. Сравнительный анализ для количественных переменных проводился с использованием *t*-критерия Стьюдента, для категориальных переменных использовался точный критерий Фишера и χ^2. При множественных сравнениях использовался дисперсионный анализ. Для категориальных переменных сравнение групп проводилось с использованием частотного анализа (хи-квадрат, χ^2), для сравнения количественных переменных применялись критерии Манна–Уитни для независимых выборок и Вилкоксона для зависимых выборок. Для регрессионного анализа зависимая переменная – нарушения

дыхания во сне, независимая переменная – в зависимости от группы. Для недоношенных – пол, масса тела при рождении, длительность искусственной вентиляции легких, возраст в неделях, наличие легочной гипертензии, БЛД. Для подростков и взрослых – возраст, пол, индекс массы тела, ОТ, САД, ДАД, креатинин, глюкоза, ОХ, ЛПВП, ЛПНП. У взрослых в анализ также включали курение, а у подростков – отношение шансов (ОШ). Вычислялся непараметрический критерий для К-независимых выборок и проводился апостериорный анализ. Логистический регрессионный анализ проводился с включением количественных и категориальных переменных, результаты представлены только для значимых показателей. Результаты приведены в виде ОШ и 95%-ного доверительного интервала. Различия оценивались при уровне статистической значимости $p < 0.05$ при попарных сравнениях.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Недоношенные дети.

В нашем исследовании группа детей, родившихся недоношенными, была разделена на 3 подгруппы: дети без БЛД, дети с БЛД, но без легочной гипертензии (группа БЛД – ЛГ) и дети с БЛД, осложненной легочной гипертензией (группа БЛД + ЛГ). Большую часть группы детей БЛД + ЛГ составили мальчики, и она характеризовалась меньшими гестационным возрастом ($p = 0.001$) и массой тела при рождении ($p = 0.003$), более длительными периодами искусственной вентиляции легких ($p < 0.001$) и кислородной поддержки ($p < 0.001$) по сравнению с группами детей без БЛД и БЛД – ЛГ (данные опубликованы ранее, [30]). Это обусловлено рождением детей в период каналикулярной фазы развития легких (17–26 недель гестации). По мере увеличения сроков гестации тяжесть БЛД уменьшается и реже диагностируется легочная гипертензия.

По результатам мониторирования группа детей БЛД + ЛГ характеризовалась более низким уровнем средней сатурации кислорода и более высоким индексом десатурации по сравнению с группами детей БЛД – ЛГ и без БЛД (табл. 1).

Мы не получили различий в значениях индекса апноэ/гипопноэ, количестве эпизодов центрального и обструктивного апноэ в час между этими группами. В то же время следует отметить тенденцию к выявлению обструктивного апноэ у детей группы БЛД + ЛГ. У 5 из 19 детей этой группы индекс обструктивного апноэ был больше 1 (диагностически значимое количество обструктивного апноэ), причем у троих наблюдались высокие значения данного показателя (2.5; 5.8 и 8.6/ч). В группе детей БЛД – ЛГ обструктивное апноэ >1/ч отмечено у троих из 24 детей. Лишь у одного ребенка без БЛД значения данного показателя был более 1. Различия в количестве детей с индексом обструктивного апноэ >1/ч достигли статистических отличий между сравниваемыми группами ($p < 0.05$). Также отмечается тенденция к снижению уровня креатинина в сыворотке крови у детей группы БЛД + ЛГ. Регрессионный анализ не показал значимых различий по факторам, возможно играющим роль в развитии нарушений дыхания во сне у новорожденных по всем рассмотренным переменным.

2. Подростковая группа.

В подростковой группе из 80 подростков 47 были мужского пола. Средний возраст обследованных составил 15 (12; 18) лет. У 38 (47.5%) было диагностировано ожирение, индекс массы тела составил 27.6 (22.9; 52.8) кг/м^2. Основная характеристика обследованных подростков представлена в опубликованной ранее статье [30].

На основании данных респираторного мониторирования СОАС был диагностирован у 41 подростка (среднее значение индекса апноэ/гипноэ составило 5 и более эпизодов/ч). Среди них отмечались более высокие значения артериального давления по данным суточного мониторирования АД и биохимических показателей (об-

Таблица 1. Респираторные показатели недоношенных перед выпиской из стационара в зависимости от наличия бронхиальной дисплазии (БЛД) и легочной гипертензии (ЛГ)
Table 1. Respiratory parameters in premature infants with bronchial dysplasia (BD) and pulmonary hypertension (PH) before discharge from hospital

Параметры Parameters	Без БЛД No BD (n = 16)	БЛД – ЛГ BD – PH (n = 24)	p*	БЛД + ЛГ BD + PH (n = 19)	p**
SpO_2 средняя, % Average SpO_2, %	97.5 (96.0–99.6)	97.2 (89.7–98.6)	0.05	93.7 (89.0–96.6)	0.02
ДИ, событий/ч Desaturation index, events per hour	20 (0–58.8)	24.6 (0.8–104.5)	0.2	42 (38.0–133.5)	0.04
ИАГ, событий/ч Apnea-hypopnea index, events per hour	5.2 (0–42.3)	8.2 (0–38.6)	0.4	12.5 (0–95.2)	0.1
ЦА, событий/ч Central apnea, events per hour	0.4 (0–4.3)	1.1 (0–18.3)	0.2	3.0 (0–95.2)	0.1
ОА, событий/ч Obstructive apnea, events per hour	0 (0–2)	0 (0–1.9)	0.9	0 (0–8.6)	0.6
Число детей с ОА >1/ч Number of children with obstructive apnea events >1/hour	1	3	<0.01	5	0.05
Глюкоза, ммоль/л Glucose, mmol/l	4.4 (3.3–5)	4.4 (3.2–6.3)	0.6	4.9 (3.5–8.5)	0.1
Креатинин, мкмоль/л Creatinine, μmol/l	37 (19–63)	35 (14–76)	0.6	25 (14–55)	0.02

Примечание. В таблице приведена медиана и минимальные и максимальные значения. Значимость различий * – $p < 0.05$ при попарных сравнениях групп БЛД – ЛГ и без БЛД ** – $p < 0.05$ при сравнении группы БЛД + ЛГ с группами БЛД – ЛГ и без БЛ.
The table shows median, minimum and maximum values. Significance of differences * – $p < 0.05$ for pairwise comparisons of groups with BD – LH and without BD; ** – $p < 0.05$ pair-test of BD + LH group with BD – LH group, and without BL.

щего холестерина сыворотки крови и его фракций), основных показателей суточного мониторирования АД, более низкие значения средней сатурации кислорода, что свидетельствует в пользу возможного самостоятельного вклада СОАС в развитие факторов риска сердечно-сосудистой патологии (табл. 2). Результаты регрессионного анализа у подростков показали повышение отношения шансов встречаемости нарушений дыхания во сне для ОХ в 12 раз (95% доверительный интервал, 1.97; 25.0; $p = 0.003$). Несмотря на незначимо более высокий уровень гликемии при нарушениях сна во сне, регрессионный анализ показал снижение отношения шансов для глюкозы натощак до 0.12 (95%-ный доверительный интервал, 0.02–0.87; $p = 0.036$).

3. Взрослое население.

Средний возраст группы взрослых составил 51 (25; 64) лет, индекс массы тела 26.9 (15.5; 37.6) кг/м^2. СОАС был выявлен у 27% взрослых обследованных (табл. 3). Ожирение было у 22.3% лиц без СОАС и у 35.7% с СОАС ($\chi^2 = 1.2$; $p = 0.3$). Лица с СОАС характеризовались более высокими значениями некоторых биохимических показателей – ОХС, ЛПНП и креатинина. По данным полисомнографического исследования обследуемые с СОАС имели более низкую среднюю сатурацию ($p = 0.004$)

Таблица 2. Сравнительная характеристика показателей у подростков в зависимости от наличия обструктивного апноэ во сне
Table 2. Characteristics of adolescents with obstructive sleep apnea

Показатели Parameters	ИАГ ≤ 5 эпизодов в час сна Apnea-hypopnea index ≤ 5 events per hour *n* = 43 (54%)	ИАГ > 5 эпизодов в час сна Apnea-hypopnea index > 5 events per hour *n* = 37 (46%)	*p*
Возраст, лет Age, years	15 (12; 18)	16 (12; 18)	0.6
Пол, мальчики/девочки Gender, boys/girls	25/18	22/15	$\chi^2 = 0.01, 0.9$
ИМТ, кг/м^2 BMI, kg/m^2	27.5 (23; 37)	28 (23; 48)	0.8
ОТ Waist circumference			
мальчики boys	87 (65; 125)	83 (66; 115)	0.9
девочки girls	75 (63; 110)	75 (71; 115)	0.5
АДс, мм рт. ст. Systolic blood pressure, mm Hg	125 (105; 135)	130 (115; 130)	0.004
АДд, мм рт.ст. Diastolic blood pressure, mm Hg	75 (60; 90)	80 (60; 95)	0.008
Среднее дневное АДс, мм рт. ст. Mean daily systolic blood pressure, mm	125 (111; 148)	134 (119; 150)	0.002
Среднее дневное АДд, мм рт. ст. Mean daily diastolic blood pressure, mm Hg	78 (66; 91)	84 (64; 96)	0.005
Среднее ночное АДс, мм рт. ст. Mean night systolic blood pressure, mm Hg	110 (94; 139)	122 (103; 140)	<0.001
Среднее ночное АДд, мм рт. ст. Mean night diastolic blood pressure, mm Hg	67 (55; 88)	72 (45; 89)	0.008
Избыточная масса тела ожирение, *n* Overweight/obesity, *n*	20/23	22/15	$\chi^2 = 1.3, 0.3$
Продолжительность сна, ч Sleep duration, hours	8.1 (3.9; 15)	8.3 (2;15)	0.7
Средняя SaO_2 за ночь, % Mean night SaO_2, %	96.5 (95; 98)	96 (92; 98)	0.02
ОХС, ммоль/л Cholesterol, mmol/L	4.2 (3.1; 5.2)	5.2 (4.2; 6.6)	<0.001
ЛПНП, ммоль/л LDL, mmol/L	2.8 (1.4; 5.9)	3.8 (2.8; 5.3)	<0.001

Таблица 2. Окончание

Показатели Parameters	ИАГ ≤ 5 эпизодов в час сна Apnea-hypopnea index ≤ 5 events per hour *n* = 43 (54%)	ИАГ > 5 эпизодов в час сна Apnea-hypopnea index > 5 events per hour *n* = 37 (46%)	*p*
ЛПВП, ммоль/л HDL, mmol/L	1.2 (0.4; 1.6)	1.1 (0.5; 1.4)	0.003
ТГ, ммоль/л Triglycerides, mmol/L	1 (0.4; 2.2)	1.4 (0.8; 2.2)	<0.001
Глюкоза, ммоль/л Glucose mmol/L	5 (3.4; 6.6)	5.3 (3.8; 6.1)	0.2
Креатинин, мкмоль/л Creatinine, μmol/L	67 (53; 95)	72.5 (50; 98)	0.2

Примечание. В таблице приведена медиана и минимальные и максимальные значения
The table shows median, minimum and maximum values.

и не различались по остальным основным показателям. Регрессионный анализ показал значимое снижение отношения шансов только для креатинина – 0.83 (95%-ный доверительный интервал 0.69–0.98; $p = 0.032$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе мы оценили нарушения дыхания во сне в разных возрастных категориях и их связь в онтогенезе.

Дети до двухлетнего возраста, особенно родившиеся недоношенными, представляют собой уникальную группу с предрасположенностью к обструкции верхних дыхательных путей. Были предложены возможные объяснения более высокой частоты встречаемости обструктивных апноэ у таких детей [31]. Так, вытянутая форма головы (долихоцефалия) может привести к изменениям формы и роста верхних дыхательных путей, что способствует их сужению и может усугублять обструкцию во время сна. Также недоношенность связана с асимметрией лица, которая может повлиять на размеры головы. У детей дыхательные пути увеличиваются в размерах пропорционально мягким тканям, но неизвестно, как недоношенность влияет на рост и форму дыхательных путей или как длительное присутствие эндотрахеальной трубки в дыхательных путях может изменить их рост и форму неба. Показано, что дети, родившиеся недоношенными, чаще подвержены развитию мышечной гипотонии, которая также служит фактором, предрасполагающим к СОАС. Не исключено наличие хронических воспалительных процессов, ведущих к обструкции верхних дыхательных путей, у требовавших длительной интубации детей.

Согласно данным литературы развивающиеся во время апноэ гипоксемия, гиперкапния и ацидоз способствуют возникновению легочной гипертензии, нарушений сердечного ритма и правожелудочковой недостаточности [32]. Наиболее распространенной формой нарушения ритма сердца является синусовая брадикардия, которая для детей раннего возраста диагностируется на фоне не только обструктивных и смешанных апноэ, но и центральных апноэ [33].

В ходе исследования прослеживается четкая взаимосвязь сроков гестации при рождении, развитие БЛД, легочной гипертензии и увеличение числа детей с апноэ обструктивного генеза. Обращают на себя внимание более низкие показатели средней сатурации кислорода и большее число эпизодов десатурации у детей дан-

Таблица 3. Сравнительная характеристика группы взрослых в зависимости от наличия обструктивного апноэ во сне
Table 3. Characteristics of adults with obstructive sleep apnea

Показатели Parameters	ИАГ ≤ 5 эпизодов в ч сна Apnea-hypopnea index ≤ 5 events/hour *n* = 76 (73%)	ИАГ > 5 эпизодов в ч сна Apnea-hypopnea index > 5 events/hour *n* = 28 (27%)	*p*
Возраст, лет Age, years	51 (25; 64)	54.5 (43; 63)	0.4
Пол, мужчины/женщины Gender, men/women	24/52	14/14	$\chi^2 = 1.7, 0.2$
ИМТ, кг/м^2 BMI, kg/m^2	25 (20; 37.5)	28.6 (19.3; 38)	0.08
ОТ Waist circumference			
мужчины men	102 (92; 120)	102 (91; 129)	0.8
женщины women	103 (82; 127)	104 (78; 118)	0.6
АДс, мм рт. ст. Systolic blood pressure, mm Hg	137 (103; 205)	125.5 (103; 168)	0.3
АДд, мм рт. ст. Diastolic blood pressure, mm Hg	82.5 (51; 112)	82 (63; 106)	0.9
Ожирение, *n* Obesity, *n*	17	10	$\chi^2 = 1.2, 0.3$
Латентность ко сну, мин Sleep latency, min	13.5 (1.5; 201)	7.1 (2.4; 167)	0.6
Время бодрствования после наступления сна, мин Wake after sleep onset, min	52.3 (6; 255)	85.5 (2; 278)	0.9
Пробуждения, *n* Awakenings, *n*	22 (4; 47)	28 (6; 48)	0.5
Средняя SaO_2 во время сна, % Mean sleep SpO_2, %	96.3 (90; 98)	94 (92; 97)	0.004
ОХС, ммоль/л Cholesterol, mmol/L	5.1 (3.5; 7.8)	6.1 (3.9; 7.7)	0.03
ЛПНП, ммоль/л Low-density lipoproteins, mmol/L	3 (1.8; 5.1)	4.2 (2.1; 5.4)	0.03
ЛПВП, ммоль/л High-density lipoproteins, mmol/L	1.4 (1; 2)	1.3 (1; 2)	0.2
ТГ, ммоль/л Triglycerides, mmol/L	1 (0.4; 2.8)	1.3 (0.6; 5.3)	0.2
Глюкоза, ммоль/л Glucose mmol/L	5.3 (3.9; 11.3)	5.2 (4.3; 12.7)	0.7
Креатинин, мкмоль/л Creatinine, μmol/L	64 (48; 97)	68 (56; 84)	0.03

Примечание. Обозначения те же, что в табл. 2.
Signatures are the same as in the table 2.

ной подгруппы. По индексу апноэ/гипноэ подгруппы недоношенных детей не отличались друг от друга. Это позволяет предположить, что оценку степени риска эпизодов апноэ для данной группы требуется проводить на основании значений средней сатурации.

В подростковом возрасте на первый план в постановке диагноза СОАС выходит индекс апноэ/гипноэ, отражающий частоту патологических событий в час и играющий ключевую роль в решении вопроса о необходимости проведения патогенетической терапии. Индекс апноэ/гипноэ сохраняет свою актуальность и у взрослых, что отчетливо показало проведенное нами исследование. Гендерная принадлежность также не теряет свою актуальность в разных возрастных категориях. Как в случае с недоношенными детьми, так и у подростков, и у взрослых обструктивные апноэ чаще диагностировались у лиц мужского пола.

Высокие значения индекса массы тела у подростков вносят существенный вклад в раннее начало и развитие сердечно-сосудистой патологии, что впоследствии приобретает характер серьезных заболеваний. Ожирение тесно связано с риском развития СОАС. Эпидемиологические исследования показали, что прибавка веса на каждый 1% ассоциирована с повышением индекса апноэ/гипноэ на 3%. В нашем исследовании у подростков с СОАС отмечено значимое повышение показателей САД. Однако во взрослой популяции нами не были получены различия по данным показателям. Также более низкие показатели средней сатурации кислорода были отмечены как у подростков, так и у взрослых с СОАС. Изменения в биохимических показателях у подростков сходны с таковыми у взрослых, что позволяет сказать о сохранении и прогрессировании дисфункции с возрастом. Изменения липидного обмена отчетливо прослеживаются в подростковом периоде. У подростков с СОАС и избыточной массой тела и ожирением чаще, чем в группе сравнения, встречаются такие факторы риска сердечно-сосудистой патологии как нарушения липидного обмена и артериальная гипертензия. Однако регрессионный анализ показал повышение шанса встречаемости нарушений дыхания во сне в 12 раз только для общего холестерина. Выявленное снижение риска для нарушений дыхания во сне при гипергликемии требует дальнейшего изучения. В исследовании B. Bhushan & B. Ayub [34] среди подростков с ожирением выявлены повышение уровня триглицеридов, глюкозы, инсулина и индекса инсулинорезистентности, а регрессионный анализ показал противоположные нашим результаты, что гипергликемия и индекс инсулинорезистентности были предиктором тяжести нарушений дыхания во сне. Во взрослой популяции отклонения от нормы было отмечено лишь по нескольким показателям: ОХС, ЛПНП и креатинин, а при регрессионном анализе значение имело снижение содержания креатинина. Известно, что персистирующая гипоксемия индуцирует избыточную продукцию кислородных радикалов, провоспалительных цитокинов, циркулирующих воспалительных клеток, С-реактивного белка и адгезивных молекул, которые способствуют гиперлипидемии и вызывают генерализованное повреждение эндотелия и развитие атеросклероза [35]. Необходимо помнить, что НДС у подростков влияют не только на состояние сердечно-сосудистой системы, но и на когнитивные функции, что может влиять на эффективность обучения в школе [36].

Продолжительность сна не являлась основным оцениваемым показателем и не различалась при внутригрупповых сравнениях по индексу массы тела и индексу апноэ/гипноэ в группе взрослых. Обращает на себя внимание, что полисомнографическое исследование позволило оценить длительность бодрствования после засыпания, которая составила 2 ч 20 мин. Необходимо это учитывать при проведении исследований во время периода сна, таких как холтеровское мониторирование электрокардиограммы и суточного мониторирования АД и отмечать периоды ночных пробуждений [37]. Сравнение группы взрослых по наличию/отсутствию СОАС

не показало значительных различий характеристик сна, что может быть связано с критерием диагностики СОАС. При легкой степени СОАС (индекс апноэ/гипноэ 5–14.9/ч) не всегда нарушается качество сна и возникают сердечно-сосудистые осложнения. Некоторые исследователи используют в качестве порогового показателя индекса ≥10 или ≥15.

Ограничениями нашего исследования явились малая выборка среди недоношенных детей, оценка нарушений дыхания во сне разными приборами, а также невозможность длительного проспективного наблюдения. В исследование не включались доношенные младенцы, среди подростков и взрослого населения – те, кто не дал информированного согласия на участие в исследовании. Полиграфическое исследование проводилось недоношенным и подросткам, оно не позволяет оценить фазовую структуру сна и точно определить ночные пробуждения. А при полисомнографическом исследовании мы показали, что среди взрослых с ожирением длительность ночных пробуждений была значительно больше, чем у людей с нормальной массой тела. Проведенное нами ранее наблюдение за недоношенными детьми с БЛД через 9–10 мес. после выписки показало положительную динамику кардиореспираторных показателей [30]. Требуется проведение дальнейших исследований, позволяющих ответить на вопросы изменчивости нарушений дыхания во сне в онтогенезе.

ВЫВОДЫ

1. Наличие нарушений дыхания во сне ассоциируется во всех возрастных группах с более низкими значениями сатурации крови кислородом.

2. У недоношенных детей с БЛД и легочной гипертензией регистрируется большее количество эпизодов десатураций, по сравнению с детьми без БЛД.

3. В группе подростков с избыточной массой тела и ожирением показатели тяжести обструктивного апноэ выступают в качестве независимых предикторов повышения артериального давления и нарушений липидного и углеводного обмена.

3. У взрослых наличие СОАС негативно влияет на липидный обмен и уровень креатинина крови.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана государственным заданием АААА-А18-118012290372-0 “Нейрофизиологические механизмы регуляции функций и их эволюция”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Remmers J.E., DeGroot W.J., Sauerland E.K.* Pathogenesis of upper airway occlusion during sleep. J. Appl. Physiol. 44(6): 931–938. 1978.
2. *Brouillette R.T., Fernback S.K., Hunt C.E.* Obstructive sleep apnea in infants and children. J. Pediatr. 100(1): 31–40. 1982.
3. *Guilleminault C., Eldridge F., Simmons F.* Sleep apnea in eight children. Pediatrics. 58(1): 23–31. 1976.
4. *Rosen C.L., D’Andrea L., Haddad G.G.* Adult criteria for obstructive sleep apnea do not identify children with serious obstruction. Am. Rev. Respir. Dis. 146(5 Pt 1): 1231–1234. 1992.
5. *Carroll J.L., Loughlin G.M.* Diagnosis criteria for obstructive sleep apnea syndrome in children. Pediatr. Pulmonol. 14(2): 71–74. 1992.
6. *Marcus C.L., Omlin K.G., Basinki D.J.* Normal polysomnographic values for children and adolescents. Am Rev. Respir. Dis. 146: 1235–1239. 1992.
7. *American Thoracic Society*. Standards and indication for cardiopulmonary sleep studies in children. Am J. Respir. Crit. Care. Med. 153(2): 866–878. 1996.
8. *Guilleminault C., Heldt G., Powell N.* Small upper airway in near-miss sudden infant death syndrome infants and their families. Lancet. 327(8478): 402–407. 1986.
9. *Marcus C.L., Greene M.G., Carroll J.L.* Blood pressure in children with obstructive sleep apnea. Am J. Respir. Crit. Care. Med. 157(4): 1098–1103. 1998.

10. *Kahn A., Groswasser J., Sottiaux M.* Clinical symptoms associated with brief obstructive sleep apnea in normal infants. Sleep. 16(5): 409–413. 1993.
11. *Strohl K.P., Redline S.* Recognition of obstructive sleep apnea. Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 154(2): 279–89. 1996.
12. *Erler T., Paditz E.* Obstructive sleep apnea syndrome in children: a state-of-the-art review. Treat Respir. Med. 3(2): 107–122. 2004.
13. *Al-Ghanem G., Shah P., Thomas S.* Bronchopulmonary dysplasia and pulmonary hypertension: A meta-analysis. J. Perinatol. 37(4): 414–419. 2017.
14. *Hack M., Friedman H., Fanaroff A.* Outcomes of extremely low birth weight infants. Pediatrics. 98(5): 931 –937. 1996.
15. *Majnemer A., Riley P., Shevell M.* Severe bronchopulmonary dysplasia increases risk for later neurological and motor sequelae in preterm survivors. Development Med. Child Neurol. 42(1): 53 –60. 2000.
16. *Cotten M., Oh W., McDonald S.* Prolonged hospital stay for extremely premature infants: risk factors, center differences, and the impact of mortality on selecting a best-performing center. Perinatology. 25(10): 650–655. 2005.
17. *Young T., Peppard P.E., Gottlieb D.J.* Epidemiology of obstructive sleep apnea: A Population Health Perspective. Am J. Resp. Crit. Care. Med. 165(9): 1217–1239. 2002.
18. *Новикова В.П., Эглит А.Э.* Ожирение и синдром обструктивного апноэ сна у детей. Вопр. детской диетологии. 2: 25–29. 2014. [*Novikova V.P., Eglit A.E.* Obesity and obstructive sleep apnoea syndrome in children. Vopr. Detskoi Dietologii. 2: 25–29. 2014. (In Russ)].
19. *Sohn H., Rosenfeld R.M.* Evaluation of sleep-disordered breathing in children. Otolaryngol. Head Neck. Surg. 128 (3): 344–352. 2003.
20. *Бочкарев М.В., Коростовцева Л.С., Фильченко И.А., Ротарь О.П., Свиряев Ю.В., Жернакова Ю.В., Шальнова С.А., Конради А.О., Чазова И.Е., Бойцов С.А., Шляхто Е.В.* Жалобы на нарушения дыхания во сне и факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний в регионах России: данные исследования ЭССЕ-РФ. Рос кардиол журн. 6: 152–158. 2018. [*Bochkarev M.V., Korostovtseva L.S., Filchenko I.A., Rotar O.P., Svirjaev Y.V., Zhernakova Y.V., Shalnova S.A., KonradiA.O., Chazova I.E., Boytsov S.A., Shlyakhto E.V.* Complaints on sleep breathing disorder and cardiovascular risk factors in Russian regions: data from ESSE-RF study. Russ. J. Cardiol. 6: 152–158. 2018. (In Russ)].
21. *Young T., Palta M., Dempsey J.* The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. N. Engl. J. Med. 328(17): 1230–1235. 1993.
22. *Heinzer R., Vat S., Marques-Vidal P., Marti-Soler H., Marti-Soler H., Andries D, Tobback N., Mooser V., Preisig M., Malhotra A., Waeber G., Vollenweider P., Tafti M., Haba-Rubio J.* Prevalence of sleep-disordered breathing in the general population: the HypnoLaus study. The Lancet Resp. Med. 30 (4): 310–318. 2015.
23. *Lattimore J.D., Celermajer D.S., Wilcox I.* Obstructive sleep apnea and cardiovascular disease. J. Am. Coll. Cardiol. 4 (9): 1429-37. 2003.
24. *Jobe A., Bancalary E.* Bronchopulmonary dysplasia. NICHD-NHLBI-ORD Workshop. Am J. Respirat. Crit. Care. Med. 163(7):1723–1729. 2001.
25. *Баранов А.А., Намазова-Баранова Л.С., Н.Н. Володин Н.Н., ДавыдоваИ.В., Овсянников Д.Ю., Иванов Д.О., Бойцова Е.В., Яцык Г.В., Ионов О.В., Рындин А.Ю., Гребенников В.А., Чубарова А.И., Солдатова И.Г.* Ведение детей с бронхолегочной дисплазией. Клинические рекомендации. Педиатр. фармакол. 13(4): 319–333. 2016. [*Baranov A A, Namazova-Baranova L.S., Volodin N.N., Davydova I.V., Ovsyannikov D.U., Ivanov D.O., Boysova E.V., Yatsyk G.V., Ionov O.V., Ryndin A.Yu., Grebennikov V.A., Churbanova A.I., Soldatova I.G.* Managing children with bronchopulmonary dysplasia. Pediatr. Farmakol. 13(4): 319–333. 2016 (In Russ)].
26. *Abman S.H., Hansmann G., Archer S.L.* Pediatric Pulmonary Hypertension. Guidelines From the American Heart Association and American Thoracic Society. 2015. Available from: http://circ.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/CIR.0000000000000329/-/DC1 (accessed 20.05.2017)
27. B*erry R.B., Budhiraja R., Gottlieb D.J., Gozal D., Iber C., Kapur V.K.* Rules for scoring respiratory events in sleep: update of the 2007 AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events. 8(5): 597–619. 2012.
28. *Cole T.J., Freeman J.V., Preece M.A.* Body mass index reference curves for the UK. Arch. Dis. Child. 73(1): 25–29. 1995.
29. Научно-организационный комитет проекта ЭССЕ-РФ. Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний в различных регионах России (ЭССЕ-РФ). Обоснование и дизайн исследования. Профилакт. мед. 16(6): 25–34. 2013. [Research organizing committee of the ESSE-RF project. Epidemiology of cardiovascular diseases in different regions of Russia (ESSE-RF). The rationale for and design of the study. Profilakt. Med. 16(6): 25–34. 2013.
30. *Соломаха А.Ю., Петрова Н.А., Иванов Д.О., Свиряев Ю.В.* Особенности апноэ у детей первого года жизни, родившихся недоношенными и страдающих бронхолегочной дисплазией и легочной гипертензией. Педиатрия. 9(3): 16–24. 2018. [*Solomakha A.Yu., Petrova N.A., Ivanov D.O., Sviryaev Yu.V.* Apnoe in first year of life infants, born premature with bronchopulmonary displasia and pulmonary hypertension. Pediatriya. 9(3): 16–24. 2018. (In Russ)].

31. *Montgomery-Downs H.E., Crabtree V.M., Sans Capdevila O., Gozal D.* Infant-feeding methods and childhood sleep-disordered breathing. Pediatrics. 120(5): 1030–1035. 2007.
32. *Guilleminault C., Tilkian A.G., Dement W.C.* Sleep and respiration in the syndrome "apnea during sleep" in the child. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 41(4): 367–78. 1976.
33. *Кельмансон И.А.* Эмоциональные расстройства и расстройства поведения у детей, связанные с нарушениями сна. Рос. вест. перинатологии и педиатрии. 59(4): 32–40. 2014. [*Kelmanson I.A.* Emotional and behavioral problems associated with sleep disorders in children. Ross Vestn Perinatol Pediatrii (Russ. Bull. Perinatol. Pediatr). 59(4): 32–40. 2014. (In Russ)].
34. *Bhushan B., Ayub B., Loghmanee D.A., Billings K.R.* Metabolic alterations in adolescents with obstructive sleep apnea. Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol. 79(12): 2368–2373. 2015.
35. *Ryan S., Taylor C.T., McNicholas W.T.* Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. Circulation. 112 (17): 2660–2667. 2005.
36. *Лисовская Н. А., Дубинина Е. А., Антонова Т. Д., Коростовцева Л. С., Свиряев Ю. В., Образцова Г.И., Алехин А.Н.* Синдром обструктивного апноэ во сне у подростков с избыточной массой тела и ожирением: фокус на когнитивное функционирование. Артериальная гипертензия. 23(4): 303–312. 2017. [*Lisovskaya N.A., Dubinina E.A., Antonova T.D., Korostovtseva L.S., Sviryaev Y.V., Obraztsova G.I., Alekhin A.N.* Obstructive sleep apnea syndrome in overweight and obese adolescents: focus on cognitive functioning. Arterial'naya Gipertenziya. 23(4): 303–312. 2017. (In Russ)].
37. *Tomskikh A. S., Bochkarev M. V., Yakushenko E. S., Gumennyi V. G., Korostovtseva L. S., Sviryaev Yu. V.* Actigraphy in Holter Monitoring for Assessment of Sleep Parameters and Periods. Biomed. Engineering. 51 (2): 128–132. 2017.

Sleep-Disordered Breathing in Different Age Categories

A. Yu. Solomakha[a], N. A. Lisovskaya[a], M. V. Bochkarev[a], L. S. Korostovtseva[a], N. A. Petrova[a], G. I. Obraztsova[a], and Yu. V. Sviryaev[a, b, *]

[a] *Almazov National Medical Research Center, St. Petersburg, Russia*

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

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

Obstructive apnea syndrome (OSA) is the most common sleep-disordered breathing in adults and children. It is unknown whether the OSA in children and adults are different syndromes, or a single disease that begins in infancy. Here, we consider the risk factors and features of the obstructive sleep apnea in different age categories: infants born prematurely and suffering from bronchopulmonary dysplasia (BPD), overweight adolescents, and 25–64 years old adults. We demonstrate that the sleep-disordered breathing decreases the saturation in all groups. Premature infants with BPD and pulmonary hypertension (PH) had more desaturation episodes than the group without PH. Adolescents with excessive body weight and obesity had higher blood pressure, lipid and glucose levels. OSA was associated with higher lipid metabolism and creatinine levels in adults.

Keywords: sleep apnea, premature infants, adolescents, adults, bronchopulmonary dysplasia

ЦИТИРОВАТЬ:

Соломаха А.Ю., Лисовская Н.А., Бочкарев М.В., Коростовцева Л.С., Петрова Н.А., Образцова Г.И., Свиряев Ю.В. Нарушения дыхания во сне у людей разных возрастных групп. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(1): 31–43.

DOI: 10.31857/S0869813920010100

TO CITE THIS ARTICLE:

Solomakha A.Yu., Lisovskaya N.A., Bochkarev M.V., Korostovtseva L.S., Petrova N.A., Obraztsova G.I., Sviryaev Yu.V. Sleep-Disordered Breathing in Different Age Categories. Russian Journal of Physiology. 106(1): 31–43.

DOI: 10.31857/S0869813920010100

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 1, с. 44–54

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

МАКСИМАЛЬНАЯ АМПЛИТУДА ЭЛЕКТРОМИОГРАММ СГИБАТЕЛЕЙ И РАЗГИБАТЕЛЕЙ РУК В СЕРИИ СЕАНСОВ УПРАВЛЕНИЯ СИЛОВЫМ ДЖОЙСТИКОМ У ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ

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

[1]Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Россия
[2]Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина, Москва, Россия
*****E-mail: delviza@mail.ru*

Поступила в редакцию 17.08.2019 г.
После доработки 18.10.2019 г.
Принята к публикации 18.10.2019 г.

Построение востребованных сегодня в связи с развитием новой техники многомерных моделей мышечной адаптации у человека или решение прикладных задач, например, определения оптимального дозирования и режимов двигательной реабилитации, актуализируют комплексные исследования физиологических механизмов моторного контроля. Наблюдение на 20 здоровых праворуких добровольцах включало 4 целевых сеанса и 1 контрольный, выполнявшихся в течение 5 последовательных дней недели. Каждый целевой сеанс содержал простую задачу: поочередно, обеими руками, с помощью приложения силы к неподвижной рукояти (силовому джойстику), четко позиционируя локоть, управлять меткой на экране, расположенном напротив испытуемого. Целью рассматриваемой части комплексного проекта было исследование электромиографической активности мышц-сгибателей и разгибателей (поверхностного сгибателя пальцев, разгибателя пальцев, длинного разгибателя большого пальца и короткого сгибателя большого пальца кисти) обеих рук в поисках признаков мышечной адаптации при повторяющихся кратких сеансах целенаправленного управления с помощью руки по прикладываемой силе, в течение короткого курса. Анализ индивидуальных и групповых характеристик указывает на важную роль конфигурации, распределения активности (взаимодействия) исследуемых мышц в развитии адаптации, отличия в активности мышц правой и левой рук. Различия мышц-сгибателей и мышц-разгибателей на обеих руках проявлялись в больших значениях максимальных амплитуд ЭМГ и более выраженным сдвигом к снижению показателей от фона в направлении последующих целевых сеансов для мышц-сгибателей при нелинейном характере изменений.

Ключевые слова: мышечные адаптации, электрическая активность мышц рук, управляющие движения рук, статические и малоамплитудные движения рук, сгибатели и разгибатели рук, максимальная амплитуда электромиограммы, силовой джойстик

DOI: 10.31857/S0869813920010069

“Новые” приложения “старых” физиологических методов, таких, как электромиография, касаются, в том числе, активно развивающейся области – проектирования, практического применения и оценивания различных “дополняющих”,

“заменяющих”, “стыковочных” и “реабилитирующих” устройств для человека: протезов конечностей [1], экзоскелетов [2], управляющих устройств, учебных и реабилитационных тренажеров [3]. При этом ясного понимания того, как именно действуют на человека, к каким изменениям или адаптациям мышц, и в какие сроки, приводят эти новые вещи, и как лучше организовывать обучение их применению, еще только предстоит достичь. Накопление эмпирических данных и развитие теоретических представлений здесь касается, например, определения оптимальных дозировок и режимов в двигательной реабилитации [4] или создания многомерных моделей мышечной адаптации [5]. Иными словами, физиологическая сторона вопроса оказывается сегодня не менее важной, чем чисто инженерная, для гармоничного развития актуального направления, но малоисследованной. В рамках комплексного проекта, связанного с исследованием регуляции движений человека, нами получены электромиографические данные активности мышц рук 20 здоровых добровольцев при выполнении специфических управляющих воздействий – путем силовых воздействий (надавливаний) на неподвижную рукоять контроллера для перемещения объекта на экране, с визуальным каналом обратной связи. Актуальность управления по силовым характеристикам обусловлена различными обстоятельствами – от возможности “улавливания” малоамплитудных, не достаточных для эффективного применения акселерометрии или гониометрии, движений конечностей у тяжело больных с целью диагностики и тренировок с биологической обратной связью, до специфических требований для управления напланетными роботами с борта космического корабля [6]. Применение в нашем наблюдении оригинального контроллера – “силового джойстика”, полагаем, способствовало актуальности и новизне полученных результатов. Целью предлагаемой части комплексного проекта было исследование электромиографической активности мышц-сгибателей и разгибателей (поверхностного сгибателя пальцев, разгибателя пальцев, длинного разгибателя большого пальца и короткого сгибателя большого пальца кисти) обеих рук в поисках признаков мышечной адаптации при повторяющихся кратких сеансах целенаправленного управления с помощью руки по прикладываемой силе, в течение короткого курса.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Испытуемые. Этические условия. Наблюдение выполнялось на базе Центра коллективного пользования “Экспериментальная физиология и биофизика” кафедры физиологии человека и животных и биофизики Таврической академии (СП) ФГАОУ ВО “Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского” на 20 условно здоровых молодых праворуких мужчинах-добровольцах 18–25 лет. Соблюдались современные этические нормы согласно требованиям локальной этической комиссии, в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации и ГОСТ Р 56509-2015 “Услуги населению. Надлежащая практика гуманитарных исследований”.

Процедура. Добровольцы, после инструктажа, предварительного обучения, выполняли 4 целевых сеанса и контрольный в течение 5 последовательных дней недели, в первой половине дня. В течение каждого целевого сеанса требовалось выполнить достаточно простую задачу: поочередно, обеими руками, с помощью приложения силы к **неподвижной** рукояти (силовому джойстику) четко позиционируя локоть, управлять меткой на экране, расположенном напротив испытуемого, по 60 с на каждый подход, с минутным отдыхом между подходами – рис. 1.

Кисть руки располагалась на рукояти удобным для испытуемого стандартным обхватом, задаваемым формой рукояти, размером кисти и длиной пальцев добровольца, а также стандартной позицией локтя по разметке на экспериментальном

Рис. 1. Подготовка (прилаживание) и выполнение добровольцем процедуры “Динамическая проба” рукой с помощью силового джойстика.

Fig. 1. Preparation (attuning) and execution of the Dynamic Test by the volunteer with the power joystick.

столе. Управляемое движение метки соответствовало прилагаемой добровольцем к джойстику силе, а выполняемая траектория определялась появляющимися на экране по периметру центрального круга круглыми “мишенями”, на которые, согласно инструкции, наводилась управляемая метка, производилось удержание метки на мишени до ее исчезновения, и возвращение в центр для продолжения – алгоритм “Динамическая проба” в программе STPL (RU 2013610986). В процессе выполнения задачи и непосредственно перед проведением сеанса регистрировались электрофизиологические показатели, в частности, интерференционная поверхностная электромиография (ЭМГ) следующих мышц обеих рук: поверхностный сгибатель пальцев (musculus flexor digitorum superficialis); разгибатель пальцев (musculus extensor digitorum); длинный разгибатель большого пальца (musculus extensor pollicis longus); короткий сгибатель большого пальца кисти (musculus flexor pollicis brevis) – по RU 201911906. До и после каждого подхода снимался сигнал при свободном (“расслабленном”) обхвате рукояти силового джойстика.

Перед проведением целевых сеансов, в отдельный день, однократно, проводился фоновый сеанс (“фон”, контроль), отличием которого от 4 целевых сеансов было простое не целенаправленное сжатие рукояти добровольцем вместо управления (без обратной связи). Порядок сеансов представлен также на рис. 2.

С учетом того, что характеристики ЭМГ во многом зависят от положения электродов на мышце и обработки кожи, электроды в разные сеансы позиционировались максимально точно (одинаково) на руке добровольца, контактная поверх-

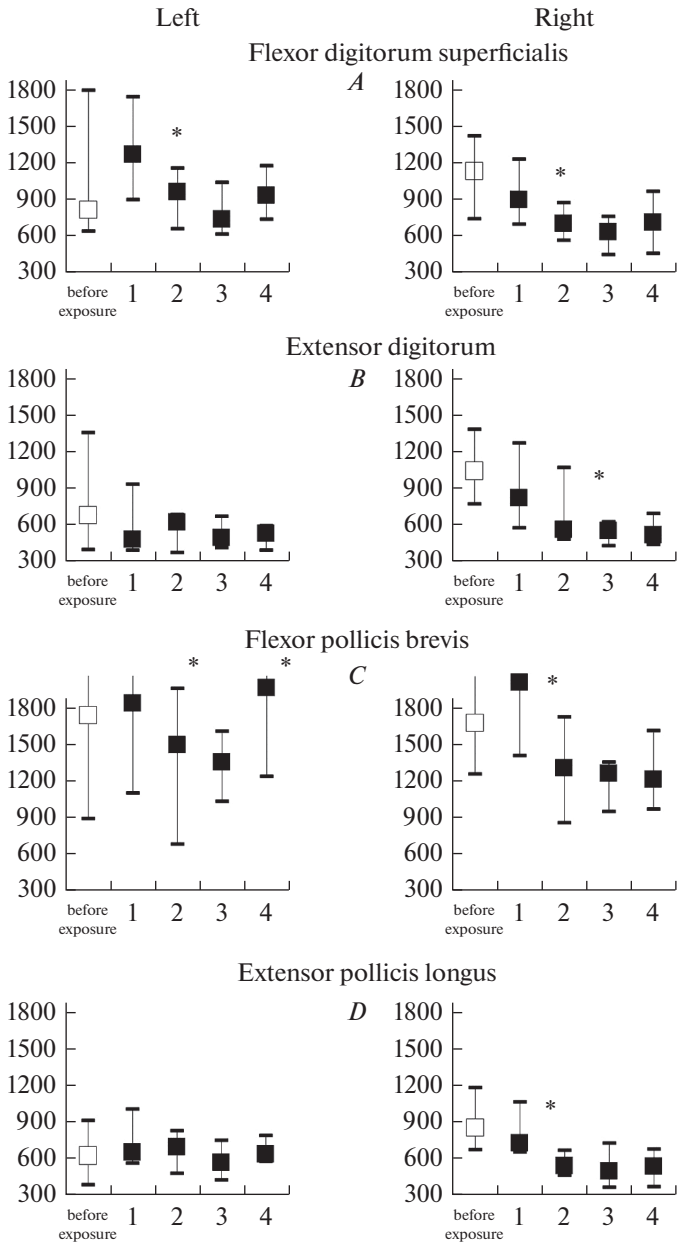

Рис. 2. Обобщенная динамика максимальной амплитуды ЭМГ в мышцах-сгибателях (*A*, *C*) и разгибателях (*B*, *D*) левой и правой рук исследуемых добровольцев – медианы и интерквартильный размах значений, белым выделено фоновое значение медианы. Звездочками выделены статистически значимые отличия последующего сеанса от предыдущего.

Fig. 2. The averaged dynamics of the maximum EMG amplitude values in flexor (*A*, *C*) and extensor (*B*, *D*) muscles in the volunteers' left and right hands – medians with interquartile range, the baseline median values are shown in a white color. Asterisks indicate statistically significant differences between the two subsequent sessions.

ность тщательно обрабатывалась. Использовались стандартные электроды для применявшегося оборудования.

Оборудование и программное обеспечение. В работе использовались: 1) многофункциональный комплекс электрофизиологических исследований "Нейрон-Спектр-5s" под управлением программы "Нейро-МВП.NETomega" – "Нейрософт", Россия, № РОСС RU.ИМ18.Д00816. 2) Силовая платформа ST-150 с экраном обратной связи под управлением программы STPL – "Мера-ТСП", Россия, N ФСР 2010/07900; RU.C.39.004.A N 41201; GMDN: 43114 Balance/mobility management system platform, 43115 Balance/mobility management system application software. 3) Силовой джойстик для ST-150 – RU 2018145572/14(076192).

Анализируемые показатели. Оценивалась максимальная амплитуда ЭМГ, рассчитываемая штатным программным обеспечением, в микровольтах (МкВ). Выбор здесь этого единственного показателя и исключение средних значений и характеристик турнов обусловлен представлением, что синхронизация двигательных единиц не оказывает существенного влияния на взаимосвязи между электромиограммой и развиваемой силой мышцы (необходимой здесь для управления силовым джойстиком) при условии одинакового уровня синхронизации на разных уровнях возбуждения [7]. Данные условия обеспечивались предварительным обучением испытуемых – внешние результаты выполнения задачи были весьма однородными: медианные значения результата в баллах (определяемых в программе STPL как количество регистрируемых (дискретных) удержаний метки общего центра давления в целевой зоне за период, соответствующее качеству управления движением (выполнению инструкции) испытуемым) были в диапазоне 21–25 баллов для обеих рук на всех сеансах наблюдения. Для анализа использовался каждый целый период выполнения задачи, в соответствии с описанием процедуры.

Статистический анализ. Для описания выборок использовались робастные характеристики: медиана, квартили. Для сравнения значимости и направленности различий парных выборок – критерий Вилкоксона. Принятый уровень значимости равнялся 0.05. Для визуализации взаимосвязей различных состояний исследуемых мышц использовался силовой алгоритм Фрухтермана–Рейнгольда [8], разновидность метода имитации отжига для поиска глобального оптимума функции – исходя из представления о взаимодействии мышц-сгибателей и разгибателей, направленном при развитии адаптации или обучения на минимизацию усилий (достижение оптимума функции). Для статистической обработки данных, подготовки таблиц и графиков использовались программы MS Excel 2010; SPSS 13.0, построение графа – Gephi 0.9.2.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обобщенная динамика максимальной амплитуды ЭМГ исследуемых мышц добровольцев при обхвате рукояти ("сжатие") в последовательных сеансах. На рис. 2 представлены обобщенные групповые характеристики – медианы и интерквартильный размах значений максимальной амплитуды ЭМГ мышц обеих рук при выполнении задачи каждого сеанса ("сжатие").

Для поверхностного сгибателя пальцев правой руки статистически значимые отличия максимальной амплитуды во всей группе при сравнении выборок (рис. 3) наблюдались только между 1 и 2 целевыми сеансами – снижение, $p = 0.006$. Аналогично и для левой руки, $p = 0.04$. То есть, наиболее отчетливые изменения здесь происходили после первого целевого сеанса.

Для разгибателя пальцев значимые отличия максимальной амплитуды во всей группе есть только для правой руки в 3-м сеансе относительно 2-го: отрицательный сдвиг, $p = 0.017$.

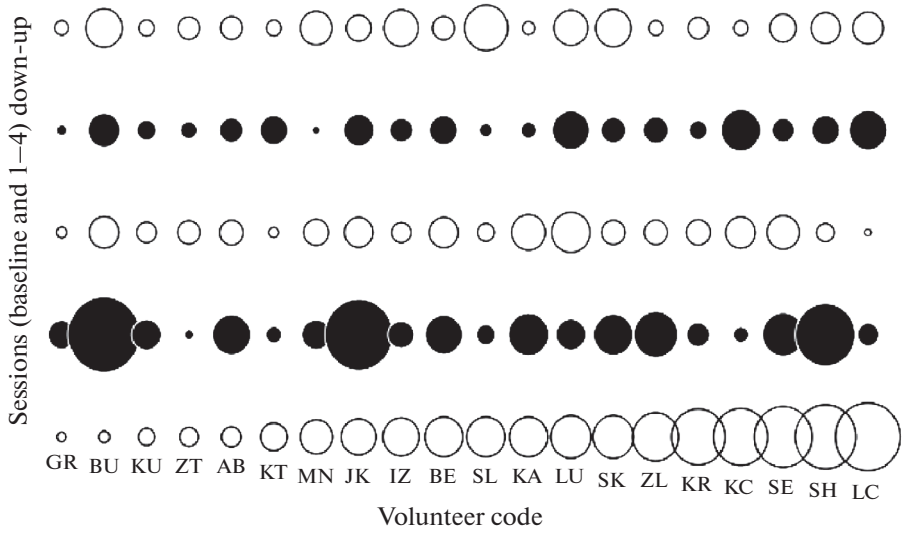

Рис. 3. Изменения максимальной амплитуды ЭМГ поверхностного сгибателя пальцев правой руки у добровольцев выборки, где диаметр пузырька пропорционально отображает абсолютное значение показателя.

Fig. 3. Maximum EMG amplitude changes shown for the superficial flexor of the right hand fingers, with the bubble diameter proportionally indicating the absolute values.

Для короткого сгибателя большого пальца кисти – значимые различия для правой руки во 2-ом сеансе относительно 1-го: отрицательный сдвиг, $p = 0.015$; для левой также во 2-ом сеансе относительно 1-го: отрицательный сдвиг, $p = 0.025$, и между сеансами 4 и 3: положительный сдвиг, $p = 0.035$.

Для длинного разгибателя большого пальца – значимые различия только для правой руки во 2-ом сеансе относительно 1-го: отрицательный сдвиг, $p = 0.009$.

Отличия режима управления при обхвате рукояти в целевых сеансах от фонового "сжатия" по максимальной амплитуде ЭМГ исследуемых мышц. При выполнении целевых сеансов 1–4 для поверхностного сгибателя пальцев левой руки в группе не наблюдалось статистически значимых отличий максимальных амплитуд ЭМГ от "пустого" сжатия в фоне, а для правой руки отличия проявились, начиная со второго целевого сеанса (порядок сеансов представлен также на рис. 2). Так, по сравнению с фоном в сеансе 2 – отрицательные сдвиги, $p = 0.003$; в сеансе 3 – отрицательные сдвиги, $p = 0.001$; в сеансе 4 – отрицательные сдвиги, $p = 0.011$. Проведены аналогичные сравнения для разгибателя пальцев: на правой руке значимые отличия от фона проявились в сеансе 3 – отрицательные сдвиги, $p = 0.001$; на левой руке отличия тоже проявились в сеансе 3 – отрицательные сдвиги, $p = 0.04$, в сеансе 4 – отрицательные сдвиги, $p = 0.037$. Далее, для короткого сгибателя большого пальца кисти: на правой руке отрицательные сдвиги в сеансе 3 при $p = 0.021$ и в сеансе 4 при $p = 0.017$; а на левой руке значимых отличий не было. И, для длинного разгибателя большого пальца: на правой руке – отрицательные сдвиги в сеансе 2 ($p = 0.007$), в сеансе 3 ($p = 0.02$) и в сеансе 4 ($p = 0.001$); а для левой руки значимых отличий не было.

Влияние процедуры в целом (сеанса) на максимальную амплитуду ЭМГ исследуемых мышц – сравнение значений при свободном обхвате ("расслабление") рукояти до и после сеанса. Активность во время фонового сеанса не вызывала в группе испытуемых быстрых изменений показателя максимальных амплитуд ЭМГ вследствие

выполнения “пустой” задачи, что подтверждалось отсутствием статистически значимых различий значений в парных выборках (соответствующих сеансу, правой или левой руке, исследуемой мышце) в условиях свободного обхвата рукояти силового джойстика (“расслабление”), при принятом уровне значимости. Аналогично – в первый целевой сеанс. В целевом сеансе 2 наблюдались статистически значимые различия значений этого показателя для поверхностного сгибателя пальцев правой руки (отрицательный сдвиг, $p = 0.006$) и для короткого сгибателя большого пальца кисти левой руки (отрицательный сдвиг, $p = 0.012$). В целевом сеансе 3 различия обнаружены при сравнении показателей для короткого сгибателя большого пальца кисти левой руки (отрицательный сдвиг, $p = 0.001$). В целевом сеансе 4 значимые различия обнаружены при сравнении парных выборок значений для разгибателя пальцев правой руки (отрицательный сдвиг, $p = 0.04$) и для поверхностного сгибателя пальцев левой руки (отрицательный сдвиг, $p = 0.011$).

Индивидуальная динамика максимальной амплитуды ЭМГ исследуемых мышц при обхвате (“сжатие”) рукояти в последовательных сеансах. Достаточно контрастным примером изменений показателя активности исследуемых мышц в течение целевых сеансов могут служить динамики индивидуальных параметров с поверхностного сгибателя пальцев правой руки – иллюстрация выбрана, исходя из обобщенных групповых характеристик и сравнений, представленных на рис. 2, блок А и в описании выше. На рис. 3 отображены индивидуальные изменения для всех добровольцев – диаметр пузырьков соответствует значению максимальной амплитуды ЭМГ данной мышцы.

Применяемая здесь с некоторой долей условности проверка наличия тренда в индивидуальных изменениях показателя (для значений каждого испытуемого – критерий серий) всех исследуемых мышц, подтверждает здравое заключение, что изменение здесь связано с конкретной деятельностью, обусловленной выполнением инструкции, а получаемые значения независимы, наблюдаемые изменения нелинейны. Это справедливо для показателей всех исследуемых мышц у всех добровольцев. При наличии в выборке разных типов динамики максимальной амплитуды ЭМГ (примеры на рис. 3), следует в целом выделить наиболее интенсивное изменение характера управления исследуемыми мышцами по максимальной амплитуде ЭМГ с 1-го на 2-й или со 2-го на 3-й сеансы, выражающееся преимущественно в уменьшении показателя, что можно отметить в качестве наиболее общей характеристики.

Соотношения изменений максимальной амплитуды ЭМГ разных исследуемых мышц при обхвате (“сжатие”) рукояти в последовательных сеансах. Индивидуальный пример (код добровольца GR) представлен на рис. 4 в виде силового графа, где расположение узлов определяется силами, которые объединяют узлы и раздвигают их. Показатели для каждой мышцы за все сеансы наблюдения выделены цветом (узлы и ребра графа), а буквой “s” (сеанс) и номером отмечены последовательные целевые сеансы.

Статистика графов: число узлов – 20, число ребер – 16; количество связей узла, разделенное на общее количество связей в графе (средняя взвешенная степень) – 0.8; отношение числа ребер к максимально возможному (плотность) – 0.042; соотношение плотности связей внутри группы при заданном разбиении графа на группы с плотностью связей между группами (модулярность) – 0.75.

Более плотное расположение узлов в фоне для правой руки соответствует большей скоординированности сгибателей и разгибателей по сравнению с левой рукой. То есть, в использованной силовой модели силы притяжения и отталкивания уравновесились при более компактном расположении вершин. Аналогичное, более компактное расположение вершин для правой руки наблюдалось и при последующих сеансах (s.1-4 для исследуемых мышц на рис. 4).

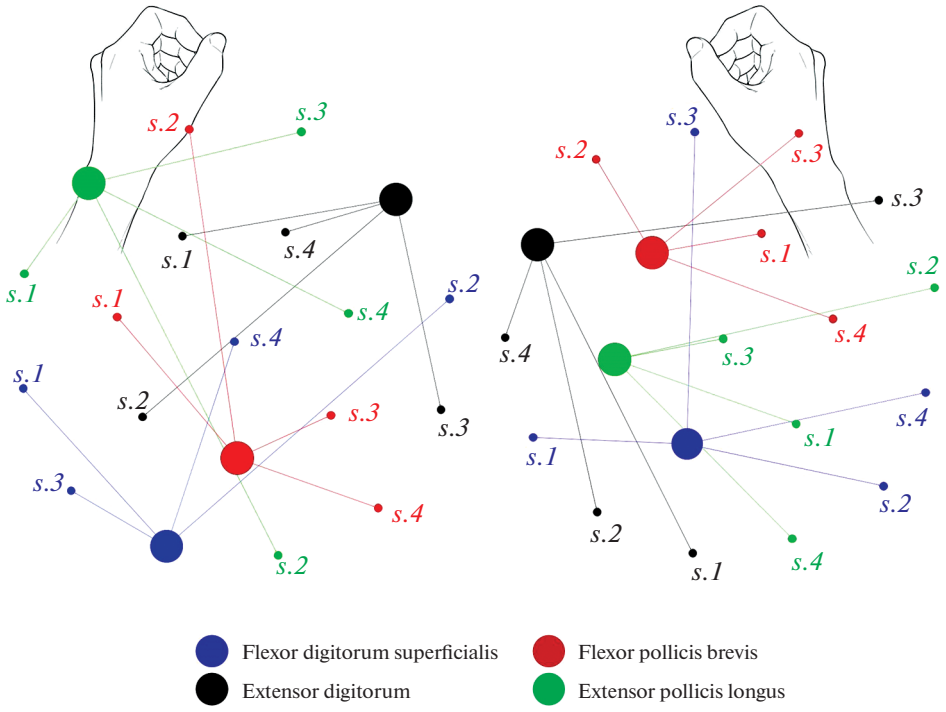

Рис. 4. Смешанные ориентированные графы по силовому алгоритму Фрухтермана–Рейнгольда по значениям максимальной амплитуды ЭМГ исследуемых мышц (выделено цветом) каждой руки (левая и правая отмечены условными изображениями) в последовательных сеансах, где более крупные узлы соответствуют фоновому сеансу, а целевые сеансы отмечены s.1-4.

Fig. 4. Mixed directed graphs according to the Fruchterman-Reingold force algorithm for the maximum EMG amplitude values of the studied muscles (indicated by different colors) for each hand (left and right hands are indicated by corresponding images) in successive sessions, with the larger nodes indicating the baseline session, and the target sessions marked by s.1-4.

Анализ индивидуальных соотношений (пример на рис.4) и обобщенных (групповых) соотношений, представленных на рис. 2 и в описании выше, указывает на различия в адаптациях правой и левой рук испытуемых, проявляющиеся в естественно большей для правшей координированности мышц правой руки и более быстрой адаптации к стандартной задаче управления силовым джойстиком. Различия мышц-сгибателей и мышц-разгибателей на обеих руках проявлялись в больших значениях максимальных амплитуд ЭМГ и более выраженным сдвигом к снижению показателей от фона в направлении последующих сеансов для сгибателей.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Особенностью проведенного наблюдения был режим движений, весьма близкий к изометрической активности ручных мышц. То есть, наблюдалась ситуация, когда силовое воздействие на неподвижную рукоять управления происходило при почти постоянной или мало меняющейся длине мышц из-за ограниченной условиями подвижности управляющей руки. Для реализации управления было необходимо прикладывать определенную (минимальную) силу в соответствии с параметрами силового джойстика, что, вероятно, могло в какой-то мере способствовать некото-

рому “выравниванию” активности мышц. Такая ситуация соответствует типичным условиям ручного управления каким-либо техническим устройством или системой. В наблюдении требовались достаточно точные, но довольно слабые и кратковременные усилия, чтобы можно было говорить о типичных механизмах развития мышечных адаптаций [5]. При этом сравнение значений максимальной амплитуды ЭМГ исследуемых мышц в последовательных сеансах указывает на отличия, которые, вероятно, можно трактовать как изменения порогов [9], что может помочь в объяснении нелинейности изменений. Или, иначе, можно предположить, что нейроны моторной коры максимально чувствительны к “предпочтительным” направлениям движений рук и постепенно уменьшают активность при отклонениях от этих направлений [10], что также возможно связать с теорией функциональных систем П.К. Анохина. На динамические изменения эфферентной сигнализации даже в краткосрочном курсе кратких занятий, принятых в нашем наблюдении, указывают сравнения электрической активности мышц рук при внешне похожих, но отличающихся наличием или отсутствием задачи управления фонового и целевых сеансов. На наш взгляд, наблюдавшиеся отрицательные сдвиги значений максимальной амплитуды ЭМГ в ходе наблюдения, могут отражать когнитивные аспекты управления, например, описываемые иногда также как визуально-моторная адаптация, существующая даже в отсутствие обучения – результат взаимодействия между явным обучением, управляемым целевой ошибкой, и неявным изучением прямой модели, управляемой ошибкой прогнозирования [11]. Учитывая наличие визуального канала обратной связи и его несомненное влияние на наблюдаемые изменения активности мышц [12], а также другие исследования направления, где предполагается, что координация движений не оптимизируется на уровне отдельных мышц, а происходит системно, связываясь с фактическим положением конечности, иерархической схемой управления [13], можно отметить, как полагаем, полезность полученных нами данных для развития системных представлений о регуляции функции. Это можно рассматривать, например, в контексте разработки метода для обучения нейронных декодеров прогноза активации мышц, где линейный декодер учитывал бы вклад каждого нейронного блока в погрешность прогнозируемой ЭМГ по сравнению с предварительно определенным оптимальным значением для соответствующего целенаправленного усилия [14], или в контексте разработки теорий моторного контроля [15].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выполнение добровольцами даже нескольких кратких заданий по визуальному управлению с обратной связью путем приложения силы к статичному контроллеру (рукояти) сопровождалось развитием мышечных адаптаций, которые проявлялись преимущественно в снижении максимальной амплитуды ЭМГ исследуемых мышц руки в течение 2–3 сеансов из 5, с учетом первого контрольного сеанса (фона). Активность во время фонового сеанса не вызывала в группе испытуемых быстрых изменений показателя максимальных амплитуд ЭМГ вследствие выполнения “пустой” задачи, что отличало внешне похожие усилия при выполнении задачи целевых сеансов – тем самым, дополнительно подтверждая здесь различия в механизмах обеспечения движений, роль постановки цели поведения. Для мышц-сгибателей наблюдался более выраженный отрицательный сдвиг значений показателей от фона в направлении последующих целевых сеансов, чем для мышц-разгибателей. Индивидуальный и групповой анализ указывают на важную роль конфигурации активностей в электромиограмме, отражающей взаимодействия различных мышц руки для выполнения целенаправленного поведения – ручного управления объектом на экране.

Наблюдение выполнялось в рамках комплексного проекта по изучению регуляции движений человека, что предполагает дальнейшее развитие и преодоление возможных ограничений, обусловленных применением одной описанной методики. Авторы будут признательны вниманию коллег, предложениям и конструктивной критике.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Финансирование осуществлено в рамках плановой работы ФГАОУ ВО "Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского" и ФГБНУ "НИИ нормальной физиологии имени П.К. Анохина". Поддержано грантом Государственного совета Республики Крым для молодых ученых на 2019 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Zecca M., Micera S., Carrozza M.C., Dario P.* Control of Multifunctional Prosthetic Hands by Processing the Electromyographic Signal. Crit. Rev. Biomed. Eng. 2017; 45(1–6): 383–410. https://doi.org/10.1615/CritRevBiomedEng.v45.i1-6.150
2. *Pirondini E., Coscia M., Marcheschi S., Roas G., Salsedo F., Frisoli A., Bergamasco M., Micera S.* Evaluation of the effects of the Arm Light Exoskeleton on movement execution and muscle activities: a pilot study on healthy subjects. J. Neuroeng. Rehabil. 2016 Jan. 23; 13: 9. https://doi.org/10.1186/s12984-016-0117-x
3. *Kim G.J., Taub M., Creelman C., Cahalan C., O'Dell M.W., Stein J.* Feasibility of an Electromyography-Triggered Hand Robot for People After Chronic Stroke. Am. J. Occup. Ther. 2019 Jul/Aug; 73(4): 7304345040p1–7304345040p9. https://doi.org/10.5014/ajot.2019.030908
4. *Гроховский С.С., Кубряк О.В.* К вопросу о "дозе" двигательной реабилитации после инсульта: обзор. Физиотерапия, бальнеология и реабилитация. 2018 17(2): 66–71. *S.S., Kubryak O.V.* To the question of the dose a motor reabilitation after a stroke:a review. Phsiotheray.balneology and reabilitation. 2018 17(2): 66–71. https://doi.org/10.18821/1681-3456-2018-17-2-66-71(In Russ)]. https://doi.org/10.18821/1681-3456-2018-17-2-66-71[Grokhovskiy
5. *Wisdom K.M., Delp S.L., Kuhl E.* Use it or lose it: multiscale skeletal muscle adaptation to mechanical stimuli. Biomech. Model Mechanobiol. 2015 Apr.; 14(2): 195–215. https://doi.org/10.1007/s10237-014-0607-3
6. *Мулюха В.В., Заборовский В.С., Попов С.Г.* Управление группировкой нанпланетных роботов в супервизорном режиме с борта орбитальной станции. Робототехника и техническая кибернетика. 1(14): 55–60. 2017. [*Milyukha V.V., Zaborovsky V.S., Popov S.G.* Controlling a group of alien robots in Supervisory mode from the orbital station. Robotics and Technical Cybernetics. 1(14): 55–60. 2017. (In Russ)].
7. *Beck T.W., Housh T.J., Johnson G.O., Cramer J.T., Weir J.P., Coburn J.W., Malek M.H.* Does the frequency content of the surface mechanomyographic signal reflect motor unit firing rates? A brief review. J. Electromyogr. Kinesiol. 17(1): 1–13.2007.
8. *Fruchterman T.M.J., Reingold E.M.* Graph drawing by force-directed placement. Software: Practice and Experience. 21(11): 1129–1164. 1991.
9. *Foisy M., Feldman A.G.* Threshold control of arm posture and movement adaptation to load. Exp. Brain Res. 175(4): 726–744. 2006.
10. *Feldman A.G.* Indirect, referent control of motor actions underlies directional tuning of neurons. J. Neurophysiol. 2019 Mar. 1; 121(3): 823–841. https://doi.org/10.1152/jn.00575.2018
11. *Taylor J.A., Krakauer J.W., Ivry R.B.* Explicit and implicit contributions to learning in a sensorimotor adaptation task. J. Neurosci. 2014 Feb.19; 34(8): 3023–32. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3619-13.2014
12. *Hinder M.R., Tresilian J.R., Riek S., Carson R.G.* The contribution of visual feedback to visuomotor adaptation: how much and when? Brain Res. 2008 Mar. 4; 1197: 123–34. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.12.067
13. *de Rugy A., Loeb G.E., Carroll T.J.* Muscle coordination is habitual rather than optimal. J. Neurosci. 2012 May 23; 32(21): 7384–91. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5792-11.2012
14. *Ethier C., Acuna D., Solla S.A., Miller L.E.* Adaptive neuron-to-EMG decoder training for FES neuroprostheses. J. Neural. Eng. 2016 Aug.; 13(4): 046009. https://doi.org/10.1088/1741-2560/13/4/046009
15. *Latash M.L., Levin M.F., Scholz J.P., Schöner G.* Motor control theories and their applications. Medicina (Kaunas). 46(6): 382–392.2010.

Electromyogram Maximum Amplitudes in Arm Flexors and Extensors in Healthy Volunteers in a Series of the Power Joystick Control Training Sessions

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

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

The development of the new models of muscular adaptation in humans that is in hight demand today, or finding the solutions to applied problems, such as determining the optimal dosages and modes of motor rehabilitation, provide the need for complex studies of the physiological mechanisms of motor control. Here, we observed 20 healthy right-handed volunteers participating in a series of 4 main and 1 control sessions in the course of 5 consecutive days. Each main session involved the execution of a simple task: to continuously control the marker on the screen placed in front of them by applying force to the stationary handle (power joystick) using their right and left hands while maintaining the proper elbow position. The aim for the presented part of the complex project was to examine the electromyographic activity in flexor and extensor finger muscles (superficial flexor, extensor, and thumb long extensor and short flexor) in both hands, in order to find the markers of muscle adaptation within a short course series of brief training sessions of deliberate control by manual force application. The analysis of individual and group characteristics points at the importance of the configuration and of the level of activity (interaction) distribution in the examined muscles for the development of adaptation, and reveals the differences in the activity of right and left hand muscles. The differences between the flexor and extensor muscles in both hands manifested in the larger values of the maximum EMG amplitudes, and a more pronounced trend of their decrease with each subsequent main session relative to the control condition, for the flexor muscles. These changes were non-linear.

Keywords: muscle adaptation, hand muscle electrical activity, control of hand movements, static and low-amplitude hand movements, flexors and extensors, electromyogram maximum amplitude, power joystick

ЦИТИРОВАТЬ:

Джелдубаева Э.Р., Бирюкова Е.А., Махин С.А., Бабанов Н.Д.,Чуян Е.Н., Кубряк О.В. Максимальная амплитуда электромиограмм сгибателей и разгибателей рук в серии сеансов управления силовым джойстиком у здоровых добровольцев. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(1): 44–54.

DOI: 10.31857/S0869813920010069

TO CITE THIS ARTICLE:

Dzheldubaeva E.R., Biryukova E.A., Makhin S.A., Babanov N.D., Chuyan E.N., Kubryak O.V. Electromyogram Maximum Amplitudes in Arm Flexors and Extensors in Healthy Volunteers in a Series of the Power Joystick Control Training Sessions. Russian Journal of Physiology. 106(1): 44–54.

DOI: 10.31857/S0869813920010069

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 1, с. 55–65

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ХАРАКТЕРИСТИКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ СПЕРМАТОЗОИДОВ У ПОТОМСТВА САМОК КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1 ТИПА ПРИ ДЕЙСТВИИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА

© 2020 г. Г. В. Брюхин[1], С. Д. Антонов[1, *]

[1]Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия
**E-mail: s.d.antonov@mail.ru*

Поступила в редакцию 07.09.2019 г.
После доработки 18.10.2019 г.
Принята к публикации 22.10.2019 г.

Одним из основных факторов, обусловливающих развитие пренатального стресса, является сахарный диабет 1 типа матери, влияние которого на становление мужской репродуктивной системы потомства практически не изучено. В связи с этим целью настоящего исследования явился анализ особенностей двигательной активности сперматозоидов половозрелого потомства матерей с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа, подвергшегося воздействию иммобилизационного стресса. Работа выполнена на самках крыс линии Вистар, на которых моделировали сахарный диабет 1 типа, и их половозрелом потомстве. Сперматозоиды получали из придатка семенника, определяли их содержание в единице объема с учетом подвижности. С целью изучения антистрессорной резистентности сперматозоидов у подопытных животных моделировали иммобилизационный стресс. Установлено, что у потомства крыс с экспериментальным диабетом наблюдается снижение концентрации сперматозоидов. Под влиянием иммобилизационного стресса у экспериментальных животных интактной и опытной групп происходит снижение уровня концентрации сперматозоидов, наблюдается нарушение соотношения фертильных и нефертильных половых клеток. Установлено, что у подопытных животных снижены как число клеток Лейдига, так и индекс их активности. Анализ результатов позволяет сделать заключение о снижении фертильности и антистрессорной резистентности сперматогенеза потомства самок крыс с экспериментальным диабетом. Гипоталамо-гипофизарно-гонадная система обеспечивает контроль репродуктивной системы прежде всего за счет тестостерона, который вырабатывается клетками Лейдига и участвует в регуляции сперматогенеза. При этом активация гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы в условиях гипогликемии ведет к подавлению активности гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы. Можно предположить, что при иммобилизационном стрессе создается высокий уровень кортикостероидов, что еще сильнее угнетает секреторную активность клеток Лейдига, а в конечном итоге приводит к нарушению процесса сперматогенеза, проявляющемуся в снижении концентрации сперматозоидов и их двигательной активности.

Ключевые слова: сахарный диабет, эксперимент, потомство, сперматозоид, иммобилизационный стресс

DOI: 10.31857/S0869813920010033

Отличительной особенностью 21 века стала высокая частота бесплодия среди супружеских пар репродуктивного возраста. По данным отечественных и зарубеж-

ных авторов частота бесплодных пар составляет 10–20% и не имеет тенденции к снижению. Ежегодно в мире регистрируется до 2.5 миллионов случаев мужского и женского бесплодия [1, 2]. При этом на долю мужского фактора в бесплодном браке приходится до 50–55 [3].

Вместе с тем, многочисленными экспериментальными исследованиями и клиническими наблюдениями установлена высокая вероятность унаследования от матери разнообразных изменений, возникших в результате пренатального стресса. Так, показано, что пренатальный стресс приводит к развитию у потомства разнообразных ультраструктурных морфологических, нейрохимических, эндокринных и метаболических изменений, которые могут закрепляться в постнатальной жизни (явление внутриутробного программирования болезней) [4, 5]. Одним из основных факторов, обусловливающих развитие пренатального стресса, являются экстрагенитальные заболевания матери, среди которых особое место, в силу своей распространенности, занимает сахарный диабет, в том числе сахарный диабет 1 типа. По данным Госрегистра больных сахарным диабетом, в России на 01.01.2010 г. зарегистрировано более 3 млн человек, страдающих этой патологией [6]. Многочисленными клиническими наблюдениями показано, что сахарный диабет матери оказывает неблагоприятное влияние на развитие и состояние плода. У таких женщин часто рождаются дети с диабетической фетопатией [6]. Вместе с тем влияние сахарного диабета матери на морфофункциональное становление мужской репродуктивной системы потомства мало изучено. Результаты немногочисленных исследований имеют неоднозначный характер. Так, G. Jelodar и соавт. установили, что у половозрелого потомства самок крыс с экспериментальным диабетом имеет место увеличение массы семенников, сопровождающееся увеличением числа семенных извитых канальцев и их диаметра, а также снижением числа клеток Лейдига, клеток Сертоли и концентрации зрелых сперматозоидов на фоне гипергликемии [7]. В то же время E.M. Amorim с соавт. выявили снижение массы семенников потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом, протекающее на фоне снижения концентрации глюкозы крови. Вместе с тем, эти исследователи также выявили снижение концентрации сперматозоидов и их двигательной активности [8].

В связи с этим целью настоящего исследования явился анализ особенностей двигательной активности сперматозоидов половозрелого потомства матерей с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа, подвергшегося воздействию иммобилизационного стресса.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на крысах линии Вистар. Для достижения поставленной цели у половозрелых самок до беременности моделировали сахарный диабет 1 типа по общепринятой методике с использованием стрептозотоцина (Streptozotocin; MP Biomedicals, LLC; США) [9], который вводился животным внутрибрюшинно трижды с интервалом 7 дней (по 2.5 мг на 100 г массы в первую и в третью недели и по 2 мг на 100 г массы во вторую неделю). Всего за весь курс 10 животных с массой от 230 до 256 г получали по 17 мг стрептозотоцина, под влиянием которого у них развивался сахарный диабет, о чем свидетельствовал постоянный повышенный уровень содержания глюкозы в крови (32.56 ± 2.44 ммоль/л). Такой уровень глюкозы сохранялся на протяжении, как минимум, трех месяцев (у интактных самок показатели гликемии составляли 6.25 ± 0.22 ммоль/л). Концентрацию глюкозы в крови у экспериментальных животных определяли на базе ЦНИЛ ЮУГМУ при помощи “Комбинированного автоматического биохимического и иммуноферментного анализатора BIOCHEM ANALETTE (HTI)”. Забор крови осуществляли

из хвостовой вены по общепринятой методике. Уровень глюкозы определяли в венозной сыворотке.

Подсадка к интактным самцам для спаривания проводилась через 1 неделю после последнего введения стрептозотоцина. В результате рождались подопытные крысята, эту группу составили 19 крысят из 10 пометов, 10 крысят из которых представили группу "опыт", а оставшиеся 9 животных были подвергнуты действию иммобилизационного стресса и составили группу "опыт-стресс". В контрольную группу входили 18 крысят из 14 пометов, из которых 10 крысят составили интактную группу, 8 крысят – группу "контроль-стресс". В каждой группе определял весовые параметры экспериментальных животных.

Работа с лабораторными животными осуществлялась в соответствии с "Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях" от 18.03.1986 г. Все экспериментальные животные содержались в стандартных условиях вивария ЮУГМУ. Эвтаназия животных проводилась методом декапитации под эфирным наркозом.

Зрелые сперматозоиды получали из придатка семенника, разрезая его вдоль в среде дозированного количества 5%-ного раствора глюкозы (в объеме 1 мл), предварительно подогретой до 37°С. Затем отрезком отмытой резиновой трубки сперматозоиды из эпидидимиса активно перемещали в раствор в течение 2 мин [10]. Далее в камере Горяева подсчитывали количество сперматозоидов с учетом характера их подвижности. Подвижность оценивали по общепринятой 4-х балльной системе: 0 – неподвижные (погибшие), 1 – "дергающиеся" (колебательное, местное движение, когда имеется движение хвоста, но не происходит перемещение сперматозоида), 2 – слабоподвижные (манежное или круговое движение, при котором сперматозоиды вращаются вокруг своей головки или по небольшому кругу), 3 – прогрессивно подвижные (прямолинейное поступательное движение со спиральным вращением вокруг своей оси) сперматозоиды. Неподвижные и дергающиеся сперматозоиды принимали за нефертильную фракцию, а слабоподвижные и прогрессивно подвижные относили к фертильной фракции мужских половых клеток. Подсчет проводился в течение 1 ч через каждые 15 мин, а затем через 30 мин до 240-й мин включительно [11]. Наряду с этим рассчитывали индекс фертильности, который представляет собой отношение суммарного числа прогрессивноподвижных и слабоподвижных к содержанию дергающихся и неподвижных половых клеток.

Кроме того, определяли суммарное содержание сперматозоидов в единице объема (1 мл) эпидидимальной суспензии [12], а также индекс супрессии, который показывает степень снижения данного показателя в процентах относительно контрольной группы.

Проводили оценку мофофункционального состояния клеток Лейдига у животных интактной и опытной групп на серийных гистологических препаратах семенников, окрашенных гематоксилином и эозином по общепринятой методике. Определяли суммарное содержание интерстициальных эндокриноцитов (клеток Лейдига), а также число активных и неактивных эндокриноцитов [13].

С целью изучения особенностей антистрессорной резистентности половых клеток семенников у потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом нами моделировался иммобилизационный стресс, который вызывали путем иммобилизации животных на спине в камере Когана. Первоначально иммобилизация продолжалась с 10.00 до 15.00 ч. Затем после 2 ч отдыха животных вновь помещали в камеру на ночь. На следующее утро иммобилизацию прекращали до вечера. В 17.00 того же дня животных вновь подвергали иммобилизации до утра [14].

Полученные результаты обрабатывали с использованием программы Statustica v.6.0 ("Statsoft Inc."), данные представлены в виде средней арифметической и стандартной ошибки. Учитывая небольшой количественный состав групп эксперимен-

тальных животных, для оценки достоверности использовались непараметрические методы анализа: порядковые признаки между двумя группами – критерий Манна–Уитни. Статистически значимыми изменения считали при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Масса тела подопытных животных из группы “опыт” и “опыт-стресс” составила 163.8 ± 7.3 и 146.0 ± 6.2 г соответственно, и оказалась ниже, чем в контроле и в группе контроль-стресс (199.3 ± 10.9 и 160.5 ± 11.1 г соответственно).

Одним из важнейших показателей качества спермы является концентрация сперматозоидов. Нами установлено, что у половозрелого потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом наблюдается снижение концентрации половых клеток в 1 мл эпидидимальной суспензии ($98.5 \pm 6.4 \times 10^6$) по сравнению с контрольными животными ($137.5 \pm 6.2 \times 10^6$). Под влиянием иммобилизационного стресса у экспериментальных животных интактной и опытной групп происходит снижение уровня концентрации сперматозоидов. Так, если у интактных крысят исследуемый показатель составил $115.9 \pm 3.8 \times 10^6$ (индекс супрессии составил 15.7%), то у подопытных животных этот показатель снизился до уровня $70.2 \pm 3.2 \times 10^6$ (индекс супрессии составил 28.73%).

Среди сперматозоидов интактных животных на долю фертильной фракции приходится 84.1 ± 1.0% половых клеток, в том числе 52.3 ± 2.4% прогрессивноподвижных и 31.8 ± 2.0% слабоподвижных сперматозоидов. Под влиянием иммобилизационного стресса у интактных крысят фертильная фракция половых клеток уменьшилась на 22.4% и составила 65.3 ± 2.5%, в том числе фракция прогрессивноподвижных уменьшилась на 35.6% и составила 33.6 ± 1.7%, а фракция слабоподвижных сперматозоидов практически не изменилась и составила 31.7 ± 1.7%. Аналогичная закономерность выявлена и у подопытных животных. Так, фертильная фракция половых клеток у подопытных крысят оказалась уменьшенной на 14.5% по сравнению с группой контроля и составила 71.9 ± 1.8%. При этом у подопытных крысят фракция прогрессивноподвижных сперматозоидов составила 42.6 ± 1.5%, а фракция слабоподвижных клеток – 29.3 ± 1.5%. Под влиянием иммобилизационного стресса у подопытных животных произошло уменьшение содержания фертильной фракции сперматозоидов на 49.5% по сравнению с исходным уровнем и составило 36.3 ± 4.5%. При этом произошло снижение фракции прогрессивноподвижных клеток на 62%, что составило 16.2 ± 2.9%, и слабоподвижных сперматозоидов на 31.3%, что образовало 20.1 ± 2.0%.

Одним из ведущих показателей фертильности человека является жизнеспособность сперматозоидов. Для оценки жизнеспособности половых клеток нами проводился анализ субпопуляционного состава сперматозоидов с учетом их двигательной активности. Прежде всего, установлено, что у экспериментальных животных интактной и опытной групп содержание прогрессивноподвижных сперматозоидов постепенно уменьшалось (табл. 1). При этом у контрольных животных прогрессивноподвижные сперматозоиды обнаруживались в эпидидимальной взвеси до 90-ой минуты наблюдения, а у подопытных крысят только до 45-ой минуты. Аналогичная закономерность выявлена нами и при анализе жизнеспособности фракции слабоподвижных половых клеток (табл. 2). Как видно из табл. 2, у интактных животных слабоподвижные сперматозоиды обнаруживаются до 120-ой минуты, а у подопытных – только до 60-ой минуты. Обращает на себя внимание, что на всех сроках наблюдения у подопытных животных содержание прогрессивноподвижных и слабоподвижных сперматозоидов снижено по сравнению с контролем.

Воздействие иммобилизационного стресса вызывает у подопытных крысят более выраженное угнетение содержания фертильной фракции сперматозоидов

Таблица 1. Динамика изменения доли прогрессивноподвижных сперматозоидов в контрольной и экспериментальных группах под влиянием иммобилизационного стресса, (%) ($M \pm m$)
Table 1. Dynamics of changes in the proportion of progressively motile spermatozoa in the control and experimental groups under the influence of immobilization stress, (%) ($M \pm m$)

Эксперим. группа Experimental group	Время исследования, мин Research time, min						
	1	15	30	45	60	90	120
К Control	52.3 ± 2.4	40.1 ± 0.8	25.5 ± 0.7	20.4 ± 1.6	5.42 ± 1.17	1.31 ± 0.27	–
К стресс Control-stress	33.6 ± 1.7^{x}	26.8 ± 0.9^{x}	5.1 ± 0.9^{x}	1.9 ± 0.3^{x}	–	–	–
О Experiment	42.6 ± 1.5^{xx}	26.3 ± 2.1^{xx}	9.4 ± 1.2^{xx}	5.6 ± 1.1^{xx}	–	–	–
О стресс Experiment-stress	16.2 ± 2.9^{x,xx}	5.5 ± 1.1^{x,xx}	–	–	–	–	–

Примечание. ^{x} – результаты статистически значимы между группами К и К стресс, О и О стресс ($p < 0.05$); ^{xx} – результаты статистически значимы между группами К и О, К и О стресс ($p < 0.05$).
^{x} – the results are statistically significant between groups Control and Control-stress, Experiment and Experiment-stress ($p < 0.05$); ^{xx} – the results are statistically significant between groups Control and Experiment, Control and Experiment-stress ($p < 0.05$).

Таблица 2. Динамика изменения доли слабоподвижных сперматозоидов в контрольной и экспериментальных группах под влиянием иммобилизационного стресса, (%) ($M \pm m$)
Table 2. The dynamics of changes in the proportion of weak motile sperm in the control and experimental groups under the influence of immobilization stress, (%) ($M \pm m$)

Эксперим. группа Experimental group	Время исследования, мин Research time, min						
	1	15	30	45	60	90	120
К Control	31.9 ± 2.0	37.6 ± 0.6	34.4 ± 1.1	25.7 ± 1.7	21.3 ± 1.2	2.0 ± 0.4	1.6 ± 0.3
К стресс Control-stress	31.7 ± 1.7	20.9 ± 0.7^{x}	13.0 ± 1.1^{x}	6.2 ± 0.8^{x}	–	–	–
О Experiment	29.3 ± 1.5	35.3 ± 0.8^{xx}	26.4 ± 0.9^{xx}	22.6 ± 1.5	4.0 ± 1.0^{xx}	–	–
О стресс Experiment-stress	20.1 ± 2.0^{x,xx}	9.2 ± 1.5^{x,xx}	1.8 ± 0.5^{x,xx}	–	–	–	–

Примечание. ^{x} – результаты статистически значимы между группами К и К стресс, О и О стресс ($p < 0.05$); ^{xx} – результаты статистически значимы между группами К и О, К и О стресс ($p < 0.05$).
^{x} – the results are statistically significant between groups Control and Control-stress, Experiment and Experiment-stress ($p < 0.05$); ^{xx} – the results are statistically significant between groups Control and Experiment, Control and Experiment-stress ($p < 0.05$).

как за счет прогрессивноподвижных, так и за счет слабоподвижных клеток. При этом, если у интактных животных сперматозоиды фертильной фракции обнаруживаются в суспензии до 60-ой минуты наблюдения, то у подопытных крысят – только до 30-ой минуты.

Нефертильную фракцию сперматозоидов представляют дергающиеся и неподвижные клетки, в контрольной группе они составляют 15.9 ±1.0% от общего числа сперматозоидов. У подопытных животных нефертильная фракция сперматозоидов составляет 28.1 ± 1.8%, что на 77.1% превышает таковую в контроле. Под влиянием иммобилизационного стресса у интактных крысят суммарное содержание половых клеток нефертильной фракции увеличивается в 2.18 раза и достигает уровня 34.7 ± 2.5%, у подопытных животных в 2.26 раза и составляет 63.7 ± 4.5%. У интактных животных,

Таблица 3. Динамика изменения доли дергающихся сперматозоидов в контрольной и экспериментальных группах под влиянием иммобилизационного стресса, (%) ($M \pm m$)
Table 3. The dynamics of changes in the proportion of twitching sperm in the control and experimental groups under the influence of immobilization stress, (%) ($M \pm m$)

Эксперим. группа Experimental group	Время исследования, мин Research time, min							
	1	15	30	45	60	90	120	150
К Control	11.9 ± 0.9	10.0 ± 0.6	14.6 ± 0.6	27.9 ± 1.4	24.2 ± 1.3	8.0 ± 1.0	7.4 ± 1.2	2.4 ± 0.6
К стресс Control-stress	15.8 ± 1.3^{x}	22.2 ± 0.5^{x}	37.7 ± 1.3^{x}	30.2 ± 1.3	7.1 ± 1.1^{x}	–	–	–
О Experiment	13.0 ± 1.8	21.5 ± 1.9^{xx}	26.7 ± 1.6^{xx}	27.7 ± 1.8	42.5 ± 1.5^{xx}	15.5 ± 2.3^{xx}	–	–
О стресс Experiment-stress	27.8 ± 1.8^{x,xx}	22.2 ± 1.5^{xx}	30.8 ± 1.6^{xx}	–	–	–	–	–

Примечание. ^{x} – результаты статистически значимы между группами К и К стресс, О и О стресс ($p < 0.05$); ^{xx} – результаты статистически значимы между группами К и О, К и О стресс ($p < 0.05$).
^{x} – the results are statistically significant between groups Control and Control-stress, Experiment and Experiment-stress ($p < 0.05$); ^{xx} – the results are statistically significant between groups Control and Experiment, Control and Experiment-stress ($p < 0.05$).

Таблица 4. Динамика изменения доли неподвижных сперматозоидов в контрольной и экспериментальных группах под влиянием иммобилизационного стресса, (%) ($M \pm m$)
Table 4. The dynamics of changes in the proportion of motionless sperm in the control and experimental groups under the influence of immobilization stress, (%) ($M \pm m$)

Эксперим. группа Experimental group	Время исследования, мин Research time, min								
	1	15	30	45	60	90	120	150	180
К Control	4.0 ± 0.6	12.3 ± 0.4	25.5 ± 0.9	25.9 ± 1.5	49.2 ± 1.6	88.7 ± 1.0	91.1 ± 1.2	97.6 ± 0.6	100.0
К стресс Control-stress	18.9 ± 1.7^{x},	30.1 ± 0.8^{x}	44.2 ±2.1^{x}	61.6 ± 1.4^{x}	92.9 ± 1.1^{x}	100.0^{x}	–	–	–
О Experiment	14.9 ± 1.2^{xx}	16.9 ± 0.9^{xx}	37.4 ± 1.6^{xx}	44.1 ± 1.5^{xx}	53.5 ± 1.5	84.5 ± 2.3	100.0^{x}	–	–
О стресс Experiment-stress	35.8 ± 3.1^{x,xx}	63.0 ± 2.4^{x,xx}	67.4 ± 1.8^{x,xx}	100.0^{x,xx}	–	–	–	–	–

Примечание. ^{x} – результаты статистически значимы между группами К и К стресс, О и О стресс ($p < 0.05$); ^{xx} – результаты статистически значимы между группами К и О, К и О стресс ($p < 0.05$).
^{x} – the results are statistically significant between groups Control and Control-stress, Experiment and Experiment-stress ($p < 0.05$); ^{xx} – the results are statistically significant between groups Control and Experiment, Control and Experiment-stress ($p < 0.05$).

подвергшихся иммобилизационному стрессу содержание нефертильных сперматозоидов (дергающихся и неподвижных) постепенно увеличивается и достигает максимального значения (100%) на 60-ой минуте наблюдения, а у подопытных крысят этот показатель уже на 45-ой минуте достигает 100% (табл. 3 и 4).

Нарушение соотношения фертильных и нефертильных половых клеток у экспериментальных животных интактной и опытной групп обусловило изменение индекса подвижности сперматозоидов, представляющего собой отношение суммарного числа прогрессивноподвижных и слабоподвижных к содержанию дергающихся и неподвижных половых клеток (рис. 1 и 2). Как видно из рисунков, индекс двигательной активности сперматозоидов у подопытных животных снижен на всех сроках наблюдения под влиянием стресса.

Кроме того, нами установлено, что у потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом имеет место снижение числа клеток Лейдига семенников и их субпопуляционного состава. В частности, показано, что если у интактных жи-

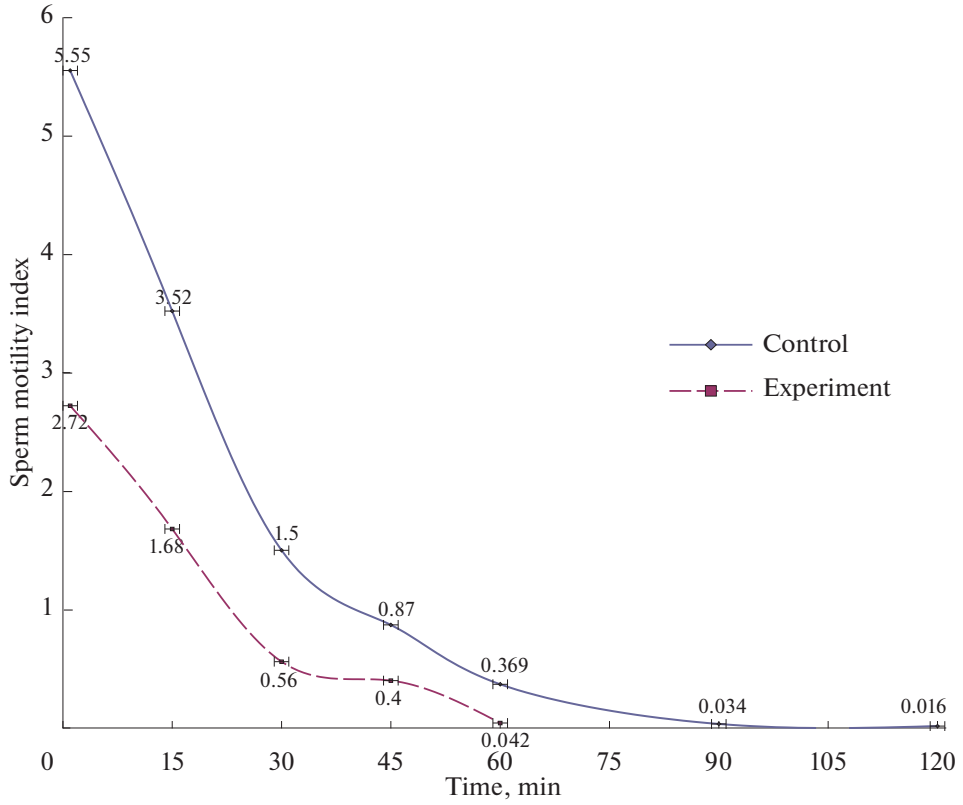

Рис. 1. Индекс двигательной активности сперматозоидов экспериментальных животных. Различия между группами достоверны ($p < 0.001$) во всех временных точках.

Fig. 1. Sperm motility index of the experimental animals. Differences between the groups are significant ($p < 0.001$) at all time points.

вотных содержание эндокриноцитов семенников составляет 31.76 ± 1.51, то у подопытных крысят этот показатель оказался равным всего 21.40 ± 1.25 ($p < 0.001$). При этом индекс активности клеток Лейдига, представляющий собой отношение числа активных эндокриноцитов к содержанию неактивных клеток, у интактных животных составил 5.26 ± 0.49 в то время как у подопытных животных исследуемый показатель оказался равным всего 2.35 ± 0.18 ($p < 0.001$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, анализ полученных результатов позволяет сделать заключение о снижении фертильности потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом, о чем свидетельствует как уменьшение суммарного числа сперматозоидов, в том числе их фертильной фракции, так и угнетение их двигательной активности. Вместе с тем, полученные данные указывают на снижение у подопытных животных от матерей с сахарным диабетом антистрессорной резистентности сперматогенеза.

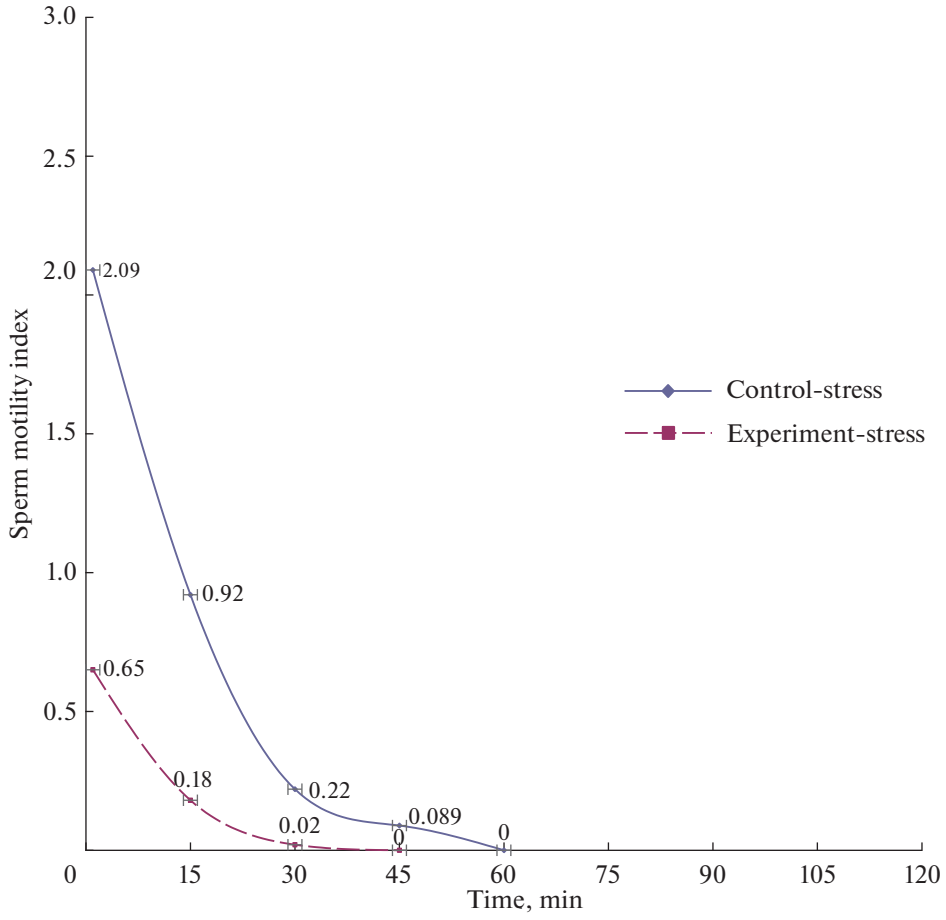

Рис. 2. Индекс двигательной активности сперматозоидов экспериментальных животных при действии иммобилизационного стресса. Различия между группами достоверны ($p < 0.001$) во всех временных точках.
Fig. 2. Sperm motility index in the experimental animals under the immobilization stress. The differences between the groups are significant ($p < 0.001$) at all time points.

В то же время известно, что клетки Лейдига являются основными структурными элементами, продуцирующими тестостерон, который затем диффундирует через базальную мембрану в клетки Сертоли [13, 15]. В клетках Сертоли тестостерон подвергается ароматизации и превращается в более активный дигидротестостерон, который затем поступает в просвет семенных извитых канальцев и участвует в регуляции сперматогенеза и спермиогенеза [16, 17]. Вместе с тем известно, что тестостеронпродуцирующая активность эндокриноцитов семенников угнетается под действием кортикостероидов [18, 19].

Анализируя полученные результаты, нужно учитывать, что одним из ведущих компонентом эндокринной системы является гипоталамо-гипофизарно-гонадная система, обеспечивающая контроль репродуктивной системы.

Так как сахарный диабет сопровождается развитием в организме гипергликемии и гиперкетонемии, то можно предположить, что в силу повышения проницаемо-

сти плаценты [20], глюкоза и кетоновые тела в избытке проникают в кровь плода. Избыточная концентрация сахара в крови обусловливает транзиторную гиперплазию бета-клеток островков Лангерганса плода и, как следствие, гиперинсулинизм плода, который, в конечном итоге, приводит к развитию гипогликемии, являющейся одним из наиболее серьезных осложнений антенатального развития. Вместе с тем, получены убедительные данные, свидетельствующие о том, что не только недостаток, но и избыток инсулина может приводить к нарушениям функционирования гипоталамических структур, секретирующих рилизинг фактор лютеинизирующего гормона (ЛГРФ), что в свою очередь обусловливает нарушение выработки лютеинизирующего гормона гипофиза, и, как следствие, приводит к снижению уровня андрогенов [21]. Интересно, что нарушения секреции ЛГРФ гипоталамическими структурами и лютеинизирующего гормона гипофизом выявлены у животных с гипогликемией, обусловленной введением инсулина [22, 23]. Так, P.N. Cates и K.T. Byrne в условиях эксперимента показали, что индуцированный инсулином гипогликемический стресс оказывает стимулирующее влияние на освобождение гипоталамусом гонадотропин-рилизинг-гормона и, как следствие, снижение пульсирующего освобождения лютеинизирующего гормона гипофизом [22].

Другим механизмом, обусловливающим снижение уровня ЛГРФ, лютеинизирующего гормона и тестостерона в условиях гипогликемии, является изменение активности гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы [21]. В частности, установлено, что кортиколиберин в условиях *in vitro* и *in vivo* ингибирует секрецию ЛГРФ [21]. Таким образом, активация гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы в условиях стресса, вызванного снижением уровня глюкозы, ведет к подавлению активности гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы.

Можно предположить, что при иммобилизационном стрессе создается высокий уровень концентрации кортикостероидов, что еще в большей степени угнетает секреторную активность клеток Лейдига, это, в конечном итоге, приводит к нарушению процесса сперматогенеза, наиболее выраженного у подопытных животных, и проявляющегося в снижении концентрации сперматозоидов и их двигательной активности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Боголюбов С.В., Витязева И.И., Макарова Н.П., Львова А.Г.* Клиническое ведение пациентов с тератозооспермией в циклах вспомогательных репродуктивных технологий. Доктор Ру. 6(50): 34–38. 2009. [*Bogolubov S.V., Vityazeva I.I., Makarova N.P., Lvova A.G.* Clinical management of teratozoospermic patients in infertility treatment with assisted reproductive technologies. Doctor Ru. 6(50): 34–38. 2009. (In Russ)].
2. *Кулаков В.И., Леонова Б.В., Кузьмичёва Л.Н.* Лечение женского и мужского бесплодия. Вспомогательные репродуктивные технологии. М. Мед. информац. агентство. 2005. [*Kulakov V.I., Leonova B.V., Kuz'micheva L.N.* Lechenie zhenskogo i muzhskogo besplodiya. Vspomogatel'nye reproduktivnye tekhnologii [Treatment of female and male infertility. Assisted reproductive technology]. Moscow. Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo. 2005.
3. *Сафина Н.Ю., Яманди Т.А., Черных В.Б., Акуленко Л.В., Боголюбов С.В., Витязева И.И., Рыжкова О.П., Степанова А.А., Адян Т.А., Близнец Е.А., Поляков А.В.* Генетические факторы мужского бесплодия, их сочетания и спермиологическая характеристика мужчин с нарушением фертильности. Андрология и генитальная хирургия. 19(2): 40–51. 2018. [*Safina N.Yu., Yamandi T.A., Chernykh V.B., Akulenko L.V., Bogolyubov S.V., Vityazeva I.I., Ryzhkova O.P., Stepanova A.A., Adyan T.A., Bliznets E.A., Polyakov A.V.* Genetic factors of male infertility, their combinations and the spermatological characteristics of men with fertility failures. Andrology and Genital Surgery. 19(2): 40–51. 2018. (In Russ)].
4. *Резников А.Г., Пишак В.П., Носенко Н.Д., Ткачук С.С., Мыслицкий В.Ф.* Пренатальный стресс и нейроэндокринная патология. Черновцы. Медакадемия. 2014. [*Reznikov A.G., Pishak V.P., Nosenko N.D., Tkachuk S.S., Myslitskiy V.F.* Prenatal'nyy stress i neyroendokrinnaya patologiya [Prenatal stress and neuroendocrine pathology]. Chernovtsy. Medakademiya. 2014.
5. *Бадалян Б.Ю., Сарксян Дж., Худовердян А.Д., Амбарцумян Г.Р., Сароян М.Ю., Худовердян Д.Н.* Пренатальный стресс – как фактор морфофункциональных нарушений цнс в пре- и постнатальном онтогенезе. Вопр. теоретич. клин. медицины. (9): 7–20. 2012. [*Badalyan B.Yu.,*

Sarksyan Dzh., Khudoverdyan A.D., Ambartsumyan G.R., Saroyan M.Yu., Khudoverdyan D.N. Prenatal stress as a factor in morphological and functional abnormalities of the Central nervous system in pre – and postnatal ontogenesis. Issues Theoret. Clin. Medicine. (9): 7–20. 2012.

6. *Дедов И.И., Шестакова М.В.* Сахарный диабет: острые и хронические осложнения. М. ООО "Издательство "Медицинское информационное агентство". 2011. [*Dedov I.I., Shestakova M.V.,* eds. Sakharnyy diabet: ostrye i khronicheskie oslozhneniya [Diabetes mellitus: acute and chronic complications]. Moscow. OOO "Izdatel'stvo "Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo". 2011.
7. *Jelodar G., Khaksar Z., Pourahmadi M.* Endocrine profile and testicular histomorphometry in adult rat offspring of diabetic mothers. J. Physiol. Sci. 59(5): 377–382. 2009. https://doi.org/10.1007/s12576-009-0045-7
8. *Amorim E.M., Damasceno D.C., Perobelli J.E., Spadotto R., Fernandez C.D., Volpato G.T., Kempinas W.D.* Short- and long-term reproductive effects of prenatal and lactational growth restriction caused by maternal diabetes in male rats. Reprod. Biol. Endocrinol. 9: 154. 2011. https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-154
9. *Закирьянов А.Р., Плахотний М.А., Онищенко Н.А., Володина А.В., Клименко Е.Д., Кобозева Л.П., Мичунская А.Б., Поздняков О.М.* Диабетические осложнения у крыс при длительных сроках моделирования сахарного диабета 1-го типа. Патол. физиол. эксперим. терапия. 4: 21–25. 2007. [*Zakirianov A.R., Plakhotny M.A., Onischenko N.A., Volodina A.V., Klimenko E.D., Kobozeva L.P., Michunskaya A.B., Pozdnyakov O.M.* Diabetic complications in rats in long-term modeling of type I diabetes mellitus. Patol. fiziologiya i eksperiment. terapiya. 4: 21–25. 2007. (In Russ)].
10. *Луцкий Д.Л., Николаев А.А.* Морфологическое исследование эякулята: методическое пособие. Астрахань. 1999. [*Lutskiy D.L., Nikolaev A.A.* Morfologicheskoe issledovanie eyakulyata [Morphological examination of ejaculate]: metodical instruction. Astrakhan'. 1999.
11. *Молнар Е.* Общая сперматология. Будапешт. 1969. [*Molnar E.* Obshchaya spermatologiya [The total spermatology]. Budapesht. 1969.
12. *Тиктинский О.Л.* Андрология. СПб.1999. [*Tiktinskiy O.L.* Andrologiya [Andrology]. Saint-Petersburg.1999.
13. *Шевлюк Н.Н., Стадников А.А.* Клетки Лейдига семенников позвоночных (онтогенез, ультраструктура, цитофизиология, факторы и механизмы регуляции). Оренбург. Изд-во ОрГМА. 2010. [*Shevlyuk N.N., Stadnikov A.A.* Kletki Leydiga semennikov pozvonochnykh (ontogenez, ul'trastruktura, tsitofiziologiya, faktory i mekhanizmy regulyatsii) [Leydig cells of vertebrate testes (ontogenesis, ultrastructure, cytophysiology, factors and mechanisms of regulation)]. Orenburg. Izdatel'stvo OrGMA. 2010.
14. *Лобанова Н.Н., Панушева Н.И., Белова Т.И.* Изменения содержания катехоламинов в структурах мозга крыс, перенесших иммобилизационный стресс. Бюл. эксперим. биологии и медицины. (11): 526–527. 1986. [*Lobanova N.N., Panusheva N.I., Belova T.I.* Changes in the content of catecholamines in the brain structures of rats undergoing immobilization stress. Bull. Exper. Biol. Med. (11): 526–527. 1986. (In Russ)].
15. *Alves M.G., Martins A.D., Cavaco J.E., Socorro S., Oliveira P.F.* Diabetes, insulin-mediated glucose metabolism and Sertoli/blood-testis barrier function. Tissue Barriers. 1(2): e23992. 2013.
16. *Hutson J.C., Stocco D.M., Campbell G.T., Wagoner J.* Sertoli cell function in diabetic, insulin-treated diabetic and semi-starved rats. Diabetes. 32(2): 112–116. 1983.
17. *Shinohara T., Orwig K.E., Avarbock M.R., Brinster R.L.* Restoration of Spermatogenesis in Infertile Mice by Sertoli Cell Transplantation. Biol. Reprod. 68(3): 1064–1071. 2003.
18. *Потемкина Т.Е., Кузнецова С.В., Ляляев В.А.* Изменение параметров семенной жидкости самцов белых крыс при различных видах экспериментального стресса. Совр. технологии в медицине. (2): 23–26. 2009. [*Potemkina T.E., Kuznetsova S.V., Lyalyaev V.A.* Alteration of the white rat male seminal fluid parameters at different types of experimental stress. Modern technologies in medicine. (2): 23–26. 2009. (In Russ)].
19. *Стадников А.А., Шевлюк Н.Н.* Морфофункциональная характеристика гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы крыс-самцов в условиях эмоционально-болевого стресса. Морфология. 110(5): 38–42. 1996. [*Stadnikov A.A., Shevlyuk N.N.* Morphological characteristics of hypothalamo-hypophyseal gonadal system in conditions of emotional pain stress. Morphology. 110(5): 38–42. 1996. (In Russ)].
20. *Капустин Р.В., Оноприйчук А.Р., Аржанова О.Н.* Патофизиология плаценты и плода при сахарном диабете. Журн. акушерства и женских болезней. 67(6): 79–92. 2018. [*Kapustin R.V., Onopriychuk A.R., Arzhanova O.N.* Pathophysiology of the placenta and fetus in diabetes mellitus. J. Obstetrics Women's diseases. 67(6): 79–92. 2018. (In Russ)]. https://doi.org/10.17816/JOWD67679-92
21. *Шпаков А.О.* Функциональное состояние гипотало-гипофизарно-гонадной системы при сахарном диабете. Пробл. эндокринол. 5: 23–29. 2010. [*Shpakov A.O.* Functional state of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in diabetes mellitus. Probl. Endocrinol. 5: 23–29. 2010. (In Russ)].
22. *Cates P.N., O Byrne R.T.* The area postrema mediates insulin hypoglycemia-induced suppression of pulsatile LH secretion in the female rat. Brain Res. 853: 151–155. 2000. https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)02301-x

23. *Chen M.D., Ordög T., O'Byrne K.T., Goldsmith J.R., Connaughton M.A., Knobil E.* The insulin hypoglycemia-induced inhibition of gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the rhesus monkey: roles of vasopressin and corticotropin-releasing factor. Endocrinology. 137(5): 2012–2021. 1996.
https://doi.org/10.1210/endo.137.5.8612542

Characterisation of Sperm Viability in the Offspring of Female Rats with Experimental Type 1 Diabetes under the Influence of Immobilization Stress

G. V. Bryukhin[a] and S. D. Antonov[a, *]

[a] *South-Ural State Medical University Russian Federation, Chelyabinsk, Russia*
**e-mail: s.d.antonov@mail.ru*

One of the main factors underlying the development of prenatal stress is maternal type 1 diabetes. Its influence on the formation of the male reproductive system of the offspring has not been well studied. Therefore, this study was aimed at the analysis of the spermatozoa motor activity characteristics in mature offspring of the mothers with experimental type 1 diabetes mellitus, subjected to the immobilization stress. The study was performed on white laboratory Wistar rats (females), in which the type 1 diabetes mellitus was inducted, and their mature offspring. Spermatozoa were obtained from the epididymis; their motility was taken into account when determining their content in a unit volume. In order to study the antistress resistance of sperm, the the experimental animals were subjected to a model of immobilization stress. We demonstrate that the sperm concentration is decreased in the offspring of female rats with experimental diabetes. This decrease also occurs in animals subjected to the immobilization stress, in both intact and experimental groups. The fertile to non-fertile germ cells ratio is also affected by the immobilization stress. We show that the number of Leydig cells and their activity index were reduced in experimental animals. Based on these results, we conclude that the fertility and antistress resistance of spermatogenesis are reduced in the offspring of the female rats with experimental diabetes mellitus. The hypothalamic-pituitary-gonadal system provides control of the reproductive system, primarily through testosterone, which is produced by the Leydig cells and is involved in the regulation of the spermatogenesis. The activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal system under hypoglycemia leads to the suppression of the hypothalamic-pituitary-gonadal system activity. We propose that the immobilization stress raises the corticosteroid levels, which further inhibits the secretory activity of the Leydig cells, leading to the disruption of the spermatogenesis and the decrease in sperm concentration and motor activity.

Keywords: diabetes, experiment, offspring, sperm, immobilization stress

ЦИТИРОВАТЬ:

Брюхин Г.В., Антонов С.Д. Характеристика жизнеспособности сперматозоидов у потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа при действии иммобилизационного стресса. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(1): 55–65.

DOI: 10.31857/S0869813920010033

TO CITE THIS ARTICLE:

Bryukhin G.V., Antonov S.D. Characterisation of Sperm Viability in the Offspring of Female Rats with Experimental Type 1 Diabetes under the Influence of Immobilization Stress. Russian Journal of Physiology. 106(1): 55–65.

DOI: 10.31857/S0869813920010033

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 1, с. 66–77

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ И ГОРМОНАЛЬНО-МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ САМОК КРЫС, СЕЛЕКЦИОНИРОВАННЫХ ПО ДЛИТЕЛЬНОСТИ ПАССИВНО-ОБОРОНИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ

© 2020 г. Т. А. Алехина[1, *], Н. А. Пальчикова[2, 3], Д. В. Клочков[1]

[1]Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

[2]Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск, Россия

[3]Новосибирский государственный университет экономики и управления, Новосибирск, Россия

*****E-mail: alek@bionet.nsc.ru*

Поступила в редакцию 08.04.2019 г.
После доработки 20.09.2019 г.
Принята к публикации 22.10.2019 г.

Работа выполнена на самках крыс линии ГК (**Г**енетическая **К**ататония), селекционированных по длительности пассивно-оборонительной реакции на слабый стимул. Поскольку ранее исследования проводились в основном на крысах-самцах, то целью настоящей работы стало описание поведенческих, гормонально-метаболических параметров и уровня фертильности у самок линии ГК и выделение особенностей эффектов синхронизации эстрального цикла у этих животных. Определяли стадию эстрального цикла при помощи анализа влагалищных мазков. Регистрировали в ходовом колесе число оборотов колеса, актов раскачивания, общую двигательную активность (сумму пробежек, поворотов, умываний, стоек, нахождений на центральном стержне внутри колеса), а также уровень возбудимости по реакции на звуковой раздражитель. Измеряли уровни прогестерона, эстрадиола, холестерина и триглицеридов в плазме крови. В результате исследования подтвержден пассивный тип реагирования и повышенный уровень возбудимости у самок крыс линии ГК. Установлены более низкая рождаемость и более низкая масса тела у крыс-кататоников по сравнению с крысами Вистар. Определен более высокий уровень прогестерона в проэструсе у самок линии ГК. Показана сниженная концентрация триглицеридов у самок-кататоников на том же уровне, что и у самцов. Установлен повышенный уровень прогестерона в общей группе Вистар и ГК на стадии синхронизированного эстрального цикла по сравнению с несинхронизированной фазой. Полученные результаты продемонстрировали, что селекция на длительность пассивно-оборонительного реакции у самок крыс линии ГК ассоциирована с усиленными реакциями умеренного стрессирования, изменением гормонального и метаболического профиля и сниженной фертильностью этих животных.

Ключевые слова: модель кататонии, синхронизация эстрального цикла, прогестерон, триглицериды, фертильность

DOI: 10.31857/S0869813920010021

Фенотипирование признаков является первым и необходимым этапом для выяснения механизмов патогенеза на животных моделях. Фенотипические характеристики включают не только поведенческие признаки, но и маркеры гормональ-

Рис. 1. Крысы ГК в каталептическом ступоре.

Fig. 1. GC rats in cataleptic stupor.

ных и метаболических процессов. Сформировавшиеся наследственные свойства в ходе селекции, например, такие как половые особенности функционирования также относятся к фенотипическим характеристикам. Фенотипирование на крысах линии ГК (от **Г**енетическая **К**ататония), селекционированных по длительности пассивно-оборонительной реакции (застывание в неудобной позе) (рис. 1), проводилось в основном на самцах. Проявившиеся у них в результате селекции такого рода особенности поведения, как нарушение латентного торможения и снижение престимульного ингибирования [1, 2], являются специфическими для моделирования шизофреноподобных патологий у грызунов [3–5]. Накоплены данные по коморбидным признакам у крыс линии ГК как модели депрессивного расстройства [6].

В последних 30 поколениях направленной селекции крысы линии ГК демонстрируют два кататонических полюса реагирования на тестовые стимулы: негативный (застывание, пассивность), и позитивный (высокая возбудимость и неврозоподобные реакции) [7]. По негативному полюсу вектор изменения поведения и уровня стероидных гормонов у крыс линии ГК [8] сходен с таковыми у мышей линии ASC (antidepressant sensitive catalepsy), селекционированных на проявление щипковой каталепсии [9, 10]. Признаки позитивного полюса, проявляющиеся у особей линии ГК [7], продемонстрированы на линиях крыс HAB (high anxiety behavior) [11], у крыс FSL с депрессивноподобными наклонностями [5] и на линиях с низким порогом возбудимости НП1, НП2 [12, 13].

К настоящему времени показано, что существует взаимосвязь между уровнем общей возбудимости и специфической половой активацией [14–17]. У самок крыс линии ГК часто возникает состояние синхронизации фаз эструса при групповом содержании этих животных [18]. Синхронизация функций является объективным критерием состояния функциональных систем различного уровня в организме [19]. Большинство фенотипических исследований проводилось на самцах линии ГК, не учитывалось влияния на фенотипические проявления состояния фаз эстрального

цикла у самок этой линии. Однако известно, что существуют ассоциации между стадиями эстральной цикличности и поведенческими и гормональными характеристиками у самок лабораторных грызунов [15–17]. Показано также, что нарушения функционирования в половой системе на моделях с пассивным типом поведения может привести к снижению уровня рождаемости потомства [20].

Целью настоящей работы было охарактеризовать самок крыс линии ГК по поведенческим, гормонально-метаболическим параметрам и по уровню фертильности, а также выявить особенности механизмов синхронизации эстрального цикла у этих животных.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на самках крыс линий ГК (n = 24) и Вистар (n = 27), содержащихся группами по 5–7 особей в виварии Института цитологии и генетики СО РАН при свободном доступе к воде и корму. Кроме того, были взяты данные по рождаемости у 40 пометов крыс линий Вистар и ГК, и в дальнейшем приведены показатели массы тела этих животных. Условия содержания и протоколы работы с животными утверждены Комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН, все процедуры проводили в соответствии с рекомендациями Европейского парламента и Совета Европейского Союза (директива 2010/63/EU от 22 сентября 2010 г.).

Тест колесо. На I стадии исследовали крыс в тесте колесо без взятия мазков (см. схему опыта). Используемое устройство в форме ходового колеса было заказано в мастерских ИЦиГ СО РАН. Диаметр колеса – 35 см, ширина “дорожки” – 10 см, боковые стенки сделаны из оргстекла. Животное помещали внутрь устройства, где крыса двигалась по дорожке, состоящей из стальных стержней. Регистрировали в течение 5 мин следующие показатели: полное число оборотов, акты раскачивания и уровень общей двигательной активности (пробежка внутри колеса, повороты, умывание, стойки, нахождение на центральном стержне, акты раскачивания). Через 4 мин тестирования подавался звуковой сигнал (90 дБ, 60 Гц, 2 с), фиксировали реакцию по балльной системе: 0 – нет никакой реакции, 1 – застывание, 2 – двигательные побежки. Отмечали количество болюсов за 5 мин.

Схема опыта:

I		II		III
Тест Колесо без взятия мазков	$\Longrightarrow$	Взятие мазков в течение 1 месяца, тест Колесо	$\overset{\text{Через 2 недели}}{\Longrightarrow}$	Взятие мазков забор крови
14 ч		8 ч, 14 ч		8 ч, 14 ч

На II стадии исследовали фазы эстральной цикличности при групповом содержании животных путем анализа влагалищных мазков у самок-крыс ГК и Вистар, начиная с двухмесячного возраста [22].

На III стадии после взятия мазков анализировали содержание гормонов и метаболитов в плазме крови на разных стадиях синхронизированного и несинхронизированного эстрального цикла в группах крыс Вистар и ГК.

Определение содержания гормонов и метаболитов. Крыс декапитировали при помощи гильотины в день определения фазы эструса. Периферическую кровь собирали в пробирку, содержащую в качестве антикоагулянта ЭДТА. Кровь центрифугировали 20 мин при 3000 об/мин и 4°С, плазму хранили при –40°С.

Уровни эстрадиола (нмоль/л) и прогестерона (нмоль/л) измеряли иммуноферментным методом с использование наборов “ЭСТРАДИОЛ-ИФА” и “ПРОГЕСТЕРОН-ИФА”

Таблица 1. Показатели поведенческих реакций в тесте Колесо у крыс Вистар и ГК
Table 1. Rates of behavioral reactions in the test Wheel in Wistar and GC rats

	Вистар (27) Wistar (27)	ГК (24) GC (24)	Вероятность различий Probability of the differences
Раскачивание (*n*) Rocking (*n*)	16.5 ± 5.4	2.7 ± 2.7	$p < 0.001$
Общая активность Overall activity (*n*)	31.3 ± 4.7	17.0 ± 3.2	$p < 0.05$
Реакция на звонок (баллы) Reaction on bell (scores)	1.1 ± 0.2	2.2 ± 0.2	$p < 0.05$
Дефекация (число болюсов) Defecation (number of boluses)	0.7 ± 0.2	2.0 ± 0.6	$p < 0.05$

n – количество поведенческих актов. Вероятность различий в LSD post hoc тесте между Вистар и ГК.
n – number of behavioral acts. Probability of the differences in LSD post hoc test between Wistar and GC.

("ХЕМА", Москва) по прилагаемым инструкциям. Диапазон определения концентраций: 0–20 нмоль/л для эстрадиола и 0–300 нмоль/л для прогестерона; чувствительность – 0.025 и 0.25 нмоль/л соответственно. Измерение проводили на микропланшетном иммуноферментном анализаторе "ImmunoChem 2100". Содержание триглицеридов (ммоль/л) и холестерина (ммоль/л) в плазме крови определяли ферментативным колориметрическим методом с использованием наборов "FLUTEST CHOL" и "FLUTEST TG" (Biocon, Германия) по прилагаемым инструкциям. Диапазон определения концентраций: 0.08–20.7 ммоль/л для холестерина и 0.11–22.6 ммоль/л для триглицеридов; аналитическая чувствительность – 0.08 и 0.004 моль/л соответственно. Измерения проводили на спектрофотометре СФ-2000. Оборудование ЦКП "Современные оптические системы" ФИЦ ФТМ.

Статистическую обработку проводили с использованием пакета программ "Stastistica 10.0". Для каждого параметра вычислялось среднее арифметическое (*M*) и ошибка среднего (±*m*). Различия считались достоверными на уровне значимости $p < 0.05$ и выше. При сравнении фенотипических признаков использовали однофакторный дисперсионный анализ, в качестве апостериорного критерия применяли LSD-тест.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Тест колесо. К двигательным реакциям отнесли показатель "число раскачиваний" (табл. 1). Крыса цепляется за прутья дорожки и мышечными усилиями заставляет раскачиваться колесо. Значение этого показателя у крыс Вистар в несколько раз больше, чем у ГК. Другой параметр – общая активность, включает число всех двигательных реакций за 5 мин тестирования: акты раскачивания, пробежки внутри колеса, повороты, умывание, стойки, залезание на центральный стержень. По величине этого показателя крысы Вистар также опережают крыс ГК. Таким образом, самки Вистар более активны по сравнению с самками ГК (табл. 1).

Самки линии ГК показали повышенную реакцию на звонок (маркер стрессовой реактивности), более высокий уровень дефекации (маркер эмоциональности) (табл. 1) и более низкую массу тела (табл. 2). По этим параметрам вырисовывается картина невротизированного животного. Кроме того, самки ГК по количеству детенышей в помете (маркер фертильности) уступают место крысам Вистар, что сочетается с состоянием животных, находящихся в состоянии умеренного стресса (табл. 2).

Установлено, что по числу полных оборотов колеса синхронизированные по эструсу самки линии Вистар превосходят более чем в 2 раза несинхронизирован-

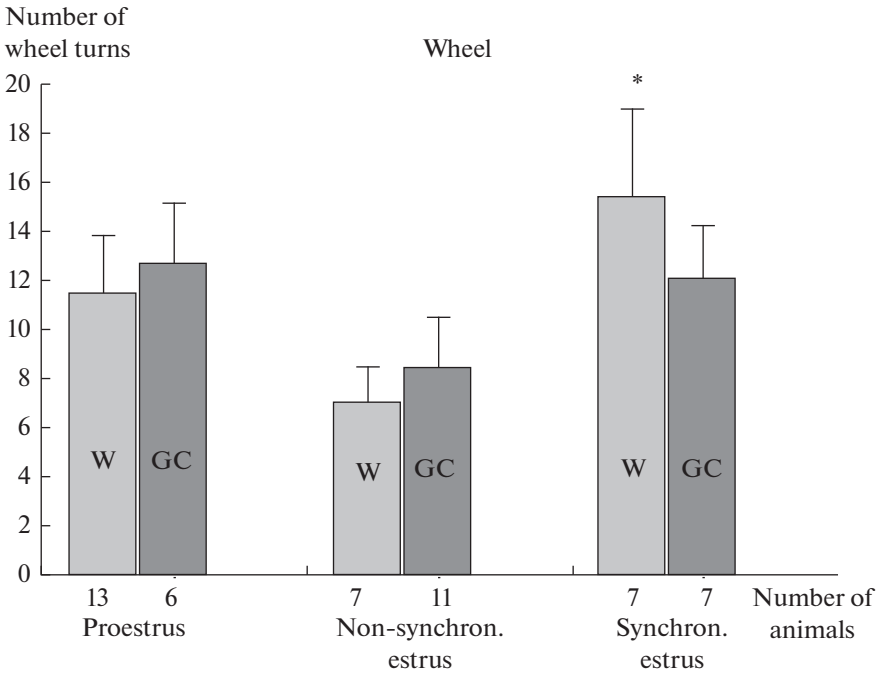

Рис. 2. Число оборотов колеса на разных стадиях эстрального цикла. * – $p < 0.05$ различия в LSD post hoc тесте между синхронизированным и несинхронизированным эструсом в группах Вистар.
Fig. 2. Number of the wheel turns at different stages of the estrous cycle. * – $p < 0.05$ differences in the LSD post hoc test between synchronized and non-synchronized estrus in Wistar groups.

ных самок этой же линии. У крыс ГК отмечена тенденция к повышению этого показателя на 31% (рис. 2).

Концентрация основного липида в плазме крови – холестерина – общего предшественника стероидных гормонов, в частности, таких как прогестерон и эстрадиол, не различалась у крыс обеих линий (рис. 3).

Однако по содержанию другого липида – уровню триглицеридов в плазме крови обнаружены различия у самок двух линий (рис. 3): у крыс линии ГК величина этого показателя в 2 раза ниже, чем у крыс Вистар во всех исследуемых фазах – проэструс, синхронизированный и несинхронизированный эструс.

Таблица 2. Масса тела и рождаемость у крыс Вистар и ГК
Table 2. Body weight and fertility in Wistar and GC rats

	Вистар (20 пометов) Wistar (20 litters)	ГК (20 пометов) GC (20 litters)	Вероятность различий Probability of the differences
Масса тела в 3-месячном возрасте (г) Body weight at 3 months of age (g)	264.5 ± 4.0	204.0 ± 3.3	$p < 0.001$
Рождаемость в помете (*n*) Fertility (*n*)	10.4 ± 0.6	7.6 ± 0.5	$p < 0.001$

n – количество потомков. Вероятность различий в LSD post hoc тесте между Вистар и ГК.
n – number of offspring. Probability of the differences in LSD post hoc test between Wistar and GC rats.

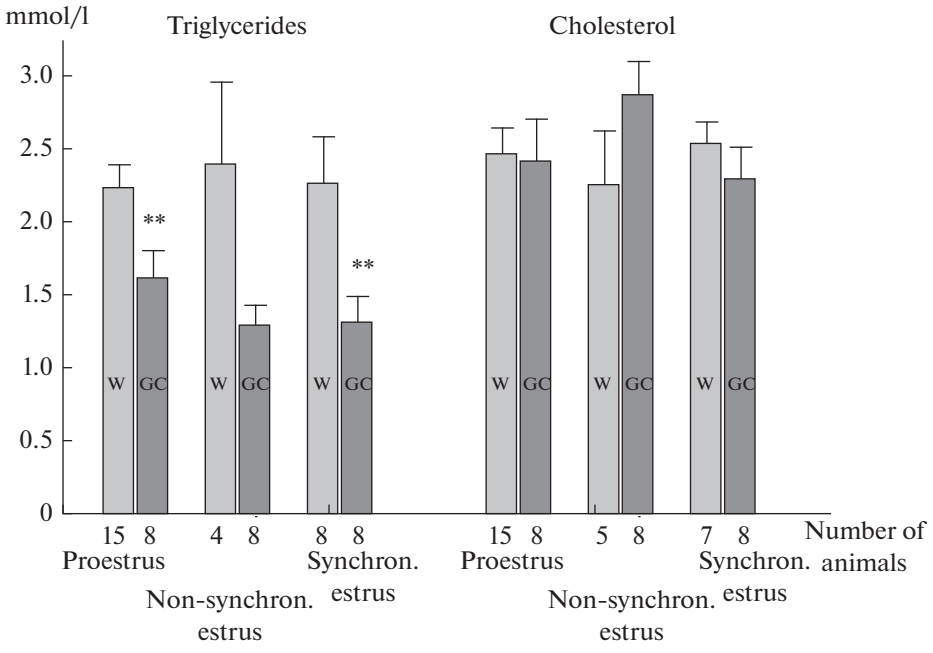

Рис. 3. Уровни триглицеридов и холестерина на разных стадиях эстрального цикла. ** – $p < 0.01$ различия в LSD post hoc тесте между Вистар и ГК.

Fig. 3. Triglycerides and cholesterol levels at different stages of the estrous cycle. ** – $p < 0.01$ differences in the LSD post hoc test between Wistar and GC.

Не обнаружено межлинейных различий в концентрации эстрадиола в плазме крови – гормона, регулирующего эстральный цикл (рис. 4). Однако выявлены различия по содержанию прогестерона в плазме крови в фазе проэструс у самок крыс линий Вистар и ГК (рис. 4). Уровень этого гормона у особей ГК выше более чем в 3 раза по сравнению с исходной линией.

Дисперсионный анализ выявил влияние фактора синхронизации в линиях Вистар и ГК: $F_{1,29} = 6.2$; $p < 0.02$. Этот факт демонстрирует повышение уровня прогестерона на стадии синхронизации эструса в группах обеих линий по сравнению с несинхронизированной фазой.

Таким образом, в настоящей работе описаны фенотипические характеристики у самок линий Вистар и ГК, которые различают и объединяют их по ряду параметров. У крыс ГК снижена двигательная активность и повышена реакция на звуковой раздражитель в ходовом колесе. У крыс Вистар выявлено большее число оборотов колеса на стадии синхронизированного эструса по сравнению с несинхронизированной фазой. По уровню холестерина и эстрадиола в плазме крови не было обнаружено межлинейных различий. Однако по содержанию триглицеридов обнаружено значительное снижение этого липида у самок линии ГК. При сравнении уровней прогестерона в фазе проэструса показан повышенный уровень этого гормона у самок-кататоников в отличие от самок Вистар. Выявлена сниженная фертильность у крыс линии ГК. В общей группе самок Вистар и ГК содержание прогестерона на стадии синхронизированного эструса было достоверно выше, чем на стадии несинхронизированного эструса.

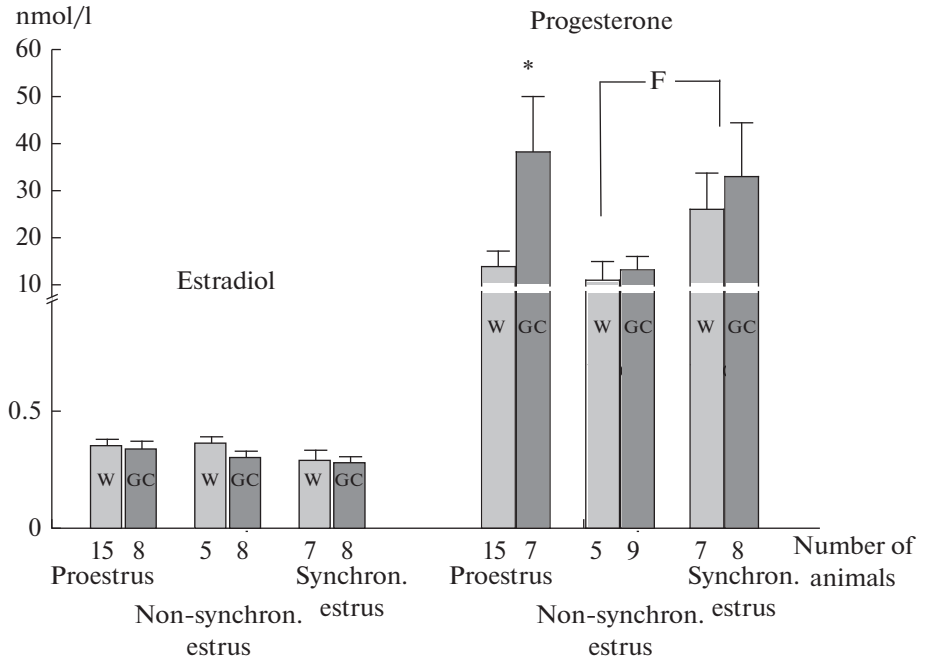

Рис. 4. Уровни эстрадиола и прогестерона на разных стадиях эстрального цикла. * – $p < 0.05$ различия в LSD post hoc тесте между группами Вистар и ГК. $F_{1,29} = 6.2$; $p < 0.02$ между общими группами Вистар и ГК, различающимися по степени синхронизации.

Fig. 4. Estradiol and progesterone levels at different stages of the estrous cycle. * – ($p < 0.05$) differences in the LSD post hoc test between the Wistar and GK groups. $F_{1,29} = 6.2$; $p < 0.02$ between the general Wistar and GC groups, differences in the degree of synchronization.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Поведенческие реакции в ходовом колесе содержат элементы защитного поведения, реактивности, агрессивности по отношению к человеку и тревожноподобные признаки [21] и в сумме свидетельствуют о пассивном типе поведения у самок-кататоников линии ГК.

Известно, что крысы-самцы ГК с пассивным поведением отличались от крыс исходной линии Вистар и высоковозбудимых крыс линии ГК промежуточной позицией по ряду фенотипических параметров. Пассивные особи заняли среднее положение по времени застывания в светло-темной камере, по уровню моноаминов в мозге и по содержанию норадреналина в надпочечниках [22]. Приведенные факты указывают на нейрогормональную основу пассивного поведения, что согласуется с работой Д.А. Жукова и соавт. [23], в которой у крыс с пассивной стратегией приспособления был установлен средний, а не низший социальный ранг. Тип наследования у самцов и самок линии ГК, проанализированный путем менделевского скрещивания, оказался доминантным с неполной пенетрантностью по признаку пассивно-оборонительных реакций [24]. Такое же доминантное (или не полностью доминантное) наследование было установлено у 300 собак разных пород с пассивной формой реагирования [25]. Доминирование пассивных признаков подтверждает их адаптивное значение.

Помимо сниженной двигательной активности в ходовом колесе у самок линии ГК на всех исследуемых стадиях полового цикла выявлен более низкий уровень триглицеридов в плазме крови, как это было ранее установлено у самцов той же линии [26]. Последний факт указывает на более низкий энергетический потенциал у особей обоих полов, от которого может зависеть и более низкая двигательная активность, и более низкая масса тела у крыс-кататоников. Сведения об участии в метаболизме триглицеридов при формировании энергетического баланса, как у животных, так и у человека опубликованы в обзорах [27, 28].

Ранее нами было выдвинуто предположение о единстве генетического ядра застывающих и высоковозбудимых крыс линии ГК [29]. У животных-самцов в неврозоподобном состоянии показано повышение уровня кортикостерона, сниженное содержание норадреналина в надпочечниках и более высокая масса надпочечников [26], как и у линейных крыс с повышенным уровнем тревожности [11]. У самок ГК при взятии у них мазков мы неоднократно наблюдали высокую прыгучесть. Такое поведение в англоязычной литературе называют “jumping and/or impulsive”, т.е. прыгающие и/или импульсивные животные [30, 31]. По полученным в этой работе результатам был продемонстрирован повышенный уровень возбудимости на звуковой раздражитель у самок ГК в ходовом колесе. Вышеописанные признаки указывают на более высокую восприимчивость к действию умеренного стресса (взятие мазков, пересаживание в другую клетку, перенос в незнакомую установку) [20, 23, 32].

В то же время повышение активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы у самок кататонической линии может спровоцировать подъем уровня прогестерона. В литературе мы находим факты об однотипном изменении синтеза кортикостерона и прогестерона в состоянии стресса, вызванном предъявлением запаха меха кота, различающимся у крыс с активной и пассивной стратегией поведения [33]. Особи с пассивной стратегией значительно сильнее реагировали на стрессор поднятием уровня кортикостерона и прогестерона в плазме крови. Эти данные указывают на то, что несмотря на застывание около пугающего стимула – кошачьей шерсти, состояние стресса длилось гораздо дольше, что говорит о более продолжительной защитной реакции у животных с пассивным типом поведения. Повышение уровней двух вышеуказанных гормонов при стрессе подтверждено и на людях. Высказано предположение, что нарушение функционирования в прогестероновой системе может привести к крайне пассивному состоянию у человека – симптомам депрессии [34].

В группе самок ГК, в которую отбирались крысы по пассивной реакции застывания, проявились различия в содержании прогестерона в проэструсе. Уровень этого гормона оказался в 3 раза выше, чем у самок Вистар. Важно отметить, что ранее было выявлено у самок линии ГК снижение большинства типов фолликул на стадии проэструса – подготовительной фазы к имплантации яйцеклетки, свидетельствующее о нарушении протекания у них фолликулогенеза [35]. Можно, по-видимому, рассматривать повышение содержания прогестерона как компенсаторную реакцию на этой стадии.

Аналогичные данные о повышенном уровне прогестерона в крови были получены у самок крыс с пассивной формой приспособления – в линии KLA [33]. Авторы расценили полученные результаты на самках KLA, сочетающиеся с низкой фертильностью у этих животных как фактор снижения вероятности наступления беременности в результате хронического умеренного стресса [20, 32]. По-видимому, одной из причин снижения фертильности у самок крыс линии ГК стала повышенная восприимчивость к действию умеренного стресса, нарушение протекания фолликулогенеза у самок [35] и низкое число и сниженная подвижность сперматозоидов у самцов [36].

В последнее время стали накапливаться данные о влиянии прогестерона и его предшественника аллопрегнанолона, связанных с тормозным ГАМК-рецепторным комплексом, на состояние пассивности и депрессии у людей и животных [37–39]. При этом на большом количестве работ документировано, что основной функцией этого гормона является подготовка к имплантации яйцеклетки в слизистую оболочку матки [40]. Такую двойную роль прогестерона можно ассоциировать с пассивным типом поведения у самок-крыс линии ГК, как это было показано на крысах линии KLA [25, 42].

В последнее время в литературе опубликованы немногочисленные данные о существовании или несуществовании синхронизации эстральной цикличности у грызунов [18, 41, 42]. Наши результаты подтверждают существование эффектов синхронизации фаз эструса у самок крыс вида *Rattus norvegicus*. Этот эффект проявляется в группах особей, находящихся в непосредственной близости друг от друга, что позволяет максимально сократить длительность периода размножения для подготовки генитального эпителия и приводит к повышению уровня общего центрального возбуждения. Феномен синхронизации в общей группе Вистар и ГК проявился в повышении значений уровня прогестерона на стадии синхронизированного эструса по сравнению с несинхронизированными фазами, что указывает на общий признак, характерный для крыс вида *Rattus norvegicus*.

Таким образом, в настоящей работе описаны фенотипические характеристики у самок крыс линии ГК, прошедшие длительный период отбора на пассивный тип реагирования. Такой тип ответа сочетается с двукратным падением уровня триглицеридов в плазме крови и с более низкой массой тела этих животных. Помимо этого, продемонстрированы повышенная восприимчивость к умеренному стрессу и повышенный уровень прогестерона, который вместе с другими наследственными факторами приводит к снижению рождаемости у животных кататонической линии.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 17-04-01631) и Бюджетной программы № 0324-2019-0041 с использованием оборудования ЦКП от Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0015).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Alekhina T.A., Ryazanova M.A., Ukolova T.N., Sakharov D.G., Chugui V.F., Prokudina O.I.* Neurohormonal changes during formation of latent inhibition in rats predisposed to catalepsy. Neurochem J. 2(3): 183–187. 2008.
2. *Рязанова М.А., Прокудина О.И., Плеканчук В.С., Алехина Т.А.* Экспрессия генов системы катехоламинов в среднем мозге и реакция престимульного торможения у крыс с генетической кататонией. Вавиловский журн генетики и селекции. 21(7): 798–803. 2017. [*Ryazanova M.A., Prokudina O.I., Plekanchuk V.S., Alekhina T.A.* Expression of catecholamine system genes in the midbrain and prepulse inhibition reaction in rats with genetic catatonia. Vavilovskii Zhurn Genetiki i Selektsii. 21(7): 798–803.
https://doi.org/10/18699/VJ17.296. 2017. (In Russ.)].
3. *Lipina T.V., Rasquinha R., Roder J.* Parametric and pharmacological modulations of latent inhibition in mouse inbred strains. Pharmacol. Biochem. Behaviour. 100(2): 244–252. 2011.
4. *Kloet E.R., Jolls M., Holsboer F.* Stress and the brain: from adaptation to disease. Neuroscience. 6: 463–475. 2005.
5. *Wegener G., Mathe A.A., Neumann I.D.* Selectively bred rodents as models of depression and anxiety. Curr. Topics Behav. Neurosci. 2012. 139–187.
https://doi.org/10.1007/7854_2011_192
6. *Kulikov A.V., Kolpakov V.G., Popova N.K.* The genetic cataleptic (GC) rat strain as a model of depressive disorders. In: Animal models in biological psychiatry. Ed. *A.V. Kalueff*. Nova Science Publ. 59–73. 2006.
7. *Рязанова М.А., Игонина Т.Н., Алехина Т.А., Прокудина О.И.* Увеличение доли “нервных” животных в ходе селекции на кататонию: участие в кататонических реакциях центральных адренорецепторов. Генетика. 48(11): 1141–1147. 2012. [*Ryazanova M.A., Igonina T.N.,*

Alekhina T.A., Prokudina O.I. The increase in the proportion of nervous animals bred for catatonia: the participation of central adrenoreceptors in catatonic reactions. Genetika. 48(11): 1141–1147. 2012. (In Russ)].

8. *Шульга В.А., Барыкина Н.Н., Алехина Т.А., Колпаков В.Г.* Некоторые физиологические характеристики генетической предрасположенности к каталепсии у крыс в зависимости от стадии селекции. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 82(10–11): 77–83. 1996. [*Shulga V.A., Barykina N.N., Alekhina T.A., Kolpakov V.G.* Some physiological characteristics of genetic predisposition of rats to catalepsy. Russ. J. Physiol. 82(10–11): 77–83. 1996. (In Russ)].
9. *Базовкина Д.В., Куликов А.В., Кондаурова Е.М., Попова Н.К.* Селекция на предрасположенность к каталепсии усиливает депрессивноподобное поведение у мышей. Генетика. 41(9): 1–6. 2005. [*Bazovkina D.V., Kulikova A.V., Kondaurova E.M., Popova N.K.* Selection for the predisposition to catalepsy enhances depressive-like traits in mice. Genetika. 41(9): 1–6. 2005. (In Russ)].
10. *Tikhonova M.A., Kulikov A.V., Bazovkina D.V., Kulikova E.A., Tsybko A.S., Bazhenova E.Yu., Naumenko V.S., Akulov A.E., Moshkin M.P., Popova N.K.* Hereditary catalepsy in mice is associated with the brain dysmorphology and altered stress response. Behav. Brain Res. 243: 53–60. 2013.
https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.12.057
11. *Salome N., Vitart O., Lesage J., Landgraf R., Vieau D., Laborie C.* Altered hypothalamo-pituitary-adrenal and sympatho-adrenomedullary activities in rats bred for anxiety: central and peripheral correlates. Psychoneuroendocrinology. 31: 724–735. DOI: 2006.02.002
https://doi.org/10.1016/j.psyneuen
12. *Ордян Н.Э., Вайдо А.И., Ракицкая В.В., Ширяева Н.В., Проймина Ф.И., Лопатина Н.Г., Шаляпина В.Г.* Функционирование гипофизарно-адренокортикальной системы у крыс, селекционированных по порогу чувствительности к электрическому току. Бюл. экспер. биол. мед. 125(4): 443–445. 1998. [*Ordian N.E., Vaydo A.I., Rakitskaia V.V., Shiriaeva N.V., Proimina F.I., Lopatina N.G., Shalyapina V.G.* Functioning of the hypophyseal-adrenocortical system in rats selected for the sensitivity threshold to the electric current. Bull. Eksper. Biol. Med. 125(4): 443–5. 1998. (In Russ)].
13. *Vaydo A.I., Shiryaeva N.V., Lopatina N.G.* Divergent responses to long-term stressors in rat lines selected for different functional states of the nervous system. Behavior Genetics. 23(5): 499–503. 1993.
14. *Schober J., Weil Z., Pfaff D.* How generalized CNS arousal strengthens sexual arousal (and vice versa). Hormones Behav. 59: 689–695.
https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.10.005
15. *Сашков В.А., Сельверова Н.Б., Моренков Э.Д., Ермакова И.В., Бурая Т.И.* Взаимосвязь уровня нейроактивных стероидов в мозге, поведения и тревожности у созревающих и половозрелых самок крыс в течение эстрального цикла. Нейрохимия. 26(1): 42–50. 2009. [*Sashkov V.A., Sel'verova N.B., Morenkov E.D., Ermakova I.V.* Neuroactive steroids in the brain and age and sex specificity of behavior and anxiety: an experimental study. Neurochemistry. 26(1): 42–50. 2009. (In Russ)].
16. *Devidze N., Lee A.W., Zhou J., Pfaff D.W.* CNS arousal mechanisms bearing on sex and other biologically regulated behaviors. Physiol. Behav. 88: 283–293. 2006.
https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.05.030
17. *Oyola M.G., Handa R.G.* Hypothalamic-pituitary-adrenal and hypothalamic-pituitary-gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. Stress. 20(5): 476–494.
https://doi.org/10.1080/10253890.2017.1369523
18. *Клочков Д.В., Алехина Т.А.* Селекция на усиление кататонической реактивности крыс, половая функция и синхронизация эстральной цикличности. Вавиловский журн генетики и селекции. 16(4/2): 1025–1031. 2012. [*Klochkov D.V., Alekhina T.A.* Selection for catatonia: effect on the sexual function and estrous cycle synchronization. Vavilovskii Zhurn. Genetiki i Selektsii. 16(4/2): 1025–1031. 2012. (In Russ)].
19. *Судаков К.В.* Временная синхронизация функций – объективный критерий функциональных систем различного уровня организации. Журн. высш. нерв. деят. им. И.П. Павлова. 36(4): 638–646. 1986. [*Sudakov K.V.* Temporal synchronization of functions–objective criterion for functional systems with different levels of organization. Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. Im. I.P. Pavlova. 36(4): 638–646. 1986. (In Russ)].
20. *Виноградова Е.П., Чаадаева Е.В., Жуков Д.А.* Нарушение репродуктивной функции у крыс, генетически селектированных по способности к активному избеганию. Журн. высш. нерв. деят. им. И.П. Павлова. 44(6): 1134–1136. 1994. [*Vinogradova E.P., Chaadaeva E.V., Zhukov D.A.* Disordered reproductive function in rats genetically selected for their capacity for active avoidance. Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. Im. I.P. Pavlova. 44(6): 1134–1136. 1994. (In Russ)].
21. *Novak C.M., Burghardt P.R., Levine J.A.* The use of a running wheel to measure activity in rodents: relationship to energy balance, general activity and reward. Neurosci. Biobehav. Rev. 36(3): 1001–1014.
https://doi.org/10.1016/j.neuboirev.2011.12.012

22. *Алехина Т.А., Барыкина Н.Н., Петренко О.И., Чугуй В.Ф., Колпаков В.Г.* О "патоморфозе" каталептической реакции у крыс. Журн. эволюц. биохим. физиол. 41(6): 536–540. 2005. [*Alekhina T.A., Barykina N.N., Petrenko O.I., Chugui V.F., Kolpakov V.G.* Pathomorphosis of cataleptic reactions in rats. Zh. Evol. Biokhim. Fiziol. 41(6): 534–538. 2005. (In Russ)].
23. *Жуков Д.А., Вековищева О.Ю., Виноградова Е.П.* Крысы с пассивной стратегией приспособления обладают средним, а не низшим рангом. Журн. высш. нерв. деят. им. И.П. Павлова. 52(2): 175–182. 2002. [*Zhukov D.A., Vekovishcheva O.Iu., Vinogradova E.P.* Rats with passive coping strategy have average, but not low social range. Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. Im. I.P. Pavlova. 52(2): 175–82. 2002. (In Russ)].
24. *Колпаков В.Г., Барыкина Н.Н., Чугуй В.Ф., Алехина Т.А.* Взаимоотношение между некоторыми формами каталепсии у крыс. Попытка генетического анализа. Генетика. 35(6) : 807–810. 1999. [*Kolpakov V.G., Barykina N.N., Chugui V.F., Alekhina T.A.* Relationship between certain forms of catalepsy in rats. An attempt at genetic analysis. Genetika. 35(6): 807–810. 1999. (In Russ)].
25. *Крушинский Л.В.* Наследование пассивно-оборонительного поведения (трусости) в связи с типами нервной системы у собак. В кн.: Эволюционно-генетические аспекты поведения. М. Наука. 72–95. 1991. [*Krushinskii L.V.* Inheritance of passive-defensive behavior (cowardice) in connection with the types of the nervous system in dogs. In: Evolutionary genetic aspects of behavior. Moscow. Nauka. 72–95. 1991. (In Russ)].
26. *Алехина Т.А., Пальчикова Н.А., Игонина Т.Н., Кузнецова Н.В.* Сравнительный анализ реакций на введение имипрамина крысам кататонической линии ГК и Вистар. Рос физиол журн им. И.М. Сеченова. 101(3): 249–257. 2015. [*Alekhina T.A., Palchikova N.A., Igonina T.N., Kuznetsova N.V.* Comparative analysis of imipramine intake reactions in catatonic and Wistar rats. Russ. J. Physiol. 101(3): 249–257. 2015. (In Russ)].
27. *Leibowitz S.F.* Regulation and effects of hypothalamic galanin: relation to dietary fat, alcohol ingestion, circulating lipids and energy homeostasis. Neuropeptides. 39(3): 327–332. 2005.
28. *Muller M.J., Enderle J., Bosy-Westphal A.* Changes in energy expenditure with weight gain and weight loss in humans. Curr. Obes. Rep. 5: 413–423. https://doi.org/10.1007/s13679-016-0237-4
29. *Чугуй В.Ф., Колпаков В.Г., Барыкина Н.Н.* Каталепсия и "нервность" у крыс. Результаты повторной селекции. Генетика. 43(2): 276–279. 2007. [*Chugui V.F., Kolpakov V.G., Barykina N.N.* Catalepsy and "nervousness" in rats: results of replicated selection. Genetika. 43(2): 276–279. 2007. (In Russ)].
30. *Himmler B.T., Stryjek R.S., Modlinska K., Derksen S.M., Pisula W., Pellis S.M.* How domestication modulates play behavior: a comparative analysis between wild rats and a laboratory strain of Rattus norvegicus. J. Comp. Psychol. 127(4): 453–464. 2013 https://doi.org/10.1037/a0032187
31. *Moreno M., Cardona C., Gomez M.J., Sanchez-Santed F., Tobena A., Fernandez-Terual A., Campa L., Sunol C., Escarabajal D., Torres C., Flores P.* Impulsivity characterization in the Roman High- and Low-avoidance rat strains: behavioral and neurochemical differences. Neuropsychopharmacology. 35: 1198–1208. 2010.
32. *Виноградова Е.П., Арутюнян Н.А., Жуков Д.А.* Тревожность и прогестерон в плазме крови в разные стадии эстрального цикла у крыс с противоположными стратегиями поведения. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 104(5): 565–572. 2018. [*Vinogradova E.P., Arutunan N.A., Zhukov D.A.* Anxiety and plasma progesterone in different stages of the estrous cycle in rats with opposite coping style. Russ. J. Physol. 104(5): 565–572. 2018. (In Russ)].
33. *Bowen M.T., Hari Dass S.A., Blooth J., Suraev A., Vyas A., McGregor I.S.* Active coping towards predatory stress is associated with lower corticosterone and progesterone plasma levels and decreased methylation in the medial amygdala vasopressin system. Hormones Behav. 66: 561–566. 2014.
34. *Wirth M.M.* Beyond the HPA axis: progesterone-derived neuroactive steroids in human stress and emotion. Front. Endocrinol. 2. https://doi.org/10.3389/fendo.2011.00019
35. *Клочков Д.В., Алехина Т.А., Барыкина Н.Н.* Моноамины и функция яичников крыс, селекционированных на усиление кататонической реактивности. Журн. эволюц. биохим. физиол. 45(3): 329–333. 2009. [*Klochkov D.V., Alekhina T.A.* Monoamines and function of ovaries of rats selected for catatonia. Zhurn. Evol. Biokhim. Phiziol. 45(3): 329–333. 2009. (In Russ)].
36. *Клещев М.А., Алехина Т.А., Осадчук Л.В.* Сперматогенная функция семенников у крыс с наследственной предрасположенностью к проявлению кататонических реакций. Вавиловский журн генетики и селекции. 22(4): 400–405. 2018. [*Kleshchev M.A., Alekhina T.A., Osadchuk L.V.* The spermatogenic function testes in rats predisposed to the manifestation of catatonic reactions. Vavilovskii Zhurn. Genetiki i Selektsii. 22(4): 400–405. https://doi.org/10.18699/VJ18.000. 2018. (In Russ)].
37. *Backstrom T., Bixo M., Johansson M., Nyberg S., Ossewaarde L., Ragagnin G., Savic I., Stromberg J., Timby E., van Broekhoven F., van Wingen G.* Allopregnanolone and mood disorders. Prog. Neurobiol. 113: 88–94. 2014.
38. *Melcangi R.C., Panzika G.C.* Allopregnanolone: state of the art. Prog. Neurobiol. 113: 1–5. 2014.

39. *Wei W., Zhang N., Peng Z., Houser C.R., Mody I.* Perisynaptic localization of delta subunit-containing GABA(A) receptors and their activation by GABA spillover in the mouse dentate gyrus. J. Neurosci. 23: 10650–10661. 2003.
40. *Holesh J.E., Lord M.* Physiology, Ovulation. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls publishing; 2018.
41. *Schank J.C.* Do Norway rats (Rattus Norvegicus) synchronize their estrus cycles? Physiol. Behav. 72: 129–139. 2001.
42. *Иванов Ю.Н., Клочков Д.В., Поздняков М.А.* Исследование синхронизации полового цикла у самок серой крысы (*Rattus Norvegicus*) при совместном содержании. Вавиловский журн генетики и селекции. 15(1): 35–44. 2011. [*Ivanov Yu.N., Kolchkov D.V., Pozdnyakov M.A.* Estrous cycle synchronization in rats (*Rattus Norvegicus*) females kept together. Vavilovskii Zhurn. Genetiki i Selektsii. 15(1): 35–44. 2011. (In Russ)].

Behavioral, Hormonal and Metabolic Characteristics of Female Rats Selectively Bred for the Duration of the Passive Defensive Reaction

T. A. Alekhina[a], *, N. A. Palchikova[b, c], and D. V. Klochkov[a]

[a] *Institute of Cytology and Genetics of SB RAN, Novosibirsk, Russia*
[b] *Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia*
[c] *Novosibirsk State University of Economics and Management, Novosibirsk, Russia*
**e-mail: alek@bionet.nsc.ru*

The study was conducted on the female GC (**G**enetic **C**atatonia) rats selectively bred for the duration of the passive defensive response to the weak stimuli. Only male rats of this line were used in the previous studies, therefore the aim of this study was to characterize the behavioral, hormonal and metabolic parameters of the female GC rats, and to elucidate the specific properties of their estrous cycle synchronization. We determined the estrous cycle phases using the vaginal smear classification. Other parameters were recorded in the running wheel: the turn and rocking counts, the overall motor activity (amount of runs, grooming, vertical postures, and occurrences on the central axis of the running wheel), and the excitability level in response to an auditory stimulus. We also assayed the progesterone, estradiol, cholesterol, and triglycerides blood levels. Based on the obtained results, we confirm the passive response type and elevated anxiety in female GC rats. The GS rats demonstrated lower fertility and lower body weight in comparison with the Wistar rats. The progesterone blood level was elevated in the proestrus phase in GC rats. The female GC rats demonstrated similarly low triglyceride blood level to the male rats of the same line. The progesterone levels in the synchronized phase were higher than in the unsynchronized one in both GC and Wistar rats. These data show that the selective breeding for the passive defensive response in GC female rats is associated with the moderate stress reactions, changes in the hormonal and metabolic profiles, and decreased fertility.

Keywords: catatonic model, estrus cycle synchronization, progesterone, triglycerides, fertility

ЦИТИРОВАТЬ:

Алехина Т.А., Пальчикова Н.А., Клочков Д.В. Поведенческие и гормонально-метаболические характеристики самок крыс, селекционированных по длительности пассивно-оборонительной реакции. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(1): 66–77.

DOI: 10.31857/S0869813920010021

TO CITE THIS ARTICLE:

Alekhina T.A., Palchikova N.A., Klochkov D.V. Behavioral, Hormonal and Metabolic Characteristics of Female Rats Selected for the Duration on Passive Defensive Reaction. Russian Journal of Physiology. 106(1): 66–77.

DOI: 10.31857/S0869813920010021

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 1, с. 78–83

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ВЛИЯНИЕ КОЛЛАГЕНАЗЫ НА АКТИВНОСТЬ ГИАЛУРОНИДАЗЫ 1-ГО ТИПА В ПОЧЕЧНОМ СОСОЧКЕ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ БЕЛЫХ КРЫС

© 2020 г. С. Г. Дзгоев[1, 2, *]

[1]Владикавказский научный центр РАН, Владикавказ, Россия

[2]Северо-Осетинский государственный университет им. К.Л. Хетагурова, Владикавказ, Россия

E-mail: stanislavdzgoev@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.10.2019 г.
После доработки 24.10.2019 г.
Принята к публикации 24.10.2019 г.

Исследовано влияние разных концентраций коллагеназы на активность изоформ гиалуронидазы 1-го типа (ГИАЛ1) папиллярной зоны почек и сыворотки крови белых крыс. В почечных сосочках коллагеназа вызывала ингибирование изоформ ГИАЛ1 с молекулярной массой 63 и 73 кДа, степень ингибирования которых росла по мере увеличения концентрации фермента, а затем снижалась. В сыворотке коллагеназа не оказывала никакого влияния на изоформы ГИАЛ1 с молекулярной массой 73 и 132 кДа.

Ключевые слова: почки, вазопрессин, соединительная ткань, гиалуроновая кислота, гиалуронидаза 1-го типа

DOI: 10.31857/S0869813920010057

Основными органическими компонентами, формирующими пространственную структуру соединительной ткани млекопитающих, являются коллагеновые белки и гиалуроновая кислота [1, 2]. Эти биополимеры формируют каркас, к которому прикрепляются другие компоненты межклеточного матрикса и который удерживает влагу во всех органах и тканях. Предполагается, что степень полимеризации гиалуроновой кислоты межклеточного матрикса может быть одним из регуляторных факторов, влияющих на целый ряд биологических и патологических процессов. В почках млекопитающих, главном органе по поддержанию водного баланса, содержание гиалуроновой кислоты в медуллярной зоне в несколько раз превышает ее содержание в корковой зоне и прямо пропорционально степени гидратации организма, что указывает на непосредственное участие обмена гиалуроновой кислоты в регуляции процесса реабсорбции воды из собирательных трубок нефронов, происходящего в папиллярной зоне почек [3]. В высокополимеризованном состоянии гиалуроновая кислота, связывая большое количество ионов и воды, создает высокое сопротивление межклеточного матрикса осмотическому току воды из собирательных трубок в кровеносные сосуды. При дегидратации организма, наоборот, степень полимеризации этого биополимера уменьшается, что, в свою очередь, облегчает реабсорбцию воды в почках. Что касается коллагенов, как главных белковых компонентов любой соединительной ткани, очевидно, что их обмен также может влиять на процессы реабсорбции воды в почках. Таким образом, коллагеназы и гиалуронидазы, ферменты, разрушающие и деполимеризующие коллагены и ги-

алуроновую кислоту, могут быть вовлечены в реализацию физиологических эффектов гормонов, регулирующих водно-электролитный баланс организма млекопитающих за счет облегчения осмотического тока воды через соединительную ткань. Впервые А.Г. Гинецинский обнаружил, что антидиуретический эффект вазопрессина сопровождается увеличением гиалуронидазной активности в моче, а в дальнейшем было продемонстрировано, что данный эффект характерен для почечного сосочка и сыворотки крови [4–7]. В нашем недавнем исследовании изоформ гиалуронидазы 1-го типа в интерстиции почечного сосочка белых крыс добавление коллагеназы вызывало подавление гиалуронидазной активности [8]. Данный эффект оказался неожиданным, поскольку, исходя из существующих представлений, скорее всего, следовало ожидать рост гиалуронидазной активности под действием коллагеназы. Чтобы выяснить причину данного несоответствия цель настоящей работы заключалась в исследовании влияния коллагеназы на активность изоформ гиалуронидазы 1-го типа интерстиция почечного сосочка и сыворотки белых крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментах использовали самцов крыс линии Вистар массой 250–350 г, которые содержались на стандартной диете в условиях вивария. Исследование проводилось в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями биоэтического комитета Северо-Осетинского государственного университета. В одном эксперименте использовали одну-две крысы, которых декапитировали, собирали кровь, извлекали почки и выделяли почечные сосочки. Кровь центрифугировали 5 мин при 500 *g*, отбирали сыворотку и использовали в экспериментах. Ферментативные экстракты межклеточного матрикса ГИАЛ1 получали по методу, описанному нами ранее с некоторыми модификациями [8]. Почечные сосочки измельчали до кусочков объемом 1–3 мм^3. Измельченные кусочки почечных сосочков, находящиеся в охлажденном физиологическом растворе объемом 2 мл, помещали в устройство, состоящее из двух шприцов объемом 5 мл, соединенных друг с другом через иглу с внутренним диаметром 0.5 мм, и дезинтегрировали, прогоняя буфер с кусочками ткани из одного шприца в другой. Затем суспензию фильтровали через капроновый фильтр с диаметром пор 0.2 мм и центрифугировали 5 мин при 100 *g* и 4°C. Осадок отбрасывали, а супернатант еще раз центрифугировали 10 мин при 10000 *g* и 4°C. Осадок отбрасывали, а надосадочную жидкость считали ферментативным экстрактом ГИАЛ1.

К ферментативным экстрактам ГИАЛ1 (45 мкл) добавляли по 5 мкл растворенной в физиологическом растворе коллагеназы (Sigma, Германия) разных концентраций и инкубировали в течение 60 мин при 37°C.

Гиалуронидазную активность белков определяли методом зимографии с импрегнированной в гель гиалуроновой кислотой [9] с некоторыми модификациями [8]. Образцы смешивали с равным объемом буфера, содержащего 4%-ный додецилсульфат натрия без редуцирующего агента, и оставляли при комнатной температуре на один час. Разделение белков проводили за счет диск-электрофореза в системе Лэммли, но без редуцирующего агента [10]. После электрофореза гель отмывался 2.5%-ным раствором Тритона X-100 в течение 80 мин при комнатной температуре и инкубировался в 0.1 М натрий-ацетатном буфере (pH 3.5) в течение 18 ч при температуре 37°C. Затем гель инкубировался в 20 мМ Трис-HCl буфере, содержащем 0.1 мг/мл проназу E (Merck, Германия) при pH 8.0 в течение 2 ч при температуре 37°C. Для визуализации зон с гидролизованной гиалуроновой кислотой гель окрашивался 0.5%-ным раствором алцианового синего (Panreac, Испания). После обесцвечивания проводилось повторное окрашивание геля 0.1%-ным раствором кумасси бриллиантовый синий R-250 (Serva, Германия) с последующим обесцве-

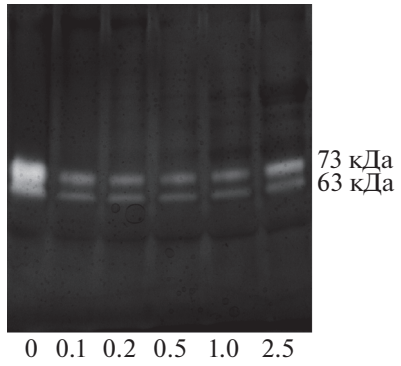

Рис. 1. Зимограмма ферментативных экстрактов ГИАЛ1 межклеточного матрикса почечного сосочка в присутствии разных концентраций коллагеназы. Перед проведением зимографии ферментативные экстракты инкубировали с коллагеназой при 37°С в течение 60 мин. Справа обозначены молекулярные массы белков, обладающих гиалуронидазной активностью. Внизу обозначены концентрации коллагеназы, мг/мл.

Fig. 1. Zymogram of enzymatic extracts of HYAL1 intercellular matrix of the renal papilla in the presence of different concentrations of collagenase. Enzymatic extracts were incubated with collagenase at 37°C for 60 min before zymography. The molecular mass of proteins with hyaluronidase activity are indicated at right. The collagenase concentration is indicated below, mg/ml.

чиванием. Количественные оценки гиалуронидазной активности полос и определение молекулярной массы делали, сканируя окрашенный гель на денситометре GS-900 с программным обеспечением Image Lab (Bio-Rad, США).

Количественное определение белка осуществляли по методу M. Bradford [11]. Статистическую обработку данных проводили методом парных сравнений с использованием *t*-критерия Стьюдента. Результаты представлены в виде $M \pm SEM$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлено влияние различных концентраций коллагеназы на белки ферментативных экстрактов почечных сосочков с молекулярной массой 63 и 73 кДа, обладающие активностью гиалуронидазы 1-го типа. Как видно из рис. 1, даже очень низкие концентрации коллагеназы в инкубационной среде вызывали значительное подавление гиалуронидазной активности обеих изоформ ГИАЛ1.

Данный эффект был дозозависимым и усиливался вплоть до концентрации коллагеназы в инкубационной среде 0.5 мг/мл. Однако дальнейшее увеличение концентрации коллагеназы вызывало снижение ингибирующего влияния коллагеназы и рост гиалуронидазной активности обеих изоформ ГИАЛ1. Особенно это было характерно для изоформы ГИАЛ1 с молекулярной массой 73 кДа (рис. 2). Возможно, это связано с тем, что 73 кДа-белок является основной изоформой ГИАЛ1 межклеточного матрикса почечного сосочка, в то время как 63 кДа-белок является внутриклеточным белком, характерным для клеток собирательных трубок [8].

Полученные результаты продемонстрировали, что в интерстиции почечного сосочка внеклеточная коллагеназа может подавлять активность ГИАЛ1, причем степень ингибирования снижается при высоких концентрациях фермента. Мы не нашли в литературе каких-либо сведений относительно влияния этих гидролитических ферментов друг на друга, не говоря уже о механизме этого влияния. Следует

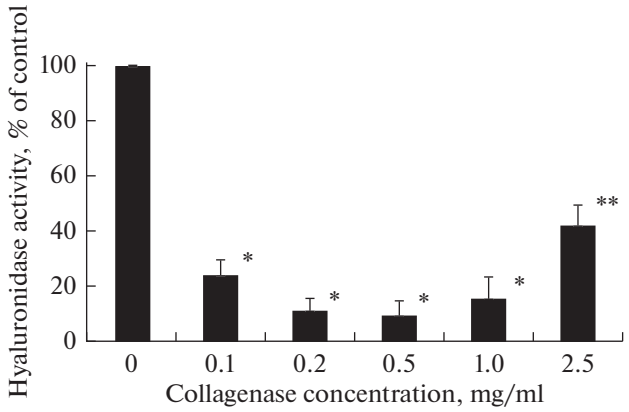

Рис. 2. Влияние коллагеназы на гиалуронидазную активность 73 кДа-белка. Относительная оптическая плотность полосы белка в отсутствие коллагеназы принималась за 100% и считалась контролем. Результаты являются средними значениями 9 отдельных экспериментов. Звездочкой обозначены достоверные отличия при $p < 0.01$ по сравнению с контролем. Двумя звездочками обозначены достоверные отличия при $p < 0.01$ по сравнению с контролем и меньшими концентрациями коллагеназы.

Fig. 2. The effect of collagenase on the hyaluronidase activity of the 73 kDa protein. The relative band intensity in the absence of collagenase was used as control, and all values were normalized to it. The results are averages of 9 separate experiments. Significant differences from values for the control are indicated by asterisk at $p < 0.01$. Significant differences from values for the control and lower concentrations of collagenase are indicated by two asterisks at $p < 0.01$.

отметить, что коллагеназа, по-видимому, непосредственно не действует на изоформы ГИАЛ1, гидролизуя пептидные связи в молекуле изоферментов. В противном случае увеличение концентрации коллагеназы не приводило бы к устранению ингибирующего влияния низких концентраций фермента и росту гиалуронидазной активности тех же самых белковых зон. По-видимому, в ходе расщепления коллагеновых белков интерстиция почечного сосочка под действием коллагеназ могут образовываться какие-то низкомолекулярные продукты гидролиза, оказывающие ингибирующее влияние на активность изоформ ГИАЛ1. При увеличении концентрации коллагеназы эти продукты теряют способность ингибировать изоформы ГИАЛ1, возможно, в виду дальнейшей деградации.

Исследование изоформ ГИАЛ1 в различных тканях белых крыс показало, что в почечном сосочке активность 73 кДа-белка была гораздо выше по сравнению с другими тканями и уступала лишь сыворотке крови, где активность была максимальна [12]. В этой связи представляло интерес выяснить, как будут влиять различные концентрации коллагеназы на активность данной изоформы ГИАЛ1 в сыворотке крови.

Как видно из рис. 3, в отличие от ферментативных экстрактов почечных сосочков разные концентрации коллагеназы не оказывали никакого влияния на сывороточный 73 кДа-белок, а также на изоформу ГИАЛ1 с молекулярной массой 132 кДа, характерную для сыворотки крови крыс [13]. Данный факт подтверждает наше предположение о том, что коллагеназа не гидролизует белки, обладающие активностью ГИАЛ1, но способна опосредованно влиять на гиалуронидазную активность через распад коллагенов соединительной ткани. Отсутствие этих коллагенов в крови, скорее всего, и есть та причина, по которой коллагеназа не влияла на активность 73 кДа-белка в сыворотке крови.

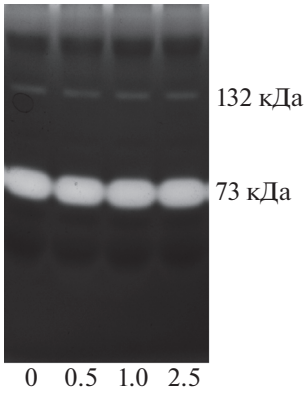

Рис. 3. Зимограмма ГИАЛ1 сыворотки крови белых крыс в присутствии разных концентраций коллагеназы. Перед проведением зимографии сыворотку разбавляли в 8 раз и инкубировали с коллагеназой при 37°С в течение 60 мин. Справа обозначены молекулярные массы белков, обладающих гиалуронидазной активностью. Внизу обозначены концентрации коллагеназы, мг/мл.

Fig. 3. Zymogram of serum HYAL1 from white rats in the presence of different concentrations of collagenase. Serum was diluted for 8 times and incubated with collagenase at 37°C for 60 minutes before zymography. The molecular mass of proteins with hyaluronidase activity are indicated at right. The collagenase concentration is indicated below, mg/ml.

Таким образом, в данном исследовании показано, что коллагеназа, не оказывая непосредственного гидролитического влияния на изоформы ГИАЛ1, тем не менее, способна вызывать дозозависимое ингибирование гиалуронидазной активности в папиллярной зоне почек крыс, степень которого при низких концентрациях сначала растет по мере увеличения концентрации коллагеназы, а затем начинает снижаться. Снижение ингибирующего влияния коллагеназы при высоких концентрациях фермента может отражать тот факт, что по мере усиления деградации коллагенов межклеточного матрикса происходит и увеличение скорости деградации гиалуроновой кислоты, что в целом обеспечивает увеличение проницаемости интерстиция почечного сосочка для воды.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена за счет средств Госзадания по теме № 075-00363-19-02.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Di Lullo G.A., Sweeney S.M., Körkkö J., Ala-Kokko L., San Antonio J.D.* Mapping the Ligand-binding Sites and Disease-associated Mutations on the Most Abundant Protein in the Human, Type I Collagen.|J. Biol. Chem. 277(6): 4223–4231. 2002.
2. *Erickson M., Stern R.* Chain gangs: new aspects of hyaluronan metabolism. Biochem. Res. Int. 2012: 893947. 2012.
3. *Hansell P., Göransson V., Odlind C., Gerdin B., Hällgren R.* Hyaluronan content in the kidney in different states of body hydration. Kidney Int. 58: 2061–2068. 2000.
4. *Ginetzinsky A.G.* Role of hyaluronidase in the reabsorption of water in renal tubules (The mechanism of action of antidiuretic hormone). Nature. 182: 1218–1219. 1958.
5. *Ivanova L.N., Babina A.V., Baturina G.S., Katkova L.E.* The effect of vasopressin on the expression of genes of key enzymes of the interstitial hyaluronan turnover and concentration ability in WAG rat kidneys. Russ J. Genetics: Appl Res. 7(3): 249–257. 2017.
6. *Дзгоев С.Г., Иванова Л.Н.* Гиалуронидазная активность плазмы крови крыс Вистар: влияние дегидратации и вазопрессина. Рос физиол журн им. И.М.Сеченова. 98(6): 777–781.

2012. [Dzgoev S.G. Hyaluronidase activity of Wistar rat blood plasma: effect of dehydration and vasopressin. Russ. J. Physiol. 98(6): 777–781. 2012. (In Russ)].
7. *Dzgoev S.G.* Selective vasopressin V2-agonist desmopressin stimulates blood hyaluronidase activity. Bull Exp. Biol. Med. 159(4): 424–426. 2015.
8. *Дзгоев С.Г.* Активность гиалуронидазы 1-го типа в клетках собирательных трубок и интерстиция папиллярной зоны почек крыс. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 105(3): 295–302. 2019. [*Dzgoev S.G.* Hyaluronidase activity of the 1-st type in the cells of the collecting ducts and interstitium of the papillary zone of rat kidney. Russ. J. Physiol. 105(3): 295–302. 2019. (In Russ)].
9. *Miura R.O., Yamagata S., Miura Y., Harada T., Yamagata T.* Analysis of glycosaminoglycan-degrading enzymes by substrate gel electrophoresis (zymography). Anal. Biochem. 225: 333–340. 1995.
10. *Laemmli U.K.* Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature. 277: 680–685. 1970.
11. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248–254. 1976.
12. *Дзгоев С.Г.* Сравнительная характеристика изоформ гиалуронидазы 1-го типа в соматических тканях и сыворотке белых крыс. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 102(8): 963–967. 2016. [*Dzgoev S.G.* Comparative characterization of hyaluronidase isoforms of the 1-st type in somatic tissues and serum of white rats. Russ. J. Physiol. 102(8): 963–967. 2016. (In Russ)].
13. *Ikegami-Kawai M., Okuda R., Nemoto T., Inada N., Takahashi T.* Enhanced activity ofserum and urinary hyaluronidases in streptozotocin-induced diabetic Wistar and GK rats. Glycobiology. 14(1): 65–72. 2004.

Effect of Collagenase on Type 1 Hyaluronidase Activity in Renal Papilla and Serum of White Rats

S. G. Dzgoev[a, b, *]

[a] *Vladikavkaz Scientific Center of RAS, Vladikavkaz, Russia*
[b] *Khetagurov North Ossetian State University, Vladikavkaz, Russia*
**e-mail: stanislavdzgoev@yandex.ru*

Here, we studied the effect of different collagenase concentrations on the activity of type 1 hyaluronidase (HYAL1) isoforms in the renal papillary zone and blood serum of white rats. The collagenase inhibited the HYAL 1 isoforms with a molecular weight of 63 and 73 kDa in renal papillae. The degree of the inhibition increased with the concentration of the enzyme, but then decreased at high concentrations. The collagenase had no effect on isoforms of HYAL 1 with molecular weights of 73 and 132 kDa in the serum.

Keywords: kidney, vasopressin, connective tissue, hyaluronic acid, type 1 hyaluronidase

ЦИТИРОВАТЬ:

Дзгоев С. Г. Влияние коллагеназы на активность гиалуронидазы 1-го типа в почечном сосочке и сыворотке крови белых крыс. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(1): 78–83.
DOI: 10.31857/S0869813920010057

TO CITE THIS ARTICLE:

Dzgoev S.G. Effect of Collagenase on Type 1 Hyaluronidase Activity in Renal Papilla and Serum of White Rats. Russian Journal of Physiology. 106(1): 78–83.
DOI: 10.31857/S0869813920010057

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 1, с. 84–96

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ОБЪЕКТИВНЫЕ И ПСИХОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ОЦЕНКИ СВОЕГО СНА У ПАЦИЕНТОВ С ИНСОМНИЕЙ И СИНДРОМОМ АПНОЭ ВО СНЕ

© 2020 г. Е. И. Рассказова[1, *], Г. В. Ковров[2], А. И. Мачулина[3]

[1]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Научный центр психического здоровья, Москва, Россия

[2]Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

[3]Городская клиническая больница им. братьев Бахрушиных, Москва, Россия

*****E-mail: e.i.rasskazova@gmail.com*

Поступила в редакцию 28.08.2019 г.
После доработки 30.10.2019 г.
Принята к публикации 31.10.2019 г.

Проблема несоответствия объективного и субъективного качества сна не теряет своей актуальности, как теоретической, так и практической, обусловленной тем, что жалобы при нарушениях сна выступают одновременно и результатом личностного обобщения субъективных оценок сна и бодрствования за определенный период. Целью работы было исследование объективных и психологических факторов субъективной оценки сна конкретной ночью и в целом у пациентов с инсомнией и синдромом обструктивного апноэ во сне. 77 пациентов с синдромом апноэ во сне и 105 пациентов с хронической инсомнией проходили неврологическое обследование, заполняли анкету качества сна, анкету скрининговой оценки апноэ во сне, шкалу сонливости Эпворта, госпитальную шкалу тревоги и депрессии, анкету причин нарушений сна, затем у 46 пациентов с синдромом обструктивного апноэ во сне (СОАС) (объективные данные о дыхании у 68 пациентов) и 93 пациентов с инсомнией проводилась полисомнография в течение одной ночи. Было показано, что общая оценка своего сна пациентами с различными диагнозами связана с другими объективными показателями сна, нежели оценки конкретной ночи. Общая оценка сна сопряжена с длительностью засыпания и латентным периодом дельта-сна, тогда как конкретная оценка ночи – с продолжительностью дельта-сна, быстрого сна и количеством циклов сна. При инсомнии, в отличие от синдрома обструктивного апноэ во сне, оценка сна более негативна (при той же объективной картине сна) и связана с более широким кругом объективных параметров, что может объясняться гипертрофированным вниманием пациентов с инсомнией к своему сну и нюансам своего состояния. Психологические факторы связаны с субъективным качеством сна пациентов не напрямую, а косвенно: тревожность и представления о хрупкости сна связаны с худшей оценкой своего сна лишь при более благоприятной объективной картине сна.

Ключевые слова: объективная картина сна, субъективная оценка сна, инсомния, синдром обструктивного апноэ во сне, тревога, депрессия

DOI: 10.31857/S0869813920010094

Проблема несоответствия объективной картины сна и субъективной его оценки у человека имеет длительную историю в сомнологии [1, 2], приобретая особую остроту в отношении так называемой парадоксальной инсомнии [3], однако до сих пор относится к числу неразрешенных. Для физиологии сна интерес представляет

вопрос о том, в чем субъективная оценка человеком своего сна соотносится с объективными показателями, а в чем объясняется и как объясняется психологическими факторами регуляции сна. На фоне быстрого накопления новых исследований и концепций в области механизмов физиологической регуляции сна [4] данные о том, каким образом психологическая регуляция сна и бодрствования "встраивается" у человека в процессы физиологической регуляции, становятся важными для дальнейшего междисциплинарного развития сомнологии.

Для медицины этот вопрос имеет практическое значение [2, 5]: понимание того, к каким объективным показателям своего сна "чувствительны" пациенты, обращающиеся с различными жалобами, а к каким – нет, может существенно повысить эффективность и снизить затраты в работе сомнолога в клинике. Особый интерес в этом контексте представляют пациенты с инсомнией, поскольку их субъективные нарушения сна и субъективно связанные со сном нарушения функционирования днем и представляют их ключевые жалобы, которые нередко существенно расходятся с объективной картиной. Существующие исследования показывают, что пациенты, как правило, переоценивают длительность засыпания и недооценивают общую продолжительность своего сна [6], переоценивают длительность бодрствования в течение ночи (при ночных пробуждениях [7]). Интересно, что в последнем исследовании переоценка длительности бодрствования была связана с длительностью фазы быстрого сна (более продолжительного у пациентов с инсомнией, чем в норме), это позволило авторам предполагать, что фаза быстрого сна играет важную роль в нарушении восприятия сна при инсомнии. Более того, в целом более негативная оценка своего сна по сравнению с домашними условиями, как правило, объясняется субъективно более короткой продолжительностью сна [2].

Очевидно, что оценка своего сна при инсомнии может определяться не только объективным качеством сна, но и эмоциональным и функциональным состоянием [6], а также дисфункциональными представлениями о сне и поведением в отношении сна [8–10]. В частности, и жалобы на нарушения сна, и жалобы на нарушения функционирования (сонливость, усталость, симптомы гиперсомнии), будучи структурно различными у пациентов с инсомнией [11], коррелировали с тревогой и депрессией, хотя симптомы нарушений функционирования были связаны с ними сильнее и даже позволяли относительно точно диагносцировать депрессивное состояние у пациентов. Данные о роли тревоги и депрессии в этиологии и патогенезе инсомнии настолько обширны, что позволили выдвинуть гипотезу об инсомнии как модели хронического стресса [12], в соответствии с которой связанные со стрессом переживания, в том числе, тревожные и депрессивные еще в большей степени нарушают сон человека. Обобщая эти исследования, тревога, депрессия, функциональные нарушения могут влиять на субъективную оценку сна у пациентов с инсомнией. Следует отметить, что, по некоторым данным, пациенты часто жалуются на нарушения концентрации внимания, усталость, снижение настроения, сонливость, которые не выявляются при выполнении когнитивных тестов [13], а жалобы на нарушения дневного функционирования при инсомнии сильнее связаны с тревогой и депрессией, нежели с субъективными нарушениями сна [14, 15]. В пользу роли внимания и тревоги в искаженной оценке своего функционирования при инсомнии свидетельствует и эксперимент, в котором пациентам с инсомнией предлагалось сконцентрировать внимание в течение дня на своем состоянии [16]. В сравнении с контрольной группой пациентов, которым не давалось такой инструкции, при том же уровне функционирования пациенты экспериментальной группы оценивали свое состояние значимо ниже. Изменение представлений о сне в ходе когнитивной терапии у этих пациентов также способствует более точной оценке своего сна [17, 18].

Следующий вопрос, возникающий в этом контексте, – могут ли психологические факторы, такие как эмоциональное состояние, переживание нарушений

функционирования в течение дня и сонливости, сказываться на оценке своего сна и у других пациентов с нарушениями сна? Иными словами, идет ли речь об общепсихологических механизмах или о факторах, специфических для пациентов с инсомнией? С одной стороны, любое хроническое заболевание, характеризующееся снижением качества жизни, – например, синдром обструктивного апноэ во сне (СОАС) – также может рассматриваться как модель хронического стресса, при которой тревожные и депрессивные переживания не только способствуют дальнейшему снижению качества жизни (но, в отличие от инсомнии, не нарастанию симптоматики), но и искаженной оценке своего сна. С другой стороны, согласно психосоматическому подходу [19–22], субъективная оценка сна относится к сфере принятия решения о своей болезни, формирования внутренней картины болезни, отношения к болезни или репрезентации болезни. Несмотря на различия между этими концепциями, все эти предполагают, что в стремлении осмыслить свое состояние человек формирует некую систему ощущений, переживаний, представлений, репрезентаций или отношений, эта система впоследствии выступает "регулятором" его деятельности и поведения, определяя благополучие, качество жизни, социальное функционирование, комплайенс и т.д. Это означает, что представления о сне, ожидания, тревожность, депрессия и другие психологические факторы могут как напрямую определять субъективную оценку сна (т.е. выступать факторами, дополнительными к объективной оценке сна), так и влиять на то, к каким объективным особенностям своего сна чувствительны те или иные пациенты, принимая решение о своем сне. Например, возможно, что пациенты с более высоким уровнем тревоги воспринимают нехватку дельта-сна более катастрофично, чем пациенты с низкой тревогой, или, наоборот, все пациенты оценивают свой сон негативно при дефиците глубокого сна, но пациенты с более высоким уровнем тревоги оценивают его негативно и при достаточном количестве глубокого сна.

Другое важное следствие из психологических моделей соматических заболеваний состоит в том, что, по крайней мере, часть эффектов представлений, переживаний и состояния в отношении субъективной оценки сна должна быть общепсихологической – т.е. характерной для разных нарушений сна.

Цель данного исследования – выявление объективных и психологических факторов субъективной оценки сна конкретной ночью и в целом у пациентов с различными нарушениями сна (пациентов с инсомнией и пациентов с СОАС). Заметим, что поскольку запись полисомнографии касается отдельной ночи, обычно измеряемой после общей оценки сна (чтобы избежать искажения, связанного с именно этой ночью), такое исследование неизбежно ограничено, поскольку общая оценка сна не моделируется на основе серии ночей и не создается экспериментально, а измеряется до полисомнографической записи. Тем не менее, с нашей точки зрения, объективные показатели и субъективная оценка конкретной ночи, даже в условиях лаборатории, могут выступать эмпирической моделью – примером того, как пациент спит и оценивает другие свои ночи.

Выдвигались следующие гипотезы:

1. Субъективная оценка своего сна у пациентов с нарушениями сна является результатом психологического процесса принятия решения, и лишь в средней степени связана с оценкой конкретной ночи, но также связана с когнитивными представлениями и эмоциональным состоянием (тревожностью, депрессивностью, ожиданиями в отношении сна, сонливостью).

2. При общей оценке сна и оценке конкретной ночи пациенты опираются на различные объективные особенности сна. При этом оценка сна у пациентов с инсомнией, в связи с их гипертрофированным вниманием к процессу засыпания и пробуждения, связана с более широким кругом объективных показателей сна, нежели оценка сна у пациентов с СОАС.

3. В соответствии с концепцией внимания–намерения–попытки C. Espie [23], субъективная оценка сна у пациентов с инсомнией опосредуется психологическими факторами, в первую очередь, тревогой и депрессией. С точки зрения психологии телесности, психологические факторы опосредствуют оценку сна не только при инсомнии, но и в целом в норме и патологии [10]. В данном исследовании сопоставлялись два альтернативных варианта операционализации этой теоретической гипотезы: с одной стороны, психологические факторы (субъективная сонливость, уязвимость сна, тревога, депрессия) могут выступать в качестве дополнительного предиктора общей оценки сна, после статистического контроля диагноза и объективных показателей сна. С другой стороны, психологические факторы могут выступать модераторами связи между объективными показателями и субъективной оценкой сна, сказываясь на оценке сна лишь при определенной его объективной картине.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выборка исследования включила 77 пациентов с СОАС (59 мужчин, 75.6%) и 105 пациентов с хронической инсомнией (38 мужчин, 35.8%), проходивших амбулаторное лечение в Сомнологическом центре при Московском государственном медицинском университете имени И.М. Сеченова. Оценка диагноза нарушения сна проводилась в соответствии с Международной классификацией расстройств сна 2-й редакции [28]. Из них полная запись полисомнографии, сделанной в данном центре, была у 46 пациентов с СОАС (объективные данные о дыхании у 68 пациентов) и 93 пациентов с инсомнией.

Критериями исключения были: возраст менее 18 или более 70 лет, опыт злоупотребления психоактивными веществами (кроме предписанных неврологом снотворных препаратов в соответствии с рекомендуемыми дозировками и регулярностью), черепно-мозговые травмы и инсульты, диагносцированные психические заболевания (кроме реакций на острый стресс в анамнезе), обострения соматических заболеваний, которые могли быть связаны с нарушениями сна.

Обследование включало следующие этапы:

1. Клинико-психологический этап включал обследование неврологом-сомнологом, опрос об особенностях цикла сна и бодрствования, а также заполнение анкеты качества сна [12] – скрининговой методики субъективной оценки сна дважды (общей и после полисомнографической регистрации сна), анкеты скрининговой оценки апноэ во сне [12], шкалы сонливости Эпворта [24], а также госпитальной шкалы тревоги и депрессии [25, 26]. Кроме того, респонденты заполняли анкету причин нарушений сна [12], которая представляет собой перечень внутренних и внешних факторов (стресс, жизненные события, колебания настроения, болезнь, повышенная двигательная активность во сне, неприятные ощущения в руках и ногах, энурез, храп, нарушения дыхания во сне (апноэ), снохождение, сноговорение, ночное скрежетание зубами, ночная или суточная работа, быстрая смена часовых поясов из-за перелетов, смена времен года), каждый из которых респондент оценивал по бинарной шкале – нарушает ли данный фактор его сон. В предыдущем исследовании [27] было показано, что у хорошо спящих респондентов и пациентов с инсомнией может быть рассчитан общий суммарный показатель субъективной уязвимости сна к разным факторам, обладающий достаточной надежностью–согласованностью, что позволило использовать данный показатель и в настоящем исследовании.

2. Полисомнографический этап включал запись сна в течение одной ночи (регистрировались ЭЭГ, ЭМГ, движения глаз, а у пациентов с апноэ – дыхание во сне и вариабельность сердечного ритма) и последующую его расшифровку [28] с вычислением длительности сна, его стадий и латентных периодов, числа и длительности пробуждений за одну ночь. Эффективность сна как принятый в когнитивно-бихевиоральной терапии инсомнии показатель нарушения сна и его гигиены рассчитывался как выра-

женное в процентах частное продолжительности сна и общей продолжительности времени, проведенного в постели [9]. Дополнительно рассчитывался показатель индекса сна, предложенный Я.И. Левиным и соавт. [12] на основе регрессионного анализа объективных предикторов жалоб пациентов. Хотя данный показатель не является общепринятым при анализе полисомнографических данных, в настоящем исследовании он применялся в качестве попытки интеграции объективных показателей качества сна. У пациентов с апноэ дополнительно рассчитывался индекс апноэ/гипопноэ.

Обработка данных проводилась в программе SPSS Statistics 23.0 и включала проверку распределений на отличие от нормального, корреляционный анализ и анализ модерации.

1. На первом этапе обработки данных применялся корреляционный анализ объективных показателей сна, шкал тревоги, депрессии, сонливости и уязвимости сна с субъективным качеством сна (ситуативным и общим); анализ проводился отдельно в двух клинических группах.

2. Второй этап обработки данных включал анализ модерации и был направлен на проверку гипотезы о том, что можно выделить общие для двух групп пациентов и специфические объективные предикторы субъективной оценки конкретной ночи и объективного качества сна. Анализ модерации представляет собой вариант регрессионного анализа; при этом на первом его шаге статистически контролировался вклад клинической группы (т.е. учитывались общие различия в субъективной оценке сна между пациентами с инсомнией и пациентами с СОАС). На втором шаге в модель добавлялись объективные показатели, предсказывающие субъективную оценку сна в обеих группах (по результатам корреляционного анализа). На третьем шаге добавлялись специфические для группы предикторы – модераторы, характеризующие взаимодействие группы и объективных показателей сна. Эффекты, полученные на третьем шаге, являются специфическими или для пациентов с инсомнией, или для пациентов с СОАС (в зависимости от знака эффекта, подробнее каждый из них рассматривается ниже). Об улучшении предсказательной силы модели в анализе модераций свидетельствует изменение коэффициента детерминации ΔR^2, т.е. оценивается не значимость этого коэффициента, а значимость его изменения на каждом шаге анализа.

3. Третий этап также представлял собой серию анализов модерации, целью которого было выявление возможных психологических факторов, связанных с субъективной оценкой сна, после статистического контроля объективных показателей. Исходными выступали модели, полученные на втором этапе, а затем каждая из психологических переменных добавлялась в анализ, и проверялось, улучшается ли предсказательная сила модели.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Взаимосвязь объективных показателей сна, субъективной оценки конкретной ночи и оценки сна в целом у пациентов с СОАС и инсомнией

Очевидно, что оценка конкретной ночи и оценка своего сна в целом положительно коррелируют в обеих выборках между собой ($r = 0.56$, $p < 0.01$ у пациентов с СОАС и $r = 0.50$, $p < 0.01$ у пациентов с инсомнией), однако корреляции не столь высоки, как можно было ожидать. По сути, менее трети дисперсии между этими двумя переменными (<31.4%) можно считать общей. Иными словами, данные согласуются с гипотезой о том, что принятие решения о сне является результатом обобщения и зависит от различных факторов, будучи не сводимым к тому, как человек воспринимает конкретную ночь.

В целом, и пациенты с СОАС, и пациенты с инсомнией чаще оценивают свой сон в конкретную ночь более позитивно при большей продолжительности дельта-сна и быстрого сна, а также большем количестве циклов сна (табл. 1). Однако у пациентов

Таблица 1. Взаимосвязь объективных показателей, психологических особенностей и субъективной оценки сна у пациентов с СОАС и инсомнией: результаты корреляционного анализа
Table 1. Relationship between objective sleep parameters, psychological factors and subjective sleep appraisal in patients with sleep apnoe and insomnia: results of correlational analysis

Показатели объективного сна и психологические факторы Objective sleep parameters and psycholigical factors	СОАС Sleep apnoe		Инсомния Insomnia	
	Субъективная оценка сна – общая Subjective appraisal of sleep – General	Субъективная оценка сна – ситуативная Subjective appraisal of sleep – Situational	Субъективная оценка сна – общая Subjective appraisal of sleep – General	Субъективная оценка сна – ситуативная Subjective appraisal of sleep – Situational
Первая стадия F Stage 1-F	0.08	0.00	–0.02	–0.25*
Вторая стадия S Stage 2-S	0.04	–0.06	0.12	0.25*
Дельта-сон Delta-sleep	0.17	0.34*	0.36**	0.50**
Фаза быстрого сна REM REM	0.15	0.22	0.09	0.34**
Длительность бодрствования во сне W Wake in night	0.04	–0.16	–0.17	–0.32**
Длительность движений во сне Movements in sleep	–0.14	–0.09	–0.03	0.11
Латентный период засыпания Sleep latency	–0.30*	0.12	–0.23*	–0.43**
Латентный период второй стадии сна Latent period – Stage 2	0.15	–0.03	–0.11	–0.04
Латентный период дельта-сна Latent period – Delta-sleep	–0.21	–0.11	–0.24*	–0.19
Латентный период фазы быстрого сна Latent period – REM	–0.07	–0.30	0.01	–0.06
Количество циклов сна Number of cycles	0.35*	0.20	0.02	0.25*
Число пробуждений Number of awakenings	–0.06	–0.07	–0.03	–0.13
Индекс сна Sleep index	0.28	0.35*	–0.30**	–0.36**
Общее время сна Total sleep time	0.20	0.04	0.19	0.46**
Время в постели Time in bed	0.07	0.40*	–0.11	0.02
Эффективность сна Sleep efficacy	0.11	–0.29	0.17	0.21
Тревога Anxiety	–0.39**	–0.25	–0.11	0.00
Депрессия Depression	–0.46**	–0.12	–0.06	–0.14
Сонливость Sleepiness	–0.19	0.04	0.17	0.19
Субъективная уязвимость сна Subjective vulnerability of sleep	–0.12	–0.20	–0.04	0.01

*$p < 0.05$; **$p < 0.01$.

Таблица 2. Объективные предикторы субъективной оценки конкретной ночи у пациентов с СОАС и инсомнией
Table 2. Objective predictors of subjective appraisal of night in patients with sleep apnoe and insomnia

Шаги регрессионного анализа Steps of regression analysis	Независимые переменные Independent variables	Зависимая переменная: Субъективная оценка конкретной ночи Dependent variable: Subjective appraisal of concrete night	
		β	ΔR^2
Шаг 1 Step 1	Тип болезни Type of illness	–0.32**	10.2%**
Шаг 2 Step 2	Первая стадия F Stage 1-F	–0.15	11.2%*
	Длительность бодрствования во сне W Wake in sleep	–0.26**	
	Эффективность сна Sleep efficacy	0.13	
Шаг 3 Step 3	Взаимодействие диагноза и первой стадии F Interaction of Type of illness and Stage 1-F	–0.24**	7.8%**
	Взаимодействие диагноза и эффективности сна Interaction of Type of illness and Sleep efficacy	0.25**	

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

с инсомнией отмечается большее разнообразие субъективных критериев оценки – они считают свой сон лучшим при более краткой первой стадии, более продолжительной второй стадии сна, меньшей длительности бодрствования во сне, меньшем латентном периоде засыпания, лучшем индексе сна и большей общей продолжительности сна. В отличие от этого у пациентов с СОАС оценка конкретной ночи не зависит от первой и второй стадий сна, а также их латентных периодов, но парадоксально связана с худшим индексом сна и большим временем, проведенным в постели.

Несмотря на относительно тесные связи оценки конкретной ночи и оценки сна в целом в обеих группах пациентов, общая оценка сна в обеих группах пациентов выше при более быстром засыпании и меньшем латентном периоде дельта-сна. У пациентов с инсомнией она связана также с продолжительностью дельта-сна и лучшим индексом сна, а у пациентов с СОАС – с большим количеством циклов сна.

Интересно, что тревога и депрессия связаны с общей (но не ситуативной) более негативной оценкой сна у пациентов с СОАС ($r = -0.49...-0.36$, $p < 0.01$) и не связаны с оценкой сна у пациентов с инсомнией ($|r| < -0.15$, $p > 0.10$).

Следует отметить, что по результатам корреляционного анализа у пациентов с СОАС субъективные оценки конкретной ночи и сна в целом не связаны с индексами апноэ/гипопноэ (корреляции менее $|r| < 0.15$). Кроме того, в обеих группах субъективные оценки не связаны с вариабельностью сердечного ритма, и лишь у пациентов с СОАС отмечается слабая связь более частых сердечных сокращений ночью с более позитивной оценкой этой ночи ($r = 0.27$, $p < 0.05$), но не сна в целом ($r = -0.15$, $p > 0.10$). При инсомнии такой связи не выявлено.

Таблица 3. Объективные предикторы субъективной оценки сна у пациентов с СОАС и инсомнией
Table 3. Objective predictors of subjective appraisal of sleep in patients with sleep apnoe and insomnia

Шаги регрессионного анализа Steps of regression analysis)	Независимые переменные Independent variables	Зависимая переменная: Субъективная оценка конкретной ночи Dependent variable: Subjective appraisal of concrete night	
		β	ΔR^2
Шаг 1 Step 1	Тип болезни Type of illness	−0.57**	32.5%**
Шаг 2 Step 2	Дельта-сон Delta-sleep	0.15*	4.3%*
	Индекс сна Sleep index	−0.13	
Шаг 3 Step 3	Взаимодействие диагноза и индекса сна Interaction of Type of illness and Sleep index	−0.22*	3.4%*

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Предикторы субъективной оценки конкретной ночи и сна в целом у пациентов с СОАС и инсомнией: результаты анализа модерации

С целью выявления предикторов субъективной оценки пациентами конкретной ночи и сна в целом проводилась серия анализов модерации, зависимыми переменными, в которых выступали оценка конкретной ночи и субъективная оценка сна соответственно. На первом шаге в качестве независимой переменной в модель добавлялась бинарная переменная типа заболевания ("–1" – пациенты с СОАС, "1" – пациенты с инсомнией), на втором шаге добавлялись центрированные показатели объективного сна, на третьем – переменные-модераторы, характеризующие взаимодействие каждого из показателей объективного сна с типом заболевания. На втором и третьем шаге переменные добавлялись пошагово, т.е. выявлялся наиболее оптимальный статистически набор предикторов. При этом если на третьем шаге было выявлено значимое улучшение процента объясняемой дисперсии, на втором шаге соответствующие объективные переменные дополнительно возвращались в анализ, чтобы проверить, действительно ли можно говорить о полноценном эффекте модерации. Значимое улучшение модели на втором шаге указывало на общие для всех пациентов с СОАС или для пациентов с инсомнией предикторы их оценки сна, на третьем – предикторы, специфические для пациентов с СОАС или для пациентов с инсомнией.

Учет диагноза и объективных показателей конкретной ночи позволил объяснить 29.2% дисперсии в субъективных оценках пациентами конкретной ночи (табл. 2). Очевидно, что пациенты с инсомнией оценивают свою ночь в лаборатории хуже, чем пациенты с СОАС. При этом обе группы пациентов в оценке сна ориентируются скорее на длительность бодрствования во сне, нежели на сам сон. Помимо этого, пациенты с инсомнией лучше оценивают конкретную ночь при менее длительной первой стадии сна и при большей эффективности сна, чего не отмечается у пациентов с СОАС.

Общая оценка сна еще более зависит от диагноза, нежели конкретная оценка ночи (табл. 3) – иными словами, пациенты с инсомнией в целом склонны оценивать свои ночи хуже, чем пациенты с СОАС, и эти различия не сводятся к объективным различиям в том, как они спят. В оценке сна в целом на первый план для всех пациентов выступает длительность дельта-сна, а для пациентов с инсомнией – еще и общий индекс сна. В целом, тип заболевания и объективные показатели сна позволяют предсказать 40.2% дисперсии в общих субъективных оценках своего сна.

Психологические факторы субъективной оценки сна у пациентов с СОАС и инсомнией: результаты анализа модерации

С целью выявления психологических факторов субъективной оценки ночи и сна в целом у пациентов с СОАС и инсомнией в регрессионный анализ (в качестве базовых использовались модели, установленные в предыдущем разделе) последовательно добавлялся каждый из возможных факторов и переменная, характеризующая взаимодействие этого фактора с клинической группой. В частности, в анализ последовательно включались показатели тревоги, депрессии, дневной сонливости, общий показатель уязвимости своего сна, а также представления о тех причинах нарушений своего сна, которые были относительно распространены в нашей выборке – стресс, жизненные события, колебания настроения, болезнь, неприятные ощущения в руках и ногах, храп, ощущение удушья (апноэ), смена времен года. Улучшение процента объясняемой дисперсии на этом этапе свидетельствовало, что, независимо от объективной картины сна и диагноза, психологические факторы связаны с субъективной его оценкой.

После статистического контроля клинической группы и объективной картины сна, лишь один эффект достиг уровня статистической тенденции ($\Delta R^2 = 2.6\%$, $p < 0.07$): лучше оценивают свой сон в целом пациенты с более низким уровнем депрессии (основной эффект $\beta = -0.18$, $p < 0.05$), у пациентов с инсомнией этот эффект выражен сильнее (эффект взаимодействия, $\beta = 0.15$, $p < 0.07$).

Далее мы предположили, что такие факторы как тревога, депрессия, сонливость и представления о своем сне могут сказываться на субъективной оценке сна не напрямую, а косвенно – лишь при некоторых особенностях объективного сна. Например, пациенты с высоким уровнем тревожности тяжелее воспринимают нехватку глубокого сна и потому оценивают свой сон в целом более пессимистично. С целью проверки данной гипотезы в модель последовательно в качестве независимых переменных добавлялись тревога, депрессия, субъективная уязвимость сна и сонливость, а затем переменные, характеризующие их взаимодействие с объективными предикторами субъективной оценки сна. В отношении общей оценки сна был выявлен эффект взаимодействия длительности дельта-сна и тревоги ($\beta = -0.14$, $p < 0.05$, $\Delta R^2 = 2.0\%$, $p < 0.05$), при этом основной эффект тревоги достигал уровня тенденции ($\beta = -0.13$, $p < 0.10$). В частности, при более высоком уровне тревоги как пациенты с инсомнией, так и пациенты с апноэ на уровне тенденции хуже оценивают свой сон в целом, однако принятого уровня значимости ($p < 0.05$) этот эффект достигает лишь при достаточной продолжительности дельта-сна. Как показывают простые регрессии (сравнение регрессий в расщепленных по одной из переменной выборок, которое используется для интерпретации и иллюстрации эффектов взаимодействия), при более низкой продолжительности дельта-сна эффекта тревоги в отношении оценки сна у пациентов не отмечается, тогда как при большей длительности дельта-сна высокий уровень тревоги сопряжен с худшей оценкой своего сна в целом ($\beta = 0.08$, $p = 0.20$ и $\beta = -0.36$, $p < 0.01$ соответственно).

Помимо этого, был установлен эффект взаимодействия длительности дельта-сна и субъективной уязвимости сна к действию различных факторов ($\beta = -0.21$, $p < 0.01$, $\Delta R^2 = 4.1\%$, $p < 0.01$). Интересно, что по результатам простых регрессий при более низкой продолжительности дельта-сна представление об уязвимости своего сна парадоксально связано с лучшей оценкой сна в целом, тогда как при более высокой его продолжительности – с худшей оценкой своего сна ($\beta = 0.22$, $p < 0.05$ и $\beta = -0.23$, $p < 0.05$ соответственно).

В отношении оценки конкретной ночи эффектов модерации выявлено не было.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Итак, первая гипотеза исследования получила частичное подтверждение: с одной стороны, как у пациентов с СОАС, так и у пациентов с инсомнией субъективная оценка своего сна в средней степени зависит от оценки конкретной ночи (общий процент дисперсии между двумя показателями менее 32%). С другой стороны, связь субъективной оценки сна с тревогой и депрессией (но не сонливостью и субъективной уязвимостью сна) отмечается лишь в группе пациентов с СОАС, но не пациентов с инсомнией. Интересно, что этот результат свидетельствует также против гипотезы об инсомнии как модели хронического стресса, по крайне мере, градуально этот эффект не подтверждается, поскольку требует нарастания тревоги и депрессии одновременно с нарастанием выраженности нарушений сна. Мы предполагаем, что у пациентов с инсомнией тревога и депрессия "встроены" в процесс регуляции сна, опосредствуя его (например, по типу модерации), и при хронической инсомнии корреляции тревоги, депрессии и качества сна нивелируются. Наоборот, у пациентов с СОАС, где тревога и депрессия не включены в этилогию и патогенез заболевания, они напрямую связаны с оценкой своего сна. Предварительно можно предполагать, что такая же связь тревоги и депрессии с субъективным качеством сна может отмечаться у хорошо спящих испытуемых. Однако эти предположения требуют дальнейших исследований.

В соответствии со второй гипотезой, общая оценка сна более тесно связана с длительностью засыпания и латентным периодом дельта-сна, тогда как конкретная оценка ночи – с продолжительностью дельта-сна, быстрого сна и количеством циклов сна. Поскольку эти особенности характерны как для пациентов с СОАС, так и для пациентов с инсомнией, можно предварительно предполагать, что в целом при принятии решения о своем сне в целом пациенты с нарушениями сна ориентируются на динамические параметры – скорость наступления сна и скорость наступления глубокого сна, тогда как длительность различных стадий, структура сна более важна для оценки конкретной ночи, но отходит на второй план при обобщении разных ночей.

В рамках проверки второй гипотезы интересен тот результат, что пациенты с инсомнией оценивают свой сон хуже, чем пациенты с СОАС, и эти различия не сводятся к объективной картине сна. С нашей точки зрения, этот результат согласуется с положениями психологии телесности [10] и когнитивными моделями инсомнии [8], указывая на то, что при инсомнии нарушения сна расцениваются пациентами как более выраженные и мучительные, чем в действительности, поскольку сочетаются с переживаниями и руминациями по поводу сна, а также особой важностью сна и постоянным вниманием к нему. Другой результат в пользу второй гипотезы получен в рамках корреляционного анализа: как общая, так и ситуативная оценка сна при инсомнии связана со значительно более широким кругом показателей объективного сна, чем при СОАС. С нашей точки зрения, гипертрофированное внимание к засыпанию и пробуждениям, постоянные попытки регуляции сна сопряжены у пациентов с инсомнией с обостренной чувствительностью к своему сну. В некотором смысле, этот процесс можно охарактеризовать как попытки компенсации своего нарушения за счет внимания к небольшим особенностям сна, которые неизбежно [19] оказываются неэффективными, порождая у пациента ощущение, что "все нарушено".

Третья гипотеза о роли тревоги, депрессии, сонливости и представлений о причинах нарушений сна была опровергнута в первой формулировке: после статистического контроля диагноза и объективной картины сна, психологические факторы не были связаны с субъективной оценкой пациентами своего сна. Единственное возможное исключение касается депрессии, которая на уровне тенденции была сопряжена с худшей оценкой своего сна, особенно при инсомнии. При этом был получен ряд данных в пользу третьей гипотезы в формулировке об опосредствующей

роли психологических факторов. Так, если при меньшей продолжительности дельта-сна все пациенты склонны оценивать свой сон низко, то при большей его продолжительности оценка сна начинает зависеть от тревоги и представления об уязвимости своего сна: пациенты с более высоким уровнем тревожности и считающие свой сон уязвимым к действию различных факторов, оценивают свой сон хуже, чем пациенты с низкой тревожностью и не считающие так, как эти пациенты. Данный результат крайне интересен в контексте существующей гипотезы, что инсомния может рассматриваться как модель хронического стресса [12]. При этом сам процесс хронификации инсомнии рассматривается как сложное взаимодействие тревожно-депрессивных переживаний и нарушений сна. Результаты позволяют предполагать, что роль тревожно-депрессивных переживаний в процессе хронификации инсомнии меняется с ведущей на амплифицирующую, т.е. искажающую оценку сна лишь в случаях его относительно благополучия. Другими словами, пока пациент ощущает, что спал плохо (на основе тех объективных признаков, на которые ориентируется), "порочный круг" хронификации заболевания может развиваться без участия тревоги и депрессии, но именно тревожность сопряжена с негативной оценкой и благополучных ночей. Следует отметить, что в рамках когнитивного подхода подобные искажения по типу "негативного фильтра" хорошо описаны [29].

Таким образом, общая оценка своего сна пациентами с различными диагнозами не только не является автоматическим выводом на основе ситуативных оценок конкретной ночи, но и связана с другими объективными показателями сна, нежели оценки конкретной ночи. Общая оценка сна более тесно связана с длительностью засыпания и латентным периодом дельта-сна, тогда как конкретная оценка ночи – с продолжительностью дельта-сна, быстрого сна и количеством циклов сна. При инсомнии, в отличие от синдрома обструктивного апноэ во сне, оценка сна более негативна (при той же объективной картине сна) и связана с более широким кругом объективных параметров, что может объясняться гипертрофированным вниманием пациентов с инсомнией к своему сну и нюансам своего состояния. Вопреки существующим представлениям о ключевой роли тревоги и депрессии не только в развитии, но и в хронификации инсомнии, они связаны с субъективным качеством сна пациентов не напрямую, а косвенно: так, тревожность и представления о хрупкости сна связаны с худшей оценкой своего сна лишь при более благоприятной объективной картине сна.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при поддержке РФФИ, проект № 17-06-00363 "Когнитивные механизмы нарушений сна и их формирование в онтогенезе".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Вейн А.М.* Сон: тайны и парадоксы. М. Эйдос Медиа. 2003 [*Vein A.M.* Son: tayny i paradoksy [Sleep: secrets and paradoxes.] Moscow. Eidos-Media. 2003. (In Russ)].
2. *Горцева А.Ю., Коростовцева Л.С., Бочкарев М.В., Свиряев Ю.В., Конради А.О.* Роль субъективных методов в оценке качества сна. Журн. неврол. психиатр им. С.С. Корсакова. 117(4–2). 34–41. 2017. [*Gortseva A.Yu., Korostovtseva L.S., Bochkarev M.V., Sviryaev Yu.V., Konradi A.O.* The role of subjective methods for the evaluation of sleep quality. Zhurn. Nevrol. Psikhiatr im. S.S. Korsakova. 117 (4–2): 34–41. 2017. (In Russ)].
3. *Rezaie L., Fobian A.D., McCall W.V., Khazaie H.* Paradoxical insomnia and subjective-objective sleep discrepancy: A review. Sleep Med. Rev. 40: 96–202. 2018. doi: 10.1016j.smrv.2018.01.002
4. *Ковальзон В.М.* Основы сомнологии: физиология и нейрохимия цикла "бодрствование-сон". М. Бином. 2012 [*Kovalzon V.M.* Osnovy somnologii: fiziologiya i neyrokhimiya tsikla "bodrstvovaniye-son". [Fundamentals of somnology: physiology and neurochemistry of the circle "wake-sleep"]. Moscow. Binom. 2012 (In Russ)].
5. *Краткое руководство по клинической сомнологии. Учебное пособие.* Под общей ред. проф. Г.В. Коврова. М. МЕДпресс-информ 2018. [Kratkoye rukovodstvo po klinicheskoy som-

nologii. Uchebnoye posobiye. [Brief manual on clinical somnology. G.V. Kovrov (Ed.). Moscow. MEDpress-inform. 2018. (In Russ)].
6. *Harvey A.G., Tang N.K.Y.* (Mis) perception of sleep in insomnia: a puzzle and a resolution. Psychol. Bull. 138(1): 77–101. 2012.
7. *Feige B., Al-Shajlawi A., Nissen C., Voderholzer U., Hornyak M., Spiegelhalder K., Kloepfer C., Perlis M., Riemann D.* Does REM sleep contribute to subjective wake time in primary insomnia? A comparison of polysomnographic and subjective sleep in 100 patients. J. Sleep Res. 17: 180–190. 2008.
8. *Perlis M., Shaw P.J., Cano G., Espie C.A.* Models of insomnia. In: M. Kryger, T. Ross, W. Dement (Eds.). Principles and Practice of Sleep Medicine. Elsevier Saunders. Philadelphia. 2 850–865. 2011.
9. *Morin C.M.* Insomnia: psychological assessment and management. N.Y. Guilford Press. 1993.
10. *Рассказова Е.И., Тхостов А.Ш.* Клиническая психология сна и его нарушений. М. Смысл. 2012. [*Rasskazova E.I., Tkhostov A.Sh.* Klinicheskaya psikhologiya sna i ego narusheniy. [Clinical psychology and sleep and its' disorders.] Moscow. Smysl. 2012. (In Russ)].
11. *Koffel E., Watson D.* The two-factor structure of sleep complaints and its relation to depression and anxiety. J. Abnormal. Psychol. 118(1): 183–194. 2009.
12. *Инсомния: современные диагностические и лечебные подходы.* Под ред. Я.И. Левина. М. Медпрактика. 2005. [Insomniya: sovremennyye diagnosticheskiye i lechebnyye podkhody. Pod red. Ya.I. Levina [Insomnia: modern diagnostic and treatment approaches. J.I. Levin (Ed.). Moscow. Medpraktika. 2005. (In Russ)].
13. *Varkevisser M., van Dongen H.P.A., van Amsterdam J.G.C., Kerkhof G.A.* Chronic insomnia and daytime functioning: an ambulatory assessment. Behav. Sleep Med. 5: 279–296. 2007.
14. *Fichten C.S., Creti L., Amsel R., Brender W., Weinstein N., Libman E.* Poor sleepers who do not complain insomnia: Myths and realities about psychological and lifestyle characteristics of older good and poor sleepers. J. Behav. Med. 18: 189–223.1995.
15. *Chambers M.J., Alexander S.D.* The role of state-trait anxiety in insomnia and daytime restedness. Behav. Med. 19: 42–46.1993.
16. *Semler C.N., Harvey A.G.* Daytime functioning in primary insomnia: does attentional focus contribute to real or perceived impairment. Behav. Sleep Med. 4(2): 85–103.2006.
17. *Croenlein T., Lehner A., Schuessler P., Geisler P., Rupprecht R., Wetter T.C.* Changes in Subjective-Objective Sleep Discrepancy Following Inpatient Cognitive Behavior Therapy for Insomnia. Behav. Therapy. 2019. 50(5): 994–1001.
doi: 10.1016j.beth.2019.03.002
18. *Mitchell L.J., Bisdounis L., Ballesio A., Omlin X., Kyle S.D.* The impact of cognitive behavioural therapy for insomnia on objective sleep parameters: A meta-analysis and systematic review. Sleep Med. Rev. 2019. 47: 90–102.
doi: 10.1016j.smrv.2019.06.002
19. *Тхостов А.Ш.* Психология телесности. М. Смысл, 2002 [*Tkhostov A.Sh.* Psikhologiya telesnosti. [Psychology of embodiment]. Moscow. Smysl. 2002. (In Russ.)].
20. *Николаева В.В.* Личность в условиях хронического соматического заболевания. В кн.: Соколова Е.Т., Николаева В.В. Особенности личности при пограничных расстройствах и соматических заболеваниях. М. SvR-Аргус. 207–245. 1995. [*Nikolaeva, V.V.* Personality under chronic somatic illness. In: Sokolova, E.T., Nikolaeva, V.V. Personality under borderline disorders and somativ illnesses. Moscow: SvR-Argus. 207–245. 1995. (In Russ)].
21. *Вассерман Л.И., Трифонова Е.А., Щелкова О.Ю.* Психологическая диагностика и коррекция в соматической клинике. Практическое руководство. СПб. Речь. 2011. [*VassermanL.I., Trifonova E.A., Shchelkova O.Yu.* Psikhologicheskaya diagnostika i korrektsiya v somaticheskoy klinike. Prakticheskoye rukovodstvo. [Psychological diagnostics and correction in somatic clinic. Practical manual. Sankt-Petersburg. Rech'. 2011. (In Russ)].
22. *Leventhal H., Brissette I., Leventhal E.* The common-sense model of self-regulation of health and illness. In: The self-regulation of health and illness behavior. L.D. Cameron, H. Leventhal (Eds). N.Y. Routledge. 42–65. 2003.
23. *Espie C.A., Broomfield N.M., MacMahon K.M.A., Macphee L.M., Taylor L.M.* The attention-intention-effort pathway in the development of psychophysiologic insomnia: a theoretical review. Sleep Med. Rev. 10: 215–245. 2006.
24. *Johns M.W.* A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale. Sleep. 14: 540–545.1991.
25. *Zigmond A.S., Snaith R.P.* The Hospital Anxiety and Depression Scale. Acta Psychiatria Scand. 67(6): 361–370.1983.
26. *Сыропятов О.Г., Дзеружинская Н.А., Астапов Ю.Н., Иванцова Г.В.* Ранняя диагностика и лечение депрессии в общей медицинской практике. Киев. Гелариум-тест. 2003 [*Syropyatov O.G., Dzeruzhinskaya N.A., Astapov Yu.N., Ivantsova G.V.* Rannyaya diagnostika i lecheniye depressii v obshchey meditsinskoy praktike. Kiyev. Gelarium-test. [Early diagnostic and treatment of depression in general medicine practice.] Kiev. Gelarium-test. 2003. (In Russ)].
27. *Рассказова Е.И., Ковров Г.В., Мачулина А.И.* Субъективные представления о причинах нарушения сна у пациентов с инсомнией, парасомнией и апноэ во сне и их связь с психологическим благополучием. Вестн. Московск. универ. Серия 14. Психология. 2: 45-63.2019. [R*asskazova E.I., Kovrov, G.V., Machulina. A.I.* Subjective beliefs about reasons of sleep dis-

orders in patients with insomnia, parasomnia and sleep apnea and their relationship to psychological well-being. Vestn. Moscow University. Seria 14. Psychology. 2: 45–63. 2019. (In Russ)].
28. *Iber C., Ancoli-Israel S., Chesson A., Quan S.F.* The American Academy of Sleep Medicine Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events: Rules. Terminology and Technical Specifications. 1st ed. Westchester, Illinois: Am. Acad. Sleep Med. 2007.
29. *Бек А., Раш А., Шо Б., Эмери Г.* Когнитивная терапия депрессии. Спб. Питер 2003. [*Beck A., Rush A., Shaw B., Emery G.* Cognitive therapy of depression. Sankt-Petersburg, 2003 (Russ. Ed.: Bek A., Rash A., Sho B., Emeri G. Kognitivnaya terapiya depressii. Spb. Piter 2003)].

Objective and Psychological Predictors of Appraisal of Sleep in Patients with Insomnia and Sleep Apnea Syndrom

E. I. Rasskazova[a], *, G. V. Kovrov[b], and A. I. Machulina[c]

[a]*Moscow State University, Mental Health Research Center, Moscow, Russia*
[b]*Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia*
[c]*Brothers Bakhrushin Moscow Clinical Hospital, Moscow, Russia*
**e-mail: e.i.rasskazova@gmail.com*

The mismatch between the objective and subjective quality of sleep is a relevant theoretical and practical problem, mostly because the complaints of the patients with sleep disorders are the result of a personal generalization of subjective assessments of sleep and wakefulness over a certain period. The aim of this study was the assessment of the objective and psychological factors of subjective sleep appraisals at a particular night and in general in patients with insomnia and obstructive sleep apnea. 77 patients with sleep apnea syndrome and 105 patients with chronic insomnia underwent a neurological examination, filled out a Sleep Quality Checklist, a Screening for Sleep Apnea, an Epworth Sleepiness Scale, a Hospital Anxiety and Depression Scale, and a Checklist for Subjective Reasons of Sleep Disorders. After that, the polysomnography was performed for 1 night in 46 patients with apnea (objective data on breathing in 68 patients) and 93 patients with insomnia. We demonstrate that the general appraisal of sleep by patients with various diagnoses, rather than the appraisals of a specific night, is associated with the other objective indicators of sleep quality. A general appraisal of sleep is associated with the duration of falling asleep and the latent period of delta sleep, while a specific appraisal of sleep quality is associated with the duration of delta sleep, REM sleep and the number of sleep cycles. In case of insomnia, in contrast to obstructive sleep apnea, sleep appraisals were more negative (with the same objective sleep quality) and were associated with a wider range of objective parameters, which can be explained by the excessive attention of the patients with insomnia to their sleep and the nuances of their condition. Psychological factors were indirectly associated with the subjective quality of sleep in patients: anxiety and beliefs about the sensitivity of sleep to various factors were associated with the worst assessment of their sleep only in the cases when the objective assessment of the sleep quality was more favorable.

Keywords: objective sleep quality, subjective appraisals of sleep, insomnia, obstructive sleep apnea syndrome, anxiety, depression

ЦИТИРОВАТЬ:

Рассказова Е.И., Ковров Г.В., Мачулина А.И. Объективные и психологические факторы оценки своего сна у пациентов с инсомнией и синдромом апноэ во сне. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(1): 84–96.

DOI: 10.31857/S0869813920010094

TO CITE THIS ARTICLE:

Rasskazova E.I., Kovrov G.V., Machulina A.I. Objective and Psychological Predictors of Appraisal of Sleep in Patients with Insomnia and Sleep Apnea Syndrom. Russian Journal of Physiology. 106(1): 84–96.

DOI: 10.31857/S0869813920010094

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 1, с. 97–109

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ВЛИЯНИЕ С-ПЕПТИДА ПРОИНСУЛИНА И ИНСУЛИНА НА ГОНАДНУЮ И ТИРЕОИДНУЮ СИСТЕМЫ У САМЦОВ КРЫС С МЯГКОЙ ФОРМОЙ САХАРНОГО ДИАБЕТА 1-ГО ТИПА

© 2020 г. К. В. Деркач[1], В. М. Бондарева[1], А. О. Шпаков[1, *]

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

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

Поступила в редакцию 29.10.2019 г.
После доработки 31.10.2019 г.
Принята к публикации 01.11.2019 г.

Сахарный диабет 1-го типа (СД1) характеризуется дефицитом как инсулина, так и С-пептида, являющегося модулятором активности инсулиновых сигнальных путей. Заместительная терапия С-пептидом при СД1 улучшает метаболические показатели, восстанавливает функции нервной и выделительной систем. Предполагают, что через центральные механизмы эта терапия может восстанавливать функции эндокринной системы, нарушенные при СД1. Для компенсации дефицита С-пептида в ЦНС может быть применен интраназальный способ его введения. Цель работы состояла в изучении влияния лечения (9 дней) самцов крыс Вистар с моделью мягкого СД1, вызванного низкой дозой стрептозотоцина (35 мг/кг), с помощью интраназально вводимых С-пептида (36 мкг/крысу/день) и инсулина (20 мкг/крысу/день), совместно или раздельно, на гормональные показатели тиреоидной и гонадной систем, а также на активность аденилатциклазы (АЦ) в мембранах, выделенных из щитовидной железы и семенников. Фермент АЦ вовлечен в регуляцию синтеза тиреоидных гормонов в тироцитах и тестостерона в клетках Лейдига. В крови оценивали уровни тиреотропного (ТТГ) и лютеинизирующего гормонов (ЛГ), тиреоидных гормонов, тестостерона, инсулина и лептина. Лечение крыс совместно С-пептидом и инсулином ослабляло гипергликемию, несмотря на сохранение гипоинсулинемии, восстанавливало сниженные уровни трийодтиронина, тестостерона и лептина, нормализовало уровень ТТГ, повышенный в условиях СД1, но не влияло на уровень ЛГ, который при СД1 также не менялся. Одним из механизмов нормализации функций тиреоидной и гонадной систем при лечении инсулином и С-пептидом было восстановление стимулирующего эффекта ТТГ на активность АЦ в мембранах щитовидной железы и соответствующего эффекта хорионического гонадотропина человека в тестикулярных мембранах. Монотерапия инсулином была менее эффективной, в то время как монотерапия С-пептидом частично восстанавливала андрогенный статус только на третий день после начала лечения. Таким образом, нами показано потенцирующее влияние С-пептида на вызываемое инсулином восстановление функций тиреоидной и гонадной систем у крыс с мягким СД1, в основе чего, как мы полагаем, лежит усиление инсулинового сигналинга в гипоталамусе в присутствии С-пептида.

Ключевые слова: С-пептид, инсулин, интраназальное введение, гипоталамус, аденилатциклаза, сахарный диабет, щитовидная железа, семенники, тестостерон

DOI: 10.31857/S0869813920010045

С-пептид проинсулина, продукт биосинтеза инсулина, образуется при сайт-специфичном гидролизе проинсулина в β-клетках поджелудочной железы. Соответствующая С-пептиду аминокислотная последовательность обеспечивает такое взаимное расположение А- и В-цепей в проинсулине, которое позволяет образовать между ними "правильные" дисульфидные связи и, тем самым, способствует синтезу биологически активных форм инсулина [1–3]. В дальнейшем, взаимодействие *N*-концевого участка С-пептида с инсулином в секреторных гранулах β-клеток способствует сохранению запасенного в них инсулина в биологически активной форме [3]. В настоящее время имеются свидетельства того, что уже после секреции в кровоток взаимодействие между С-пептидом и инсулином не прекращается. Оно необходимо как для обеспечения стабильности структуры молекулы инсулина, так и для реализации его регуляторных эффектов на ткани-мишени. Взаимодействие С-пептида с инсулином приводит к диссоциации олигомерных инсулиновых комплексов и препятствует агрегации образующихся в результате этого мономерных форм гормона, что является одним из механизмов регуляции активности инсулина [3–5]. Полагают, что С-пептид функционирует как шаперон и коактиватор инсулина.

В условиях инсулин-дефицитных состояний, в первую очередь при сахарном диабете 1-го типа (СД1), снижается не только уровень инсулина, но и С-пептида. Заместительная терапия инсулином не может компенсировать дефицит эндогенного С-пептида, что приводит к нарушению равновесия между инсулином и С-пептидом в крови и тканях-мишенях. В результате меняется фармакокинетика инсулина, снижается его способность регулировать инсулин-зависимые сигнальные системы. Нами ранее было показано, что совместное применение инсулина и С-пептида более эффективно восстанавливает метаболические и гормональные показатели при СД1 в сравнении с монотерапией инсулином [6, 7]. Следует отметить, что С-пептид и сам наделен сигнальными функциями. Связываясь со специфичными к нему рецепторами, в том числе с рецептором GPR146, С-пептид активирует NO-зависимые и 3-фосфоинозитидные сигнальные пути и каскад митогенактивируемых протеинкиназ [8, 9]. Одной из его мишеней являются гипоталамические нейроны, регулируя активность которых С-пептид самостоятельно или совместно с инсулином влияет на энергетический обмен и физиологические процессы на периферии.

В условиях СД1 в значительной степени нарушаются функции гонадной и тиреоидной систем, что приводит к изменению продукции половых стероидных гормонов в семенниках и яичниках и продукции тиреоидных гормонов тироцитами щитовидной железы [10–14]. Причиной этого может быть не только дефицит инсулина, но и С-пептида, который продуцируется β-клетками в соотношении 1 : 1 с инсулином. На основании этого можно предположить, что при СД1 лечение С-пептидом, в том числе совместно с инсулином, может положительно влиять на функции гонадной и тиреоидной систем. В пользу этого свидетельствуют данные о восстанавливающем эффекте С-пептида на метаболические показатели и функции нервной и выделительной систем при лечении им животных с экспериментальным СД1 и пациентов с СД1 и диабетической нефропатией [15–21]. Следует, однако, отметить, что в экспериментальных условиях эффективность С-пептида изучается на моделях тяжелого или среднетяжелого СД1, вызванного высокими дозами стрептозотоцина, или генетически обусловленного СД1, для которого характерен острый дефицит инсулина и С-пептида. Эти модели отличаются от СД1 человека, поскольку дефицит инсулина у диабетических пациентов в значительной степени компенсируется инсулиновой терапией. Более приближенными к СД1 человека, в том числе по дисфункциям эндокринной системы, являются модели мягкого СД1, вызванного сравнительно низкими дозами стрептозотоцина [14].

Целью исследования было изучение восстанавливающего эффекта интраназально вводимых С-пептида и инсулина на функции тиреоидной и гонадной систем у сам-

цов крыс с мягким СД1. При таком способе введения С-пептид и инсулин поступают в структуры мозга, минуя гематоэнцефалический барьер, что позволяет компенсировать их дефицит в ЦНС, возникающий в условиях СД1, и восстановить регуляторное влияние С-пептида и инсулина на гипоталамические нейроны, вовлеченные в функционирование гипоталамо-гипофизарно-гонадной и гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной осей. В ходе исследования изучали влияние совместного интраназального введения С-пептида и инсулина, в сравнении с их раздельным введением, на уровни тиреотропного (ТТГ) и лютеинизирующего гормонов (ЛГ), тиреоидных гормонов и тестостерона в крови, а также на активность аденилатциклазной сигнальной системы в щитовидной железе и семенниках крыс с мягким СД1. Выбор в качестве объекта исследования аденилатциклазной системы обусловлен тем, что в тироцитах она вовлечена в ТТГ-индуцированную стимуляцию продукции тироксина, предшественника эффекторного гормона тиреоидной оси трийодтиронина, а в клетках Лейдига она отвечает за стимулированный гонадотропинами синтез тестостерона [11, 22].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для экспериментов использовали самцов крыс Вистар. В начале эксперимента, перед индукцией СД1, возраст животных составил 2.5 месяца. Крыс содержали в стандартных условиях со свободным доступом к корму и воде. Эксперименты выполняли в соответствии с требованиями Комитета по биоэтике ИЭФБ РАН (15.02.2018 г.) и правилами и положениями European Communities Council Directive 1986 (86/609/EEC) и “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”.

Для индукции мягкой формы СД1 крыс однократно обрабатывали стрептозотоцином (Sigma, США) в низкой дозе 35 мг/кг (в/б). Контрольным животным (К, $n = 6$) вводили растворитель стрептозотоцина – 0.1 М натрий-цитратный буфер (pH 4.5). Через неделю для формирования диабетической группы отбирали животных с уровнем постпрандиальной глюкозы в крови выше 11 мМ. Концентрацию глюкозы определяли с помощью тест-полосок One Touch Ultra (США) и глюкометра Life Scan Johnson & Johnson (Дания) через 2 ч после еды в образцах крови, полученной из хвостовой вены. Через 10 недель после индукции СД1 крыс рандомизировали на 4 группы: без лечения (Д, $n = 6$), с лечением интраназально вводимыми инсулином (ИИ) в суточной дозе 20 мкг/крысу (ДИ, $n = 6$) или С-пептидом в суточной дозе 36 мкг/крысу (ДС, $n = 6$), с лечением совместно ИИ и С-пептидом в тех же дозах (ДИС, $n = 6$). Лечение продолжали в течение 9 дней, препараты вводили дважды в день. По окончании эксперимента, через 2 ч после введения препаратов, крыс декапитировали под наркозом, забирали у них образцы крови, ткани щитовидной железы и семенников для дальнейших исследований.

В крови оценивали уровни глюкозы, гликированного гемоглобина (HbA1c), инсулина, лептина, ЛГ, ТТГ, тестостерона, тиреоидных гормонов – свободного и общего тироксина (fT4, tT4) и свободного и общего трийодтиронина (fT3, tT3). Уровень HbA1c определяли с помощью набора Multi Test HbA1c System (Polymer Technology Systems, Inc., США), уровни инсулина, ТТГ, лептина и ЛГ – с помощью наборов Rat Insulin ELISA kit (Mercodia AB, Швеция), Rat TSH ELISA (Cusabio Biotech. Co., Ltd., Wuhan, Китай), ELISA kit for Leptin и ELISA kit for LH (Cloud-Clone Corp., США), уровень тестостерона – с помощью набора Тестостерон-ИФА (Алкор-Био, Россия), уровни тиреоидных гормонов – с помощью наборов фирмы Иммунотех (Россия).

Активность аденилатциклазы (АЦ), каталитического компонента аденилатциклазной сигнальной системы, оценивали во фракциях плазматических мембран, выделенных из щитовидной железы и семенников крыс. Выделение мембран из

щитовидной железы осуществляли по методу [23], с нашими модификациями [24], для чего образцы ткани промывали в 40 мМ Tris-HCl-буфере (pH 7.4), содержащем 5 мМ $MgCl_2$ (буфер А), измельчали, гомогенизировали в 10 объемах буфера А, содержащего ингибиторы протеаз (4°C). Полученный гомогенат центрифугировали (500 *g*, 15 мин), осадок отбрасывали, супернатант снова центрифугировали (10 000 *g*, 30 мин). Фракции тестикулярных мембран выделяли, как описано ранее [25], для чего при 4°C ткани семенников измельчали, гомогенизировали в буфере А, гомогенат центрифугировали (1500 *g*, 10 мин), осадок отбрасывали, супернатант снова центрифугировали (20 000 *g*, 30 мин). Полученные мембраны ресуспендировали в 50 мМ Tris-HCl-буфере (pH 7.4) и использовали для определения активности АЦ. Для этого мембраны (50–80 мкг белка) инкубировали в реакционной смеси, содержащей 50 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 5 мМ $MgCl_2$, 0.1 мМ цАМФ, 1 мМ АТФ, 37 КБк [α-^{32}P]АТФ, 20 мМ креатинфосфата, 0.2 мг/мл креатинфосфокиназы, в течение 12 мин при 37°C. Активность АЦ оценивали по количеству цАМФ, получающегося в ходе ферментативной реакции, и выражали в пмоль цАМФ/мин/мг белка. Базальную активность АЦ измеряли в отсутствие воздействий. Для определения активности АЦ использовали [α-^{32}P]АТФ (150 ГБк/ммоль) (Всерегиональное объединение "Изотоп", Россия), для оценки ее регуляторных свойств использовали ТТГ из гипофиза быка Sigma-Aldrich (США) и хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) (Московский эндокринологический завод, Россия).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, США). Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения двух выборок с нормальным распределением использовали *t*-критерий Стьюдента, для сравнения трех и более групп – дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони. Статистически значимыми считали отличия при $p < 0.05$. Данные представлены как $M \pm SD$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У крыс с мягкой формой СД1 были снижены масса тела и уровни инсулина и лептина и повышены уровни постпрандиальной глюкозы и HbA1c, что указывает на развитие у них умеренной гипергликемии (табл. 1). При лечении в течение 9 дней интраназально вводимым С-пептидом отмечали тенденцию к нормализации уровня лептина, хотя различия с группой Д не были статистически значимыми, в то время как уровни глюкозы, HbA1c и инсулина в группе ДС менялись слабо. Совместное лечение ИИ и С-пептидом достоверно снижало уровни глюкозы и HbA1c и повышало уровень лептина, в то время как в группе ДИ отмечали тенденцию к восстановлению этих показателей, но различия с группой Д не были статистически значимыми (табл. 1). Поскольку ослабление гипергликемии в группах ДИС и ДИ не сопровождалось повышением уровня инсулина, то причиной этого является либо повышение чувствительности тканей к инсулину, либо уменьшение продукции глюкозы гепатоцитами.

На следующем этапе изучали гормональный статус тиреоидной и гонадной осей, для чего в крови животных оценивали уровни ТТГ и ЛГ, а также тиреоидных гормонов и тестостерона. В условиях мягкого СД1 уровень ТТГ повышался (+74%, $p < 0.05$ в сравнении с контролем), в то время как концентрация fT3 и tT3 снижалась (–21 и –39%, $p < 0.05$) (табл. 1). Концентрация тироксина в группе Д в сравнении с контрольными животными существенно не менялась. Лечение С-пептидом слабо влияло на гормональные показатели тиреоидной оси, в то время как лечение ИИ и совместно С-пептидом и ИИ нормализовало уровень ТТГ и повышало уровни fT3 и tT3 до их значений в контроле. Совместное лечение ИИ и С-пептидом было более эффективным, на что указывает достоверное повышение уровней трийодтиро-

Таблица 1. Масса тела, уровни глюкозы, гликированного гемоглобина, инсулина, лептина, ТТГ, ЛГ и тиреоидных гормонов у крыс с мягким сахарным диабетом 1-го типа и влияние на них лечения С-пептидом и инсулином совместно и по раздельности
Table 1. The body weight and the levels of glucose, glycated hemoglobin, insulin, leptin, TSH, LH and thyroid hormones in rats with mild type 1 diabetes mellitus and the effect of the treatment with C-peptide and insulin in the conditions of their separate and joint administration.

	К C	Д D	ДС DC	ДИ DI	ДИС DIC
Масса, г Weight, g	329 ± 13	278 ± 18*	277 ± 33*	297 ± 25*	294 ± 24*
Глюкоза, мМ Glucose, mM	4.6 ± 0.4	12.6 ± 2.8*	12.1 ± 2.6*	9.5 ± 1.3*	8.8 ± 1.7*#
HbA1c, % HbA1c, %	4.1 ± 0.2	7.9 ± 0.8*	7.7 ± 1.2*	6.6 ± 1.0*	5.8 ± 1.2*#
Инсулин, нг/мл Insulin, ng/ml	0.78 ± 0.20	0.31 ± 0.08*	0.33 ± 0.19*	0.30 ± 0.12*	0.32 ± 0.11*
Лептин, нг/мл Leptin, ng/ml	3.13 ± 0.73	2.07 ± 0.49*	2.43 ± 0.57	2.17 ± 0.70	2.98 ± 0.60#
ТТГ, мкМЕ/мл TSH, μIU/ml	0.66 ± 0.28	1.15 ± 0.27*	1.04 ± 0.31	0.76 ± 0.14#	0.78 ± 0.16#
fT4, пМ fT4, pM	33.3 ± 2.7	29.6 ± 2.7	33.1 ± 3.2	33.3 ± 4.7	33.5 ± 3.7
tT4, нМ tT4, nM	108.8 ± 12.3	99.7 ± 11.1	102.3 ± 7.2	105.3 ± 16.6	110.2 ± 15.4
fT3, пМ fT3, pM	7.5 ± 1.2	5.9 ± 0.6*	6.3 ± 0.6	7.1 ± 0.5#	8.1 ± 0.6#@
tT3, нМ tT3, nM	3.3 ± 0.5	2.0 ± 0.4*	2.5 ± 0.3*	2.9 ± 0.3#	3.6 ± 0.5#@
ЛГ, а LH, a	1.70 ± 0.21	1.78 ± 0.16	2.05 ± 0.26	1.69 ± 0.15	1.99 ± 0.25
ЛГ, б LH, b	1.59 ± 0.25	1.74 ± 0.16	1.75 ± 0.22	1.68 ± 0.23	1.61 ± 0.20

К – контроль; Д – диабет; ДС – диабет с лечением С-пептидом (и/н, 36 мкг/крысу); ДИ – диабет с лечением инсулином (и/н, 20 мкг/крысу); ДИС – диабет с лечением совместно С-пептидом и инсулином. Измерение уровня ЛГ проводили на третий день лечения (а) и в конце эксперимента (б). * – различия с контролем статистически значимы при $p < 0.05$; # – различия с группой Д статистически значимы при $p < 0.05$; @ – различия между группами ДИ и ДИС статистически значимы при $p < 0.05$. В каждой группе $n = 6$, $M \pm SD$.
C – control; D – diabetes; DC – diabetes with C-peptide treatment (i.n., 36 μg/rat); DI – diabetes with insulin treatment (i.n., 20 μg/rat); DIC – diabetes with co-administered C-peptide and insulin. The LH levels were measured on the third day of treatment (a) and at the end of the experiment (b). * – the differences with control are statistically significant at $p < 0.05$; # – the differences with the group D are statistically significant at $p < 0.05$; @ – the differences between the DI and DIC groups are statistically significant at $p < 0.05$. In each group: $n = 6$, $M \pm SD$.

нина в группе ДИС в сравнении с группой ДИ (табл.1). Эти данные свидетельствуют о способности ИИ и его комбинации с С-пептидом эффективно восстанавливать тиреоидный статус у крыс с мягкой формой СД1.

Одной из причин ослабления функций тиреоидной оси может быть снижение чувствительности тироцитов к ТТГ. Для проверки этого изучали стимулирующее влияние ТТГ на активность АЦ в мембранах, выделенных из щитовидной железы диабетических крыс. В группе Д базальная активность АЦ существенно не менялась, в то

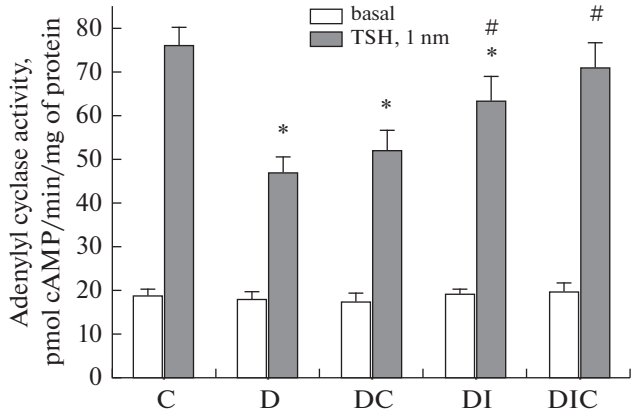

Рис. 1. Базальная и стимулированная ТТГ активность аденилатциклазы в мембранах щитовидной железы диабетических крыс и влияние на нее лечения С-пептидом и инсулином. К – контроль; Д – диабет; ДС – диабет с лечением С-пептидом (и/н, 36 мкг/крысу); ДИ – диабет с лечением инсулином (и/н, 20 мкг/крысу); ДИС – диабет с лечением С-пептидом и инсулином. * – различия с контролем статистически значимы при $p < 0.05$; # – различия с группой Д статистически значимы при $p < 0.05$. В каждой группе $n = 6$, $M \pm SD$.

Fig. 1. The basal and TSH-stimulated activities of adenylyl cyclase in the thyroidal membranes of diabetic rats and the effect of treatment with C-peptide and insulin on them. C – control; D – diabetes; DC – diabetes with C-peptide treatment (i.n., 36 μg/rat); DI – diabetes with insulin treatment (i.n., 20 μg/rat); DIC – diabetes with the treatment with C-peptide and insulin. * – the differences with control are statistically significant at $p < 0.05$; # – the differences with the group D are statistically significant at $p < 0.05$. In each group $n = 6$, $M \pm SD$.

время как стимулирующий АЦ эффект ТТГ (10^{-9} М) был снижен (рис. 1). В группах ДИ и ДИС отмечали частичное восстановление эффекта ТТГ, в большей степени в группе ДИС (рис. 1). Таким образом, лечение диабетических крыс ИИ и совместно ИИ и С-пептидом восстанавливает чувствительность АЦ тироцитов к ТТГ.

Уровень ЛГ в крови диабетических крыс не отличался от такового в контроле, несмотря на то, что уровень тестостерона в группе Д был достоверно снижен на протяжении всего эксперимента (табл. 1, рис. 2). Через 3 дня после начала лечения в группах ДС и ДИС отмечали тенденцию к повышению уровня ЛГ и достоверное повышение уровня тестостерона в крови (табл. 1, рис. 2). Однако через 9 дней ни в одной из групп уровень ЛГ не отличался от контрольных значений, в то время как уровень тестостерона в группе ДИС был достоверно выше, чем в группе Д (рис. 2). Эти данные указывают на повышение чувствительности клеток Лейдига к гонадотропинам при длительном лечении совместно ИИ и С-пептидом, что было подтверждено в экспериментах *in vitro*.

В тестикулярных мембранах крыс группы Д снижались как базальная, так и стимулированная ХГЧ (10^{-9} М) активность АЦ, причем эффект ХГЧ, оцениваемый по приросту над базальным уровнем активности, составил 53% от такового в контроле (рис. 3). В тестикулярных мембранах диабетических крыс, которых в течение 9 дней лечили ИИ или совместно ИИ и С-пептидом, стимулирующий эффект ХГЧ на активность АЦ частично восстанавливался, в наибольшей степени в группе ДИС. В группе ДС этот эффект менялся слабо (рис. 3). Эти данные свидетельствуют о том, что повышение продукции тестостерона в группах ДИ и ДИС в значительной степени

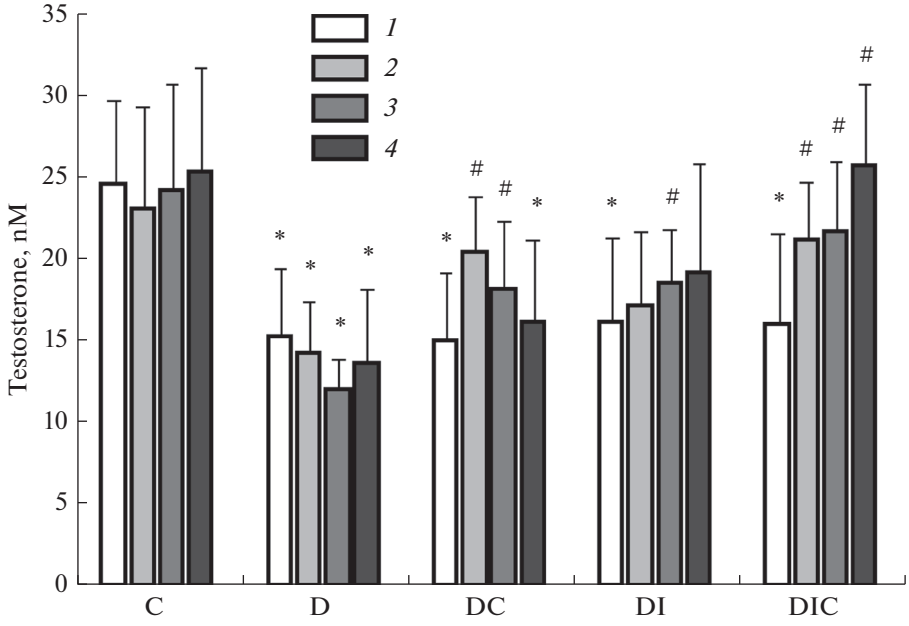

Рис. 2. Уровни тестостерона в крови крыс с мягким сахарным диабетом 1-го типа и влияние на них лечения С-пептидом и инсулином. К – контроль; Д – диабет; ДС – диабет с лечением С-пептидом (и/н, 36 мкг/крысу); ДИ – диабет с лечением инсулином (и/н, 20 мкг/крысу); ДИС – диабет с лечением С-пептидом и инсулином. *1* – до начала лечения; *2*, *3* и *4* – через 3, 6 и 9 дней после начала лечения соответственно. * – различия с контролем статистически значимы при $p < 0.05$; # – различия с группой Д статистически значимы при $p < 0.05$. В каждой группе $n = 6$, $M \pm SD$.

Fig. 2. The plasma testosterone levels in rats with mild type 1 diabetes mellitus and the effect of treatment with C-peptide and insulin on them. C – control; D – diabetes; DC – diabetes with C-peptide treatment (i.n., 36 μg/rat); DI – diabetes with insulin treatment (i.n., 20 μg/rat); DIC – diabetes with the treatment with C-peptide and insulin. *1* – before treatment; *2*, *3* and *4* – on the third, sixth and ninth days after the start of treatment, respectively. * – the differences with control are statistically significant at $p < 0.05$; # – the differences with the group D are statistically significant at $p < 0.05$. In each group $n = 6$, $M \pm SD$.

обусловлено восстановлением чувствительности тестикулярной аденилатциклазной системы диабетических крыс к гонадотропинам.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Имеются многочисленные свидетельства того, что лечение С-пептидом животных с сильно выраженным СД1, для которого характерны острый дефицит инсулина и С-пептида, улучшает гликемический контроль, положительно влияет на нарушенные в условиях диабетической патологии функции нервной и выделительной систем [15–21]. Введение С-пептида снижает экспрессию молекул клеточной адгезии, препятствует повреждению лейкоцитами сосудистой стенки, ослабляет продукцию провоспалительных цитокинов, восстанавливает систему антиоксидантной защиты и нормализует уровень активных форм кислорода в тканях-мишенях. Лечение С-пептидом пациентов с СД1 приводит к смягчению проявлений диабетической полинейропатии и нефропатии, что обусловлено восстанавливающим эффектом С-пептида на функции сосудов и окислительно-восстановитель-

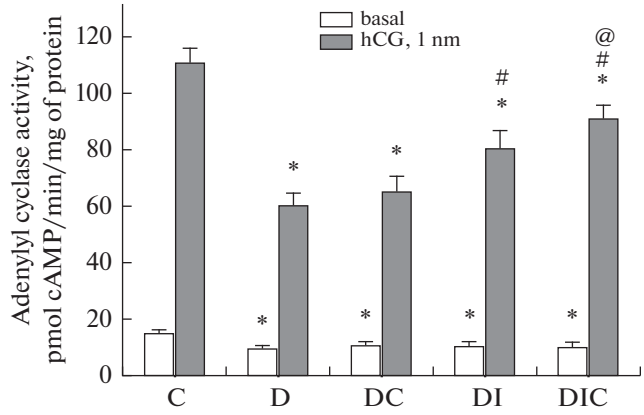

Рис. 3. Базальная и стимулированная ХГЧ активность аденилатциклазы в тестикулярных мембранах диабетических крыс и влияние на нее лечения С-пептидом и инсулином. К – контроль; Д – диабет; ДС – диабет с лечением С-пептидом (и/н, 36 мкг/крысу); ДИ – диабет с лечением инсулином (и/н, 20 мкг/крысу); ДИС – диабет с лечением С-пептидом и инсулином. * – различия с контролем статистически значимы при $p < 0.05$; # – различия с группой Д статистически значимы при $p < 0.05$; @ – различия между группами ДИ и ДИС статистически значимы при $p < 0.05$. В каждой группе $n = 6$, $M \pm SD$.

Fig. 3. The basal and hCG-stimulated activities of adenylyl cyclase in the testicular membranes of diabetic rats and the effect of treatment with C-peptide and insulin on them. C – control; D – diabetes; DC – diabetes with C-peptide treatment (i.n., 36 μg/rat); DI – diabetes with insulin treatment (i.n., 20 μg/rat); DIC – diabetes with the treatment with C-peptide and insulin. * – the differences with control are statistically significant at $p < 0.05$; # – the differences with the group D are statistically significant at $p < 0.05$; @ – the differences between the DI and DIC groups are statistically significant at $p < 0.05$. In each group $n = 6$, $M \pm SD$.

ный статус организма, а также сохранением в его присутствии активности и массы панкреатических β-клеток, продуцирующих инсулин [19, 21, 26, 27]. Нами ранее было установлено, что интраназальное введение С-пептида и его С-концевых фрагментов крысам с тяжелыми и среднетяжелыми формами СД1 улучшает их гормональные и метаболические показатели [6, 28]. Однако лечение С-пептидом крыс, имеющих относительный дефицит инсулина, было малоэффективным [7].

В настоящем исследовании нами также не было выявлено значимого влияния лечения С-пептидом на массу тела, уровни глюкозы, гликированного гемоглобина, инсулина, ТТГ и тиреоидных гормонов у крыс с мягкой формой СД1. Это свидетельствует о том, что в условиях относительного дефицита С-пептида его фармакологические эффекты выражены слабо. Нельзя исключить и того факта, что отсутствие восстанавливающего эффекта С-пептида на метаболические и гормональные показатели может быть обусловлено развитием к нему резистентности гипоталамических нейронов в ходе продолжительного лечения. Так, через 3 дня после начала лечения С-пептидом была выявлена тенденция к повышению уровня ЛГ и обусловленное этим повышение уровня тестостерона, в то время как через 9 дней эти эффекты исчезали.

Ранее при инсулин-дефицитных состояниях отмечали усиление эффекта ИИ при его совместном введении с эквимолярными или превышающими их количествами С-пептида, хотя потенцирующий эффект С-пептида варьировал в зависимости от исследуемой модели диабета и выраженности метаболических нарушений [6, 7]. В настоящем исследовании было показано, что в группе диабетических крыс, которых лечили совместно ИИ и С-пептидом, более эффективно, чем при

монотерапии ИИ, ослаблялась гипергликемия, на что указывает снижение уровней постпрандиальной глюкозы и HbA1c. Наряду с этим в группе ДИС улучшался гормональный статус, о чем свидетельствует снижение уровня ТТГ до контрольных значений, а также повышение уровней лептина, трийодтиронина и тестостерона, сниженных в группе Д.

Потенцирование восстанавливающего эффекта ИИ в присутствии С-пептида может быть обусловлено несколькими причинами. Во-первых, эффективность взаимодействия инсулина с инсулиновым рецептором, а, следовательно, и активация гипоталамических инсулиновых сигнальных путей повышается при облегченной диссоциации олигомерного комплекса инсулина в присутствии С-пептида [4, 5]. Во-вторых, поскольку мишенями инсулина и С-пептида являются 3-фосфоинозитидный путь и его основной эффекторный компонент – фермент Akt-киназа, то при совместном воздействии можно ожидать усиления активации этого пути инсулином [29]. В-третьих, С-пептид стимулирует процесс аутофосфорилирования инсулинового рецептора и инсулин-зависимую активацию инсулин-рецепторного субстрата-1 и других белков инсулинового сигналинга, включая Akt-киназу и митоген-активируемые протеинкиназы [30–32]. Нами ранее было показано, что интраназальное введение диабетическим крысам С-пептида и инсулина вызывает более выраженное, в сравнении с одним ИИ, повышение фосфорилирования Akt-киназы по остаткам Thr^{308} и Ser^{473} в гипоталамусе, что указывает на усиление активации 3-фосфоинозитидного пути при совместном воздействии на него С-пептида и инсулина [33].

Инсулин способен влиять на секрецию гипоталамическими нейронами рилизинг-факторов ТТГ и ЛГ – тиролиберина и гонадолиберина. Эффекты инсулина на тиреоидную и гонадную системы могут осуществляться как непосредственно, путем активации инсулиновых рецепторов, расположенных на поверхности гипоталамических нейронов, экспрессирующих тиролиберин и гонадолиберин, так и опосредованно, через модуляцию активности гипоталамических сигнальных путей, зависимых от кисспептина, меланокортиновых пептидов, нейропептида Y [14, 34–37]. Одним из механизмов действия ИИ является потенцирование стимулирующего эффекта лептина, положительного регулятора функций тиреоидной и гонадной осей, на гипоталамические нейроны [37–39]. Полученные нами данные подтверждают, что гипоталамические нейроны являются основной мишенью интраназально вводимого инсулина и его смеси с С-пептидом. Их активация влияет на активность нижележащих компонентов тиреоидной и гонадной осей, вызывая восстановление уровней тиреоидных гормонов и тестостерона в крови крыс с мягким СД1. Важно отметить, что эти эффекты, по крайней мере частично, обусловлены повышением чувствительности тироцитов к ТТГ и клеток Лейдига к гонадотропинам, на что указывает восстановление стимулирующих эффектов ТТГ и ХГЧ на активность АЦ во фракциях плазматических мембран, выделенных из щитовидных желез и семенников крыс в группах ДИ и ДИС.

Нами обнаружено, что через 3 дня после начала лечения в группах ДС и ДИС, но не в группе ДИ, уровень тестостерона повышался, что сопровождалось небольшим увеличением уровня ЛГ в крови. Можно предположить, что С-пептид способен при непродолжительном воздействии стимулировать активность гонадной оси, усиливая синтез и секрецию гонадотропинов с ЛГ-активностью, но в дальнейшем его эффект затухает. Это может быть обусловлено развитием резистентности гипоталамических нейронов к С-пептиду, как это постулируется для эндотелиальных клеток в условиях длительной С-пептидемии [18]. В связи с этим можно предположить, что эффекты С-пептида, в том числе при совместном введении с ИИ, на функции эндокринной системы при СД1 могут зависеть не только от тяжести СД1, но и от продолжительности лечения.

Нами установлено, что у крыс с мягким СД1 уровень тироксина в крови существенно не меняется, несмотря на повышение уровня ТТГ, что является следствием снижения чувствительности щитовидной железы к ТТГ и указывает на развитие гипотиреоза с повышенным уровнем ТТГ, типичным для пациентов с СД1 [11]. В то же время снижаются уровни трийодтиронина, что вносит вклад в повышение продукции ТТГ гипофизом из-за ослабления системы обратных отрицательных связей в тиреоидной оси. Одной из причин этого может быть снижение активности D2-дейодиназ – ферментов, осуществляющих конверсию тироксина в трийодтиронин. Восстановление уровня трийодтиронина при лечении крыс ИИ и С-пептидом может быть обусловлено не только нормализацией функций тиреоидной оси, но и восстановлением активности D2-дейодиназ как в гипоталамусе, так и в гипофизе и других периферических тканях. Это может влиять на систему обратных отрицательных связей в тиреоидной оси и на метаболический статус организма в целом. В настоящее время данные о регуляции инсулином D2-дейодиназ в гипоталамусе и гипофизе отсутствуют. В то же время известно, что лептин, сигнальные пути которого в гипоталамусе пересекаются с таковыми инсулина, модулирует активность D2-дейодиназ в ЦНС и на периферии [40]. Так, введение лептина гипотиреоидным крысам повышает активность D2-дейодиназ в гипоталамусе в полтора раза, что приводит к усилению системы обратных связей в тиреоидной оси и нормализует продукцию ТТГ тиреотрофами гипофиза [41, 42]. Нами было показано восстановление уровня лептина в группе ДИС, что ассоциировалось с нормализацией продукции тиреоидных гормонов и ТТГ в этой группе.

Таким образом, при продолжительном лечении крыс с мягким СД1 с помощью смеси интраназально вводимых С-пептида и инсулина восстанавливается продукция трийодтиронина и тестостерона, сниженная в условиях СД1, и это ассоциировано с улучшением метаболических показателей и нормализацией уровня ТТГ. Одним из механизмов этого является повышение чувствительности аденилатциклазной системы, ответственной за синтез тиреоидных гормонов в тироцитах и за продукцию тестостерона в клетках Лейдига, к ТТГ и ХГЧ соответственно. Потенцирование восстанавливающего эффекта ИИ при его совместном применении с С-пептидом на функции тиреоидной и гонадной осей, с учетом отсутствия значимого эффекта монотерапии С-пептидом, свидетельствует о том, что в основе этого, скорее всего, лежит повышение эффективности взаимодействия инсулина с его рецептором, вызванное облегчением диссоциации олигомерных комплексов инсулина в присутствии С-пептида, и(или) усилением пострецепторных этапов передачи инсулинового сигнала, общих для инсулина и С-пептида.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана РФФИ (№ 18-015-00144) и государственным заданием АААА-А18-118012290427-7.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры по уходу и использованию животных выполняли в соответствии с требованиями Этического комитета ИЭФБ РАН, European Communities Council Directive 1986 (86/609/EEC) и “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”. Статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chen L.M., Yang X.W., Tang J.G.* Acidic residues on the N-terminus of proinsulin C-Peptide are important for the folding of insulin precursor. J. Biochem. 131(6): 855–859. 2002.
2. *Min C.Y., Qiao Z.S., Feng Y.M.* Unfolding of human proinsulin. Intermediates and possible role of its C-peptide in folding/unfolding. Eur. J. Biochem. 271: 1737–1747. 2004.
3. *Nerelius C., Alvelius G., Jörnvall H.* N-terminal segment of proinsulin C-peptide active in insulin interaction/desaggregation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 403: 462–467. 2010.
4. *Shafqat J., Melles E., Sigmundsson K., Johansson B.L., Ekberg K., Alvelius G., Henriksson M., Johansson J., Wahren J., Jörnvall H.* Proinsulin C-peptide elicits disaggregation of insulin resulting in enhanced physiological insulin effects. Cell Mol. Life Sci. 63: 1805–1811. 2006.
5. *Jornvall H., Lindahl E., Astorga-Wells J., Lind J., Holmlund A., Melles E., Alvelius G., Nerelius C., Mäler L., Johansson J.* Oligomerization and insulin interactions of proinsulin C-peptide: Threefold relationships to properties of insulin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 391: 1561–1566. 2010.
6. *Derkach K.V., Shpakova E.A., Bondareva V.M., Shpakov A.O.* The effect of intranasal administration of proinsulin C-peptide and its C-terminal fragment on metabolic parameters in rats with streptozotocin diabetes. J. Evol. Biochem. Physiol. 54(3): 242–245. 2018.
7. *Derkach K.V., Bondareva V.M., Perminova A.A., Shpakov A.O.* C-peptide and insulin during combined intranasal administration improve the metabolic parameters and activity of the adenylate cyclase system in the hypothalamus, myocardium, and epididymal fat of rats with type 2 diabetes. Cell Tissue Biol. 13(3): 228–236. 2019.
8. *Yosten G.L., Kolar G.R., Redlinger L.J., Samson W.K.* Evidence for an interaction between proinsulin C-peptide and GPR146. J. Endocrinol. 218: B1–B8. 2013.
9. *Brunskill N.J.* C-peptide and diabetic kidney disease. J. Intern. Med. 281(1): 41–51. 2017.
10. *Шпаков А.О.* Функциональное состояние гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы при сахарном диабете. Проблемы эндокринологии. 56(5): 23–29. 2010. [*Shpakov A.O.* Functional state of hypothalamic-pituitary-gonadal axis in diabetes mellitus. Problemy endocrinologii. 56(5): 23–29. 2010. (In Russ)].
11. *Шпаков А.О.* Тиреоидная система в норме и при сахарном диабете 1-го и 2-го типов. СПб. Изд-во Политехнического университета. 2016. [*Shpakov A.O.* Tireoidnaya sistema v norme i pri saharnom diabete 1-go i 2-go tipov [Thyroid system in norm and in types 1 and 2 diabetes mellitus. St-Petersburg. Polytechnic University Publisher. 2016.]
12. *Duntas L.H., Orgiazzi J., Brabant G.* The interface between thyroid and diabetes mellitus. Clin. Endocrinol. (Oxf.). 75(1): 1–9. 2011.
13. *Jangir R.N., Jain G.C.* Diabetes mellitus induced impairment of male reproductive functions: a review. Curr. Diabetes Rev. 10(3): 147–157. 2014.
14. *Derkach K.V., Bogush I.V., Berstein L.M., Shpakov A.O.* The influence of intranasal insulin on hypothalamic-pituitary-thyroid axis in normal and diabetic rats. Horm. Metab. Res. 47(12): 916–924. 2015.
15. *Sima A.A., Zhang W., Sugimoto K., Henry D., Li Z., Wahren J., Grunberger G.* C-peptide prevents and improves chronic Type I diabetic polyneuropathy in the BB/Wor rat. Diabetologia. 44: 889–897. 2001.
16. *Sima A.A., Zhang W., Muzik O., Kreipke C.W., Rafols J.A., Hoffman W.H.* Sequential abnormalities in type 1 diabetic encephalopathy and the effects of C-peptide. Rev. Diabet. Stud. 6: 211–222. 2009.
17. *Samnegard B., Jacobson S., Jaremko G., Johansson B., Ekberg K., Isaksson B., Eriksson L., Wahren J., Sjöquist M.* C-peptide prevents glomerular hypertrophy and mesangial matrix expansion in diabetic rats. Nephrol. Dial. Transplant. 20(3): 532–538. 2005.
18. *Vasic D., Walcher D.* Proinflammatory Effects of C-Peptide in Different Tissues. Int. J. Inflam. 2012: 932725. 2012.
19. *Wahren J., Kallas A., Sima A.A.* The clinical potential of C-peptide replacement in type 1 diabetes. Diabetes. 61: 761–772. 2012.
20. *Wahren J., Larsson C.* C-peptide: new findings and therapeutic possibilities. Diabetes Res. Clin. Pract. 107. 309–319. 2015.
21. *Luppi P., Drain P.* C-peptide antioxidant adaptive pathways in β cells and diabetes. J. Intern. Med. 281 (1): 7–24. 2017.
22. *Шпаков А.О.* Регуляция и молекулярные механизмы функционирования гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси. СПб. Изд-во Политехнического университета. 2017. [Regulyaciya i molekulyarnye mekhanizmy funkcionirovaniya gipotalamo-gipofizarno-gonadnoj osi [Regulation and molecular mechanisms of functioning of hypothalamic-pituitary-gonadal axis. St-Petersburg. Polytechnic University Publisher. 2017].
23. *Heyma P., Harrison L.C.* Precipitation of the thyrotropin receptor and identification of thyroid autoantigens using Graves' disease immunoglobulins. J. Clin. Invest. 74: 1090–1097. 1984.

24. *Shpakov A.O., Shpakova E.A., Tarasenko I.I., Derkach K.V.* Peptide 612–627 of thyrotropin receptor and its modified analogs as regulators of adenylyl cyclase in rat thyroid gland. Cell Tissue Biol. 8(6): 488–498. 2014.
25. *Derkach K.V., Bondareva V.M., Moiseyuk I.V., Shpakov A.O.* The effect of 2-month bromocriptine treatment on the activity of the adenylate cyclase signaling system in the myocardium and testes of rats with type 2 diabetes. Cell Tissue Biol. 9(5): 395–405. 2015.
26. *Ekberg K., Brismar T., Johansson B.L., Lindström P., Juntti-Berggren L., Norrby A., Berne C., Arnqvist H.J., Bolinder J., Wahren J.* C-peptide replacement therapy and sensory nerve function in type 1 diabetic neuropathy. Diabetes Care. 30(1): 71–76. 2007.
27. *Luppi P., Cifarelli V., Wahren J.* C-peptide and long-term complications of diabetes. Pediatr. Diabetes. 12: 276–292. 2011.
28. *Derkach K.V., Bondareva V.M., Shpakov A.O.* Coadministration of intranasally delivered insulin and proinsulin *C*-peptide to rats with the types 1 and 2 diabetes mellitus restores their metabolic parameters. Adv. Gerontol. 8(2): 139–146. 2018.
29. *Al-Rasheed N.M., Chana R.S., Baines R.J., Willars G.B., Brunskill N.J.* Ligand-independent activation of peroxisome proliferator-activated receptor-γ by insulin and C-peptide in kidney proximal tubular cells: dependent on phosphatidylinositol 3-kinase activity. J. Biol. Chem. 279(48): 49747–49754. 2004.
30. *Li Z.G., Qiang X., Sima A.A., Grunberger G.* C-peptide attenuates protein tyrosine phosphatase activity and enhances glycogen synthesis in L6 myoblasts. Biochem. Biophys. Res. Commun. 280: 615–619. 2001.
31. *Li Z.G., Zhang W., Sima A.A.* C-peptide enhances insulin-mediated cell growth and protection against high glucose-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. Diabetes Metab. Res. Rev. 19: 375–385. 2003.
32. *Grunberger G., Sima A.A.* The C-peptide signaling. Exp. Diabetes Res. 5: 25–36. 2004.
33. *Derkach K.V., Perminova A.A., Buzanakov D.M., Shpakov A.O.* Intranasal administration of proinsulin C-peptide enhances the stimulating effect of insulin on insulin system activity in the hypothalamus of diabetic rats. Bull. Exp. Biol. Med. 167(3): 351–355. 2019.
34. *Fekete C., Singru P.S., Sanchez E., Sarkar S., Christoffolete M.A., Riberio R.S., Rand W.M., Emerson C.H., Bianco A.C., Lechan R.M.* Differential effects of central leptin, insulin, or glucose administration during fasting on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis and feeding-related neurons in the arcuate nucleus. Endocrinology. 147: 520–529. 2006.
35. *Sliwowska J.H., Fergani C., Gawałek M., Skowronska B., Fichna P., Lehman M.N.* Insulin: its role in the central control of reproduction. Physiol. Behav. 133: 197–206. 2014.
36. *DiVall S.A., Herrera D., Sklar B., Wu S., Wondisford F., Radovick S., Wolfe A.* Insulin receptor signaling in the GnRH neuron plays a role in the abnormal GnRH pulsatility of obese female mice. PLoS One. 10(3): e0119995. 2015.
37. *Hill J.W., Elias C.F.* Neuroanatomical framework of the metabolic control of reproduction. Physiol. Rev. 98(4): 2349–2380. 2018.
38. *Nillni E.A.* Regulation of the hypothalamic thyrotropin releasing hormone (TRH) neuron by neuronal and peripheral inputs. Front. Neuroendocrinol. 31: 134–156. 2010.
39. *Shpakov A.O., Ryzhov Ju.R., Bakhtyukov A.A., Derkach K.V.* The regulation of the male hypothalamic-pituitary-gonadal axis and testosterone production by adipokines (Chapter 2). In: Advances in Testosterone Action (Ed. by *M. Estrada*). Intech Open Access Publisher, Rijeka, Croatia. 25–57. 2018. ISBN 978-953-51-6241-4.
40. *Mullur R., Liu Y.Y., Brent G.A.* Thyroid hormone regulation of metabolism. Physiol. Rev. 94(2): 355–382. 2014.
41. *Cabanelas A., Lisboa P.C., Moura E.G., Pazos-Moura C.C.* Leptin acute modulation of the 5'-deiodinase activities in hypothalamus, pituitary and brown adipose tissue of fed rats. Horm. Metab. Res. 38(8): 481–485. 2006.
42. *Cabanelas A., Lisboa P.C., Moura E.G., Pazos-Moura C.C.* Acute effects of leptin on 5'-deiodinases are modulated by thyroid state of fed rats. Horm. Metab. Res. 39(11): 818–822. 2007.

The Influence of Proinsulin C-Peptide and Insulin on the Gonadal and Thyroid Systems in Male Rats with Mild Type 1 Diabetes

K. V. Derkach[a], V. M. Bondareva[a], and A. O. Shpakov[a],*

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

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

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is characterized by a deficiency of insulin, as well as C-peptide, which is a modulator of the activity of insulin signaling pathways. The C-peptide replacement therapy for T1DM improves metabolic parameters, restores the functions of

the nervous and excretory systems. It is believed that through central mechanisms it can restore the functions of the endocrine system that are impaired in T1DM. To compensate the deficiency of the C-peptide in the CNS, an intranasal route of administration can be used. The aim was to study the effect of treatment (9 days) of male Wistar rats with a model of mild T1DM induced by a low-dose streptozotocin (35 mg/kg) using intranasally administered C-peptide (36 μg/rat/day) and insulin (20 μg/rat/day), jointly or separately, on the hormonal parameters of the thyroid and gonadal systems, as well as on the activity of adenylyl cyclase (AC) in the membranes isolated from the thyroid and testes. The enzyme adenylyl cyclase is involved in the regulation of the synthesis of thyroid hormones in the thyrocytes and testosterone in the Leydig cells. The plasma levels of thyroid-stimulating (TSH) and luteinizing hormones (LH), thyroid hormones, testosterone, insulin and leptin were measured. The treatment of rats with a C-peptide in the combination with insulin caused a decrease in hyperglycemia, despite hypoinsulinemia, restored the reduced levels of triiodothyronine, testosterone and leptin, normalized the TSH level increased in T1DM, and did not affect the LH level, which did not change in the conditions of T1DM. One of the mechanisms for normalizing the functions of the thyroid and gonadal systems in the case of treatment with the insulin and C-peptide was the restoration of the stimulating effect of TSH on AC activity in the thyroidal membranes and the corresponding effect of human chorionic gonadotropin in the testicular membranes. The monotherapy with insulin was less effective, while monotherapy with C-peptide partially restored an androgen status only on the third day after the start of treatment. Thus, we have shown the potentiating effect of the C-peptide on insulin-induced restoration of the functions of the thyroid and gonadal systems in rats with mild T1DM, which, in our opinion, is based on the enhancement of insulin signaling in the hypothalamus in the presence of the C-peptide.

Keywords: C-peptide, insulin, intranasal administration, hypothalamus, adenylyl cyclase, diabetes mellitus, thyroid gland, testes, testosterone

ЦИТИРОВАТЬ:

Деркач К.В., Бондарева В.М., Шпаков А.О. Влияние С-пептида проинсулина и инсулина на гонадную и тиреоидную системы у самцов крыс с мягкой формой сахарного диабета 1-го типа. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 106(1): 97–109.

DOI: 10.31857/S0869813920010045

TO CITE THIS ARTICLE:

Derkach K.V., Bondareva V.M., Shpakov A.O. The Influence of Proinsulin C-Peptide and Insulin on the Gonadal and Thyroid Systems in Male Rats with Mild Type 1 Diabetes. Russian Journal of Physiology. 106(1): 97–109.

DOI: 10.31857/S0869813920010045

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 1, с. 110–120

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ВЛИЯНИЕ АКТИВАЦИИ ВАНИЛОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ЭВОДИАМИНОМ НА СОДЕРЖАНИЕ КАЛЬЦИТОНИН-ГЕН-РОДСТВЕННОГО ПЕПТИДА В КРОВИ КРЫС В НОРМЕ И ПРИ ГИПЕРТЕНЗИИ, ВЫЗВАННОЙ ПОТРЕБЛЕНИЕМ ФРУКТОЗЫ

© 2020 г. З. С. Толочко[1], *, В. К. Спиридонов[1]

[1]Институт физиологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия

**E-mail: toloch@physiol.ru*

Поступила в редакцию 20.06.2019 г.
После доработки 03.09.2019 г.
Принята к публикации 17.09.2019 г.

Кальцитонин-ген-родственный пептид (CGRP) – один из наиболее мощных вазодилататоров, в опосредовании вазоактивного действия которого принимает участие оксид азота (NO). Цель исследования заключалась в оценке содержания CGRP и NO в крови крыс в норме и при гипертензии, вызванной потреблением фруктозы, без воздействия на ванилоидные рецепторы 1 (TRPV1) и после введения их агониста эводиамина. Крысы (самцы, Вистар) в течение 10 нед. употребляли в качестве питья либо 12.5%-ный раствор фруктозы, либо водопроводную воду (контроль). Эводиамин, агонист TRPV1, вводили через 8 нед. после начала потребления фруктозы (10 мг/кг, в/б, через день, 2 нед.). Систолическое артериальное давление (АД) измеряли неинвазивным методом. Содержание глюкозы (натощак) и через 1 ч после нагрузки глюкозой (2 г/кг, в/б) измеряли глюкометром в крови, взятой из надреза на хвостовой вене. В сыворотке крови определяли концентрации CGRP, метаболитов NO (NOx), триглицеридов (ТГ) и продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Потребление фруктозы вызывало развитие гипертензии, нарушение толерантности к глюкозе, повышение содержания в крови продуктов ПОЛ, ТГ и снижение содержания CGRP. Введение эводиамина крысам, потреблявшим фруктозу, восстанавливало содержание CGRP в крови до контрольных значений, снижало АД, содержание ПОЛ, ТГ и улучшало толерантность к глюкозе. Уровень NOx во всех группах не отличался от контроля. Авторы полагают, что CGRP участвует в развитии гипертензии, вызванной потреблением фруктозы, и в опосредовании гипотензивного эффекта эводиамина.

Ключевые слова: эводиамин, TRPV1, CGRP, оксид азота, гипертензия, фруктоза

DOI: 10.31857/S0869813919120112

Эводиамин (алколоид, экстрат растения *Evodia fructus*)–агонист ванилоидных рецепторов 1 (transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1) [1], локализованных на С-немиелизированных и Aδ-миелизированных волокнах сенсорных нервов, открытых и изученных с использованием селективного агониста TRPV1 капсаицина и вследствие избирательной чувствительности к нему, получивших название “капсаицин-чувствительные нервы” [2, 3]. Проекции сенсорных нервов, экспрессирующих TRPV1, представлены в центральной нервной системе, в коже, внутренних органах, сосудистой системе [2–5].

Кальцитонин-ген-родственный пептид (calcitonin-gene-related peptide, CGRP), нейропептид, синтезируемый в клеточных телах сенсорных нейронов, экспрессирующих TRPV1, является мощным вазодилататором, релаксирующее действие которого в сосудах опосредовано его взаимодействием с рецепторами к CGRP и осуществляется как эндотелий-независимым путем, так и с участием NO эндотелия сосудов [4, 6–8]. Вазоактивное действие CGRP послужило основанием для изучения его роли в развитии и лечении гипертензии.

Несмотря на большое количество исследований, посвященных этой теме, результаты которых рассмотрены и проанализированы в ряде обзорных статей [4–9], вопрос о механизмах участия CGRP в этих процессах остается открытым. Тем не менее, на основании данных о снижении артериального давления (АД) у гипертензивных животных при экзогенном введении CGRP [10] и о повышении АД при дефиците этого нейропептида, как генетически обусловленного (CGRP knockout mice) [11], так и вызванного неонатальным введением капсаицина [5], складывается представление, что на величину АД при гипертензии влияет уровень CGRP.

Исследователи, изучавшие содержание CGRP в крови гипертензивных и инсулинрезистентных крыс с генетически обусловленным ожирением (Zucker rats), обнаружили у них превышение концентрации CGRP в крови более чем в 3 раза по сравнению с таковой у “худых” животных этой же линии [12]. Эти нарушения устранялись десентизацией сенсорных нервов капсаицином, что послужило основанием для утверждения авторами, что повышение активности сенсорных нервов и связанное с этим увеличение содержания CGRP в крови, предшествуют развитию инсулин-резистентности и гипертонии у тучных крыс. Однако в модели гипертензии, связанной с инсулин-резистентностью, вызванной фруктозой, но развивающейся без ожирения, обнаружено уменьшение плотности CGRP-содержащих нервных терминалей в брыжейке и снижение синтеза этого нейропептида в дорзальных ганглиях, что, по мнению авторов, отражает снижение активности сенсорных нервов и является одной из причин развития данной патологии у этих животных [9, 13]. В пользу этой версии свидетельствуют и наши данные о снижении АД у крыс с гипертензией, вызванной потреблением фруктозы, после введения гипертензивным животным малых доз капсаицина, вызывающих активацию TRPV1 [14].

Изучение механизма развития гипертензии, обусловленной инсулин-резистентностью, одного из наиболее широко распространенного заболевания и роли в этом процессе вазоактивных нейропептидов сенсорных нервов, в частности CGRP, с учетом противоречивости данных литературы, представляется актуальной проблемой. Развитие артериальной гипертензии, вызванной фруктозной диетой, реализуется через многие механизмы, включающие и снижение продукции вазодилататоров, в том числе и NO [15], принимающим участие в опосредовании вазорелаксирующего действия CGRP [4, 6–8]. Поэтому представляется важным для понимания роли CGRP в развитии гипертензии, связанной с инсулин-резистентностью, оценить содержание CGRP в крови совместно с NO.

Цель исследования – оценить содержание CGRP и NO в крови крыс в норме и при гипертензии, вызванной потреблением фруктозы, без воздействия на ванилоидные рецепторы 1 (TRPV1) и после введения их агониста эводиамина.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на крысах-самцах Вистар с исходной массой тела 150–160 г (возраст 2–2.5 мес.). Животные получали стандартный корм (ПроКорм, ЗАО БиоПро), содержались на 12-часовом цикле день/ночь и в качестве питья в течение 10 нед. потребляли либо водопроводную воду (стандартный питьевой режим), либо 12.5%-ный раствор фруктозы. Все манипуляции с животными проводились с со-

блюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества, и одобрены комитетом по биомедицинской этике НИИФФМ (протокол № 6 от 16 июня 2016 г.), Новосибирск, Россия.

Протокол исследований. Еженедельно на бодрствующих крысах измеряли неинвазивном методом систолическое артериальное давление (АД) с помощью системы “Coda” (Kent Scientific, США) и регистрировали их массу. Содержание глюкозы в крови из надреза на хвостовой вене определяли натощак (после ночного голодания) и при проведении глюкозо-толерантного теста (через 1 ч после нагрузки глюкозой, 2 г/кг, внутрибрюшинно) глюкометром One Touch Ultra (Life Scan, Швейцария). Через 8 нед. после начала эксперимента каждая из 2-х групп была разделена на 3 подгруппы: группа со стандартным питьевым режимом (контроль, контроль^1, контроль^2) и группа с потреблением фруктозы (фруктоза, фруктоза^1, фруктоза^2). Группы “контроль” и “фруктоза” в последующие 2 недели дополнительным воздействиям не подвергались. Остальным группам (“контроль^2”, “контроль^1”) и (“фруктоза^2”, “фруктоза^1”) вводили в течение 2-х недель либо эводиамин (TCI, Chemical, Китай, 10 мг/кг, через день, внутрибрюшинно,) либо в аналогичном объеме его растворитель, состоящий из диметилсульфоксида (ДМСО), (10%), Твин-80 (10%) и физиологического раствора (80%).

Крыс под легким эфирным наркозом забивали через 10 недель после начала потребления фруктозы. В сыворотке крови определяли содержание CGRP иммуноферментным методом с использованием набора “CEA 876 Ra” (Cloud Clon Corp, США) с регистрацией на ридере TriStar LB 941 (Berthold Technologies, Германия) и на спектрофотометре Shimadzu (UV-2501PC) измеряли содержание суммы метаболитов NO: нитрит/нитратов (NOx) [16], триглицеридов (ТГ) набором “Триглицериды-Ново” (Вектор Бест, Россия). Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по содержанию продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП) [17].

Результаты обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде средней величины и ошибки средней (M ± SEM). Количество животных в каждой экспериментальной группе составляло 9–10 крыс.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данные по массе тела представлены в табл. 1. Достоверных различий по этому показателю между всеми экспериментальными группами через 8 и 10 нед. после начала эксперимента не обнаружено. Полученные данные показывают, что потребление фруктозы не вызывает развития ожирения у животных.

1. Влияние длительного потребления фруктозы на АД и исследуемые показатели в крови

Результаты исследования показали, что достоверное повышение АД (на 16–17%) наблюдается через 8 нед. после начала потребления фруктозы и в последующие 2 нед. эксперимента отмечается его дальнейший рост (рис. 1), что свидетельствует об устойчивом росте АД и развитии артериальной гипертензии. Потребление фруктозы не вызывало изменения концентрации глюкозы в крови натощак (табл. 1), но приводило к увеличению ее содержания после нагрузки (рис. 2). Кроме этого, у крыс, потреблявших фруктозу, обнаружено повышение содержания ТГ и продуктов ПОЛ (табл. 2).

Содержание CGRP в крови у крыс, потреблявших фруктозу, в отличие от других показателей, было снижено на 20% относительно контрольных животных (рис. 3*А*). При этом содержание NOx в крови у этой группы не отличалось от контроля (рис. 3*Б*).

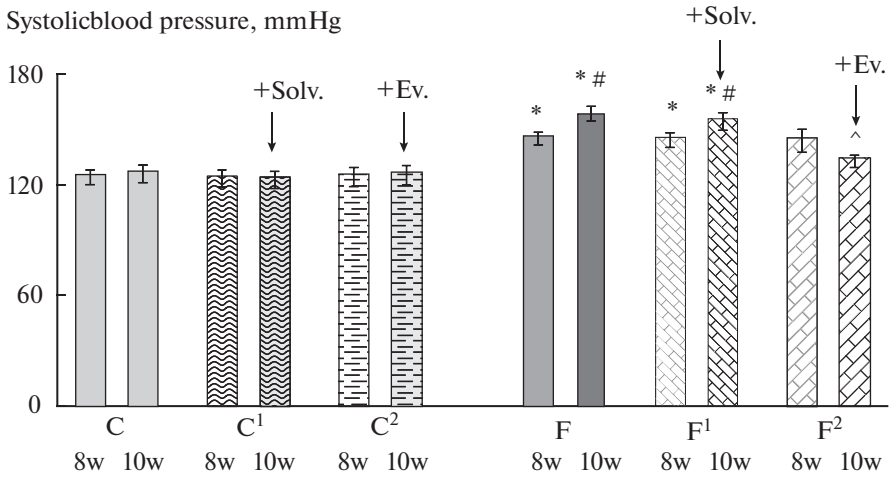

Рис. 1. Влияние эводиамина на систолическое АД у крыс в норме и при потреблении фруктозы.

Группы: К – контроль – интактные крысы со стандартным питьевым режимом; $К^1$ + Раств. и $К^2$ + Эв. – через 8 нед. после начала эксперимента интактным группам $К^1$ (контроль^1) и $К^2$ (контроль^2) вводили либо растворитель (Раств.), либо эводиамин (Эв.) соответственно; Ф – фруктоза – 12.5% р-р фруктозы в течение 10 нед.; $Ф^1$ + Раств. и $Ф^2$ + Эв. – через 8 недель после начала потребления фруктозы группам $Ф^1$ (фруктоза^1) и $Ф^2$(фруктоза^2) вводили либо растворитель, либо эводиамин соответственно; эводиамин и растворитель – 10 мг/кг, в/б, через день, 2 недели; 8 н., 10 н. – 8 и 10 нед. после начала эксперимента; *, #, ^ – $p < 0.05$ относительно: * – контрольных групп, # – группы Ф/8н., ^– группы Ф/10н. Данные представлены в виде: M ± SEM.

Таблица 1. Содержание глюкозы в крови (натощак) и масса тела у крыс различных экспериментальных групп через 8 и 10 недель после начала эксперимента

Экспериментальные группы	Концентрация глюкозы (ммоль/л)		Масса тела, г	
	8 недель	10 недель	8 недель	10 недель
Контроль – интактные крысы	4.4 ± 0.2	4.5 ± 0.4	341.7 ± 12.4	380.3 ± 15.5
Контроль^1 + растворитель (через 8 недель после начала опыта)	4.3 ± 0.2	4.6± 0.1	345.4 ± 16.1	387.8 ± 14.6
Контроль^2 + эводиамин (через 8 недель после начала опыта)	4.2 ± 0.3	4.0 ± 0.4	342.8 ± 13.2	380.2 ± 14.1
Фруктоза – 12.5% р-р фруктозы	4.4 ± 0.2	4.6 ± 0.2	358.4 ± 13.9	405.1 ± 16.3
Фруктоза^1 + растворитель (через 8 недель после начала потребления фруктозы)	4.5 ± 0.3	4.6 ± 0.1	360.2 ± 11.8	403.6 ± 11.2
Фруктоза^2 + эводиамин (через 8 недель после начала потребления фруктозы)	4.3 ± 0.1	4.1 ± 0.3	360.9 ± 14.1	399.4 ± 13.7

Значения представлены в виде: M ± SEM.
n – 9–10 крыс в каждой группе.

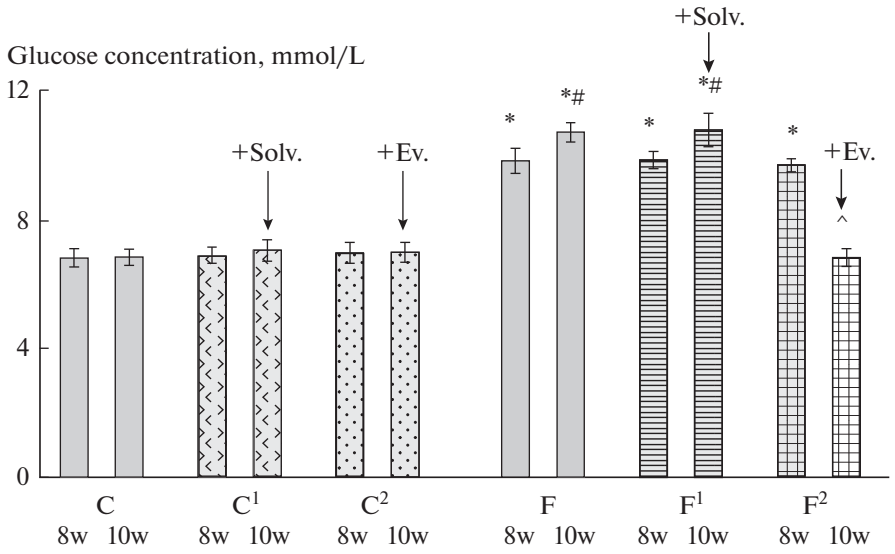

Рис. 2. Влияние эводиамина на содержание глюкозы в крови крыс через 1 ч после нагрузки глюкозой (2г/кг, в/б) в норме и при потреблении фруктозы.

Группы: К – контроль – интактные крысы со стандартным питьевым режимом; $К^1$ + Раств. и $К^2$ + Эв. – через 8 нед. после начала эксперимента интактным группам $К^1$ (контроль^1) и $К^2$ (контроль^2) вводили либо растворитель (Раств.), либо эводиамин (Эв.), соответственно; Ф – фруктоза – 12.5%-ный р-р фруктозы в течение 10 нед.; $Ф^1$ + Раств. и $Ф^2$ + Эв. –через 8 нед. после начала потребления фруктозы группам $Ф^1$ (фруктоза^1) и $Ф^2$(фруктоза^2) вводили либо растворитель, либо эводиамин соответственно; эводиамин и растворитель – 10 мг/кг, в/б, через день, 2 нед.; 8 н., 10 н. – 8 и 10 нед. после начала эксперимента; *, #, ^ – $p < 0{,}05$ относительно: * – контрольных групп, # – группы Ф/8н., ^ – группы Ф/10н. Данные представлены в виде: M ± SEM

Таблица 2. Влияние эводиамина на содержание в крови крыс триглицеридов и ТБК-РП в норме и через 10 недель после потребления фруктозы

Экспериментальные группы	Концентрация триглицеридов ммоль/л	Концентрация ТБК-РП мкмоль/л
Контроль – интактные крысы	0.701 ± 0.060	7.9 ± 0.4
Контроль^1 + растворитель (через 8 недель после начала эксперимента)	0.710 ± 0.082	7.8 ± 0.5
Контроль^2 + эводиамин (через 8 недель после начала эксперимента)	0.698 ± 0.061	7.4 ± 0.2
Фруктоза – (12.5%-ный р-р, 10 недель)	1.2 ± 0.1*	10.6 ± 0.6*
Фруктоза^1 + растворитель (через 8 недель после начала эксперимента)	1.3 ± 0.2*	10.8 ± 0.5*
Фруктоза^2 + эводиамин (через 8 недель после начала эксперимента)	0.685 ± 0.062^	6.8 ± 0.2^

* – $p < 0.05$ – относительно контроля; ^ – $p < 0.05$ – относительно группы “фруктоза”.
Значения представлены в виде: M ± SEM.
n – 9–10 крыс в каждой группе.

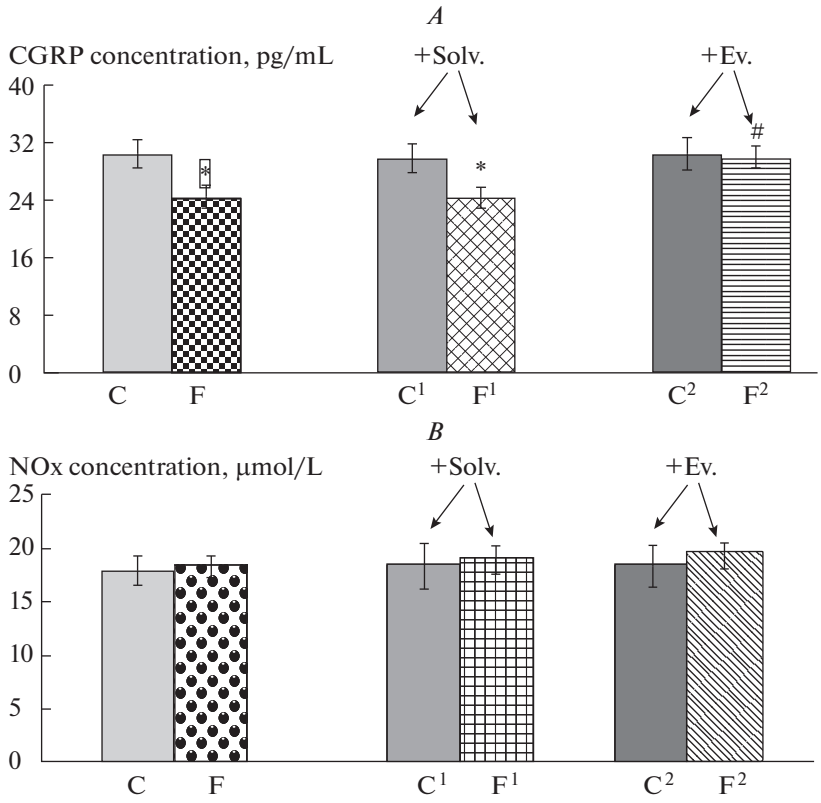

Рис. 3. Влияние эводиамина на содержание CGRP (*А*) и NOx (*Б*) в крови крыс в норме и через 10 недель после начала потребления фруктозы.

Группы: К (контроль) – интактные крысы со стандартным питьевым режимом; $К^1$ + Раст. и $К^2$ + Эв. – через 8 нед. после начала опыта интактным группам $К^1$ (контроль^1) и $К^2$ (контроль^2) вводили либо растворитель (Раств.), либо эводиамин (Эв.) соответственно; Ф – (фруктоза) – 12.5%-ный р-р фруктозы в течение 10 нед.; $Ф^1$ + Раст. и $Ф^2$ + Эв. – через 8 нед. после начала потребления фруктозы группам $Ф^1$ (фруктоза^1) и $Ф^2$ (фруктоза^2) вводили либо растворитель, либо эводиамин соответственно; эводиамин и растворитель – 10 мг/кг, в/б, через день, 2 нед.; * – $p < 0.05$ относительно контрольных групп: # – $p < 0.05$ относительно группы фруктоза/без эводиамина. Данные представлены в виде: M ± SEM.

2. Влияние эводиамина на исследуемые показатели у крыс в норме и при потреблении фруктозы

Введение эводиамина или его растворителя животным со стандартным питьевым режимом показало, что величина АД, содержание в крови глюкозы (натощак и после нагрузки глюкозой) ТГ и ПОЛ и CGRP и NOx не отличались от соответствующих показателей контрольных животных (рис. 1, 2), (табл. 1, 2), (рис. 3*А*, *Б*).

Иные результаты получены через 2 недели после введения эводиамина животным, потреблявшим фруктозу. Величина АД у этих животных снижалась на 20.8% по сравнению с группой, употреблявшей фруктозу в течение 10 недель, но не получавшей эводиамин, и достигала контрольных значений (рис. 1). Концентрации в крови глюкозы (через 1 ч после нагрузки) ТГ и продуктов ПОЛ у этой группы не отличались от показателей контрольных животных (рис. 2, табл. 2).

Содержание CGRP в крови у группы, потреблявшей фруктозу и получавшей эводиамин, было выше более чем 18.14% по сравнению с животными, употреблявшими только фруктозу (рис. 3*А*). Концентрация CGRP после введения эводиамина не отличалась от таковой контрольных животных (рис. 3*А*). Уровень NOx в крови после введения эводиамина, животным, получавшим фруктозу, не отличался от группы, употреблявшей только фруктозу (рис. 3*Б*).

При введении животным с фруктозной диетой ДМСО все исследуемые показатели через 2 нед. последующего потребления фруктозы имели те же значения, что в и группе, получавшей фруктозу в течение 10 недель, но без воздействия эводиамином (рис. 1, 2, 3), (табл. 1, 2). Это значит, что все изменения, полученные нами после введения эводиамина, связаны с его действием и не обусловлены влиянием его растворителя.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты наших исследований показали, что развитие артериальной гипертензии у крыс, потреблявших фруктозу, сопровождается снижением содержания CGRP в крови. Считают, что основным источником нейронального происхождения этого нейропептида в крови являются периваскулярные сенсорные нервы, экспрессирующие TRPV1 [5, 7], выделяющие CGRP не только из центральных, но и периферических нервных окончаний (локальная эффекторная функция этих сенсорных нервов) и проекции которых широко представлены в сосудистом русле [2, 3, 5, 7, 8]. Наличие в крови CGRP нейронального происхождения дает основания предполагать, что CGRP, помимо локального действия в местах выделения из периферических нервных терминалей, может оказывать системное влияние, одним из возможным запускающим механизмом которого может быть связывание с рецепторами CGRP, которые расположены во всех тканях и органах и представляют собой комплекс CRLR/RAMP1(calcitonin receptor-like receptor/receptor activity-modifying protein1), обладающих высоким сродством к CGRP [4, 7, 8].

Тот факт, что активация TRPV1 вызывает восстановление сниженного содержания CGRP в крови до нормальных значений, указывает на то, что снижение этого нейропептида в крови связано с уменьшением активности TRPV1-сенсорных нервов. В пользу того, что процесс развития гипертензии при потреблении фруктозы сопровождается снижением активности сенсорных нервов, свидетельствуют и данные литературы о снижении синтеза CGRP в дорзальных ганглиях и уменьшении плотности CGRP-содержащих волокон в артериях брыжейки крыс, потреблявших фруктозу в течение 10 недель [9, 13]. Подтверждением того, что TRPV1 опосредуют повышение концентрации CGRP в крови, являются данные об устранении этого эффекта антагонистом данных рецепторов капсазепином [18].

Высказывается точка зрения, что одна из функций CGRP, реализуемая путем увеличения его синтеза и повышенного выделения из терминалей, заключается в препятствии развитию различных патологий, в том числе гипертензии и диабету [5, 7]. Это нашло подтверждение и в наших результатах, полученных после введения агониста TRPV1 эводиамина, животным потреблявшим фруктозу в течение 8 нед. У этих животных после активации TRPV1 эводиамином не только не происходило последующего роста АД (в отличие от крыс, не получавших этот препарат), но его величина, а также содержание в крови CGRP не отличались от соответствующих данных, полученных от контрольных животных. Таким образом, активация TRPV1 у крыс с повышенным АД препятствует последующему росту АД, одним из возможных опосредующих механизмов которого является нормализация уровня CGRP.

Введение эводиамина, помимо снижения АД, оказывало подобный эффект на содержание ТГ, продуктов ПОЛ и глюкозы через один час после нагрузки, что

можно рассматривать как улучшение толерантности к глюкозе. Данные литературы свидетельствуют о широкой биологической активности эводиамина: антиноцептивной, антивоспалительной, противораковой, антиатерогенной [19]. Эводиамин снижает ожирение и улучшает инсулин-резистентность, повышает толерантность к глюкозе у тучных мышей [20]. Эти эффекты реализуются как через TRV1-пути, так и другие механизмы, которые включают экспрессию мРНК гидролазы триглицеридов жировой ткани и ингибирования фосфорилирования серина в IRS1(insulin receptor substrate 1), индикатора инсулин-резистентности [19, 21].

В отличие от крыс, потреблявших фруктозу, введение эводиамина контрольным животным не сопровождалось изменением уровня CGRP в крови и не оказывало влияния на АД и другие регистрируемые нами метаболические показатели в крови, что свидетельствует об устойчивости механизмов физиологической регуляции этих функций у нормальных животных к агонистам TRPV1. Данные литературы также свидетельствуют о том, что введение CGRP или капсаицина в стимулирующих дозах нормотензивным животным не изменяют величину АД [7]. Сопоставление этих данных с результатами, полученными у крыс, потреблявших фруктозу, указывает на важную роль функционального статуса, сенсорных нервов, содержащих CGRP, у животных с нарушенной регуляцией, в частности, с артериальной гипертензией, как для развития патологического процесса, так и для препятствия его развитию.

Вопрос о конкретных механизмах, реализующих участие CGRP в развитии гипертензии, остается открытым. Как указывалось ранее, одним из важных опосредующих факторов вазодилататорного действия CGRP является эндотелиальный NO [4, 6–8]. Высказывается точка зрения, что главной и конечной причиной развития гипертензии при длительном потреблении фруктозы, является дисфункция эндотелия, снижение вазорелаксации сосудов, вызванное снижением синтеза и активности эндотелиальной синтазы NO (e-NOS), уменьшением содержания NO и снижением биодоступности NO [15]. Однако данные литературы, полученные при изучении уровня NOx в крови у крыс с гипертензией, вызванной фруктозой, неоднозначны. Показано, что этот процесс может сопровождаться как снижением содержания NOx в крови [22], так и увеличеним их уровня [23]. Кроме этого, имеются данные о том, что гипертензия, вызванная фруктозой, не влияет на содержание NOx в крови [24].

Данные наших исследований показали, что развитие артериальной гипертензии и другие метаболические нарушения, вызванные потреблением фруктозы, не изменяют содержание NOx в крови. Активация TRPV1 как у контрольных животных, так и крыс, потреблявших фруктозу, также не оказывала влияние на содержание этих метаболитов. Возможно, что совместное участие NO и CGRP в опосредовании гипотензивного эффекта связано с локальными изменениями активностей TRPV1, eNOS и содержанием NO в стенке сосудов, что находит подтверждение в данных, полученных на культуре эндотелиальных клеток, в которых в ответ на активацию TRPV1 обнаружено повышение активности eNOS и увеличение продукции NO [25].

Высказывается точка зрения о том, что развитие артериальной гипертензии и инсулин-резистентности у крыс с фруктозной диетой, обусловлено нарушением баланса между симпатическими и CGRP-содержащими нервами [9, 13]. В качестве доказательства авторы приводят данные о повышении плотности симпатических нервных окончаний и снижении CGRP-иннервации в сосудах брыжейки у крыс с длительной фруктозной диетой.

Данные литературы свидетельствуют о реципрокном взаимодействии между CGRP-содержащими- и симпатическими нервами [4, 26, 27]. Так показано, что снижение выделения CGRP из нервных терминалей, может осуществляться при активации симпатическими медиаторами α_2-адренорецепторов, локализованных на этих сенсорных нервных окончаниях [27]. Для объяснения снижения уровня CGRP у

крыс, потреблявших фруктозу, эти данные могут представлять интерес, поскольку повышенная активность симпатической нервной системы рассматривается некоторыми исследователями в качестве причины развития гипертензии при потреблении фруктозы [15, 20]. С другой стороны, имеются данные о том, что экзогенная аппликация CGRP на артериолы тормозит выделения медиаторов из симпатических нервных окончаний [26]. Можно предположить, основываясь на приведенном выше реципрокном механизме регуляции функций этими нервами, что одной из причин снижения АД у гипертензивных крыс после введения эводиамина является снижение активности симпатических нервов, вызванное активацией TRPV1.

Таким образом, наши исследования показали, что снижение содержания CGRP в крови является одной из составляющей механизма развития артериальной гипертензии у крыс с длительным потреблением фруктозы. При активации TRPV1 эводиамином у животных с повышенным АД наблюдается восстановление уровня CGRP до нормальных значений и снижение АД. Эводиамин оказывает терапевтическое действие и на другие метаболические нарушения, выявленные у крыс с артериальной гипертензией: улучшает толерантность к глюкозе, снижает повышенное содержание ТГ и окислительный стресс. Однако вопрос опосредуются эти терапевтические эффекты эводиамина через TRPV1-пути или другие механизмы, требует дальнейших исследований.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 0538-2014-0010).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ivanova B., Spiteller M.* Evodiamine and rutaecarpine alkaloids as highly selective transient receptor potential vanilloid 1 agonists. Int. J. Biol. Macromol. 65: 314–324. 2014.
2. *Holzer P.* Peptidergic sensory neurons in the control of vascular functions: mechanisms and significance in the cutaneous and splanchnic vascular beds. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 121(1): 49–146. 1992.
3. *Holzer P.* Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. Neuropeptides. 38(6): 377–384. 2004.
4. *Brain S.D., Grant A.D.* Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. Physiol. Rev. 84(3): 903–934. 2004.
5. *Deng P.Y., Li Y.J.* Calcitonin gene-related peptide and hypertension. Peptides. 26: 1676–1685. 2005.
6. *Kee Z., Kodji X., Brain S.D.* The Role of Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP) in Neurogenic Vasodilation and its Cardioprotective Effects. Front. Physiol. 9: 1–12. 2018.
7. *Russell F.A., King R., Smillie S.J., Kodji X., Brain S.D.* Calcitonin gene-related peptide: Physiology and pathophysiology. Physiol. Rev. 94(4): 1099–1142. 2014.
8. *Smillie S.J., Brain S.D.* Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and its role in hypertension. Neuropeptides. 45: 93–104. 2011.
9. *Takatori S., Zamami Y., Mio M., Kurosaki Y., Kawasaki H.* Chronic hyperinsulinemia enhances adrenergic vasoconstriction and decreases calcitonin gene-related peptide-containing nerve-mediated vasodilation in pithed rats. Hypertens. Res. 29(5): 361–368. 2006.
10. *Fujioka S., Sasakawa O., Kishimoto H., Tsumura K., Morii H.* The antihypertensive effect of calcitonin gene-related peptide in rats with norepinephrine- and angiotensin II-induced hypertension. J. Hypertens. 9(2): 175–179. 1991.
11. *Mai T.H., Wu J., Diedrich A., Garland E. M., Robertson D.* Calcitonin gene related peptide (CGRP) in autonomic cardiovascular regulation and vascular structure. J. Am. Soc. Hypertens. 8(5): 286–296. 2014.
12. *Gram D.X., Hansen A.J., Wilken M., Elm T., Svendsen O., Carr R.D., Ahrén B., Brand C.L.* Plasma calcitonin gene-related peptide is increased prior to obesity, and sensory nerve desensitization by capsaicin improves oral glucose tolerance in obese Zucker rats. Eur. J. Endocrinol. 153(6): 963–969. 2005.
13. *Zamami Y., Takatori S., Hobara N., Yabumae N., Tangsucharit P., Jin X., Hashikawa N., Kitamura Y., Sasaki K., Kawasaki H.* Hyperinsulinemia induces hypertension associated with neurogenic vascular dysfunction resulting from abnormal perivascular innervations in rat mesenteric resistance arteries. Hypertens. Res. 34(11): 1190–1196. 2011.

14. *Толочко З.С., Спиридонов В.К.* Влияние капсаицина на окислительную модификацию белков плазмы и артериальное давление у крыс, потреблявших фруктозу. Эксперим. клин. фармакол. 75(3): 3–6. 2012. [*Tolochko Z.S., Spiridonov V.K.* Effects of capsaicin on oxidative modification of blood plasma proteins and arterial blood pressure in fructose-fed rats. Eksp. Klin. Farmakol. 75(3): 3–6. 2012 (In Russ.)].
15. *Tran L.T., Yuen V.G., McNeill J.H.* The fructose-fed rat: A review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. Mol. Cell. Biochem. 332: 145–159. 2009.
16. *Navarro-Gonzálvez J.A., García-Benayas C., Arenas J.* Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. Clin. Chem. 44(3): 679–681. 1998.
17. *Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Climent I., Lenz A.G., Ahn B.W., Shaltiel S., Stadtman E.R.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods Enzymol. 186: 464–478. 1990.
18. *Rang W.Q., Du Y.H., Hu C.P., Ye F., Xu K.P., Peng J., Deng H.W., Li Y.J.* Protective effects of evodiamine on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. Planta Med. 70(12): 1140–1143. 2004.
19. *Yu H., Jin H., Gong W., Wang Z., Liang H.* Pharmacological actions of multi-target-directed evodiamine. Molecules. 18(2): 1826–1843. 2013.
20. *Verma S., Bhanot S., McNeill J.H.* Sympathectomy prevents fructose-induced hyperinsulinemia and hypertension. Eur. J. Pharmacol. 373: 1–4. 1999.
21. *Wang T., Kusudo T., Takeuchi T., Yamashita Y., Kontani Y., Okamatsu Y., Saito M., Mori N., Yamashita H.* Evodiamine inhibits insulin-stimulated mTOR-S6K activation and IRS1 serine phosphorylation in adipocytes and improves glucose tolerance in obese/diabetic mice. PloS One. 8(12): e83264. 2013.
22. *Mellouk Z., Sener A., Ait Yahia D., Malaisse W.J.* The metabolic syndrome of fructose-fed rats: effects of long-chain polyunsaturated ω3 and ω6 fatty acids. VII. Oxidative stress. Mol. Med. Rep. 6(6): 1409–1412. 2012.
23. *Kantar Ş., Türközkan N., Bircan F.S., Paşaoğlu Ö.T.* Beneficial effects of melatonin on serum nitric oxide, homocysteine, and ADMA levels in fructose-fed rats. Pharm. Biol. 53(7): 1035–1041. 2015.
24. *Lee D.H., Lee J.U., Kang D.G., Paek Y.W., Chung D.J., Chung M.Y.* Increased vascular endothelin-1 gene expression with unaltered nitric oxide synthase levels in fructose-induced hypertensive rats. Metabolism. 50(1): 74–78. 2001.
25. *Ching L.C, Kou Y.R., Shyue S.K., Su K.H., Wei J., Cheng L.C., Yu Y.B., Pan C.C., Lee T.S.* Molecular mechanisms of activation of endothelial nitric oxide synthase mediated by transient receptor potential vanilloid type 1. Cardiovasc. Res. 91(3): 492–501. 2011.
26. *Coffa P.F., Kotecha N.* Modulation of sympathetic nerve activity by perivascular sensory nerves in the arterioles of the guinea-pig small intestine. J. Auton. Nerv. Syst. 77(2–3): 125–132. 1999.
27. *Deng P.Y., Yu J., Ye F., Li D., Luo D., Cai W.J., Zhang J.W., Luo X.G., Deng H. W., Li Y.J.* Interactions of sympathetic nerves with capsaicin-sensitive sensory nerves: neurogenic mechanisms for phenol-induced hypertension in the rat. Hypertension. 23(3): 603–609. 2005.

The Influence of Vanilloid Receptor Activation by Evodiamine on the CGRP Content in Blood of Normal and Fructose-Fed Rats

Z. S. Tolochko[a], * and V. K. Spiridonov[a]

[a] *Institute of Physiology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, 630117 Russia*

**e-mail: toloch@physiol.ru*

Background: Calcitonin-gene-related peptide (CGRP) is a neurotransmitter of capsaicin-sensitive nerves, one of the most powerful vasodilators, in mediation of vasoactive action of which the nitrogen oxide (NO) takes part. The aim of this study was to evaluate the CGRP and NO blood levels in normal rats and rats with fructose-induced hypertension, with unaffected transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptors, and after the administration of their agonist evodiamine. Male Wistar Rats were given to drink either 12.5% fructose solution or tap water (control) for 10 weeks. Evodiamine (10 mg/kg), a TRPV1 agonist, was administered intraperitoneally every other day, for 2 weeks, starting 8 weeks after the start of the fructose intake. The systolic blood pressure was measured using a noninvasive technuque. The glucose levels, fasting and 1 hour after the glucose load (2 g/kg, i.p), were measured by a glucometer in the blood sampled from the caudal vein. Concentrations of CGRP, NO metabolites (NOx), triglycerides (TG) and lipid peroxidation products (LPO) were measured in the blood serum of rats. The fructose consumption led to hypertension, impaired glucose tolerance, increased the blood levels of LPO products and TG, and decreased the CGRP blood content. The evodi-

amine introduction to fructose-consuming rats restored the blood CGRP content to the control values, reduced the blood pressure, LPO products and TG levels, and improved the glucose tolerance. The NOx levels did not differ from the control in all groups. We suggest that CGRP is involved in the development of the fructose-induced hypertension and in mediating the therapeutic effect of the evodiamine.

Keywords: Evodiamine, TRPV1, CGRP, nitric oxide, hypertension, fructose

ЦИТИРОВАТЬ:

Толочко З.С., Спиридонов В.К. Влияние активации ванилоидных рецепторов эводиамином на содержание кальцитонин-ген-родственного пептида в крови крыс в норме и при гипертензии, вызванной потреблением фруктозы. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 105(12): 110–120.

DOI: 10.31857/S0869813919120112

TO CITE THIS ARTICLE:

Tolochko Z.S., Spiridonov V.K. The Influence of Vanilloid Receptor Activation by Evodiamine on the CGRP Content in Blood of Normal and Fructose-Fed Rats. Russian Journal of Physiology. 105(12): 110–120.

DOI: 10.31857/S0869813919120112

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 1, с. 121–132

МЕТОДИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОЦИАЛЬНЫХ РАНГОВ ЖИВОТНЫХ В МАЛЫХ ГРУППАХ

© 2020 г. И. С. Матюлько[1, 2, *], Е. П. Муртазина[1], Б. В. Журавлев[1]

[1]НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина, Москва, Россия

[2]Национальный исследовательский университет "Высшая школа экономики", Москва, Россия

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

Поступила в редакцию 04.07.2019 г.
После доработки 16.10.2019 г.
Принята к публикации 21.10.2019 г.

Представлены методы определения социальных рангов крыс, основанные на количественном анализе социометрических матриц, построенных с использованием данных об антагонистических отношениях животных, возникающих во время конкуренции за получение подкрепления. Проведены сравнение и оценка существующих методов, а также предложена новая экспериментальная модель изучения доминантного поведения крыс в малых группах в лабораторных условиях с учетом питьевой активности каждой особи и диадических конкурентных взаимодействий. Предложены алгоритмы анализа полученных данных на основе построения гистограмм распределения количеств и длительностей питьевых актов у крыс в группах, учета всех диадических соотношений побед и поражений особей в борьбе за доступ к поилке, а также оценки приоритетности особей в удовлетворении питьевой мотивации во временной динамике экспериментальных сессий. Результаты апробации предложенных методов показали, что их комплексное использование позволяет провести точную оценку социального ранга каждой крысы, а также проследить динамику становления, стабильности и пластичности иерархической социальной организации групп на длительном протяжении их существования. Таким образом, применение данной комплексной методики может позволить выявлять взаимосвязи иерархической структуры групп социальных животных и индивидуальных социальных рангов особей с различными физиологическими, фармакологическими, средовыми и другими факторами.

Ключевые слова: социальный ранг, иерархическая организация группы, доминантность, социометрическая матрица, конкуренция, питьевая мотивация

DOI: 10.31857/S0869813920010082

Многие виды животных живут в группах, образуя сложные системы, внутри которых осуществляется адаптация к окружающей среде, охота, миграция, размножение и эволюция. В процессе взаимодействия особей внутри социальных групп происходит формирование многоуровневой иерархической организации, в основе которой лежат определенные физиологические и нейрохимические процессы, связанные с участием нейроэндокринной, дофаминергической и серотонинергической систем в формировании доминантной структуры группы за счет регуляции уровня агрессии, устойчивости к стрессу и кооперативного поведения [1, 2]. Показано, что активность многочисленных отделов головного мозга, таких как миндалина, гиппокамп, стриатум, префронтальная и париетальная корковые области

участвуют в формировании и восприятии доминантности, а также различных видов зоосоциального поведения [3, 4].

Иерархическая структура подразумевает распределение обязанностей и ролей между членами группы, каждый из которых обладает определенным социальным рангом (иерархическим статусом), установившимся в результате социального опыта взаимодействий – как антагонистических, так и кооперативных. Кооперативные взаимоотношения, как правило, направлены на достижение общей цели и зачастую характерны для таких процессов, как охота, защита от врагов, забота о потомстве. Под антагонистическими взаимодействиями понимается конкурентное и агрессивное поведение особей по отношению друг к другу, целью которого является установление доминантности и определяет ранг особи в группе [4]. Успешные особи (победители) являются доминантами, в то время как менее успешные (проигравшие) – субординантами. В случае, если антагонистические взаимоотношения основаны исключительно на конкурентных способностях, наблюдается корреляция социального ранга с физическими характеристиками особей, а сам ранг обладает свойством транзитивности: если особь *А* доминирует над особью *Б*, а та в свою очередь над особью *С*, то особь *А* также доминирует над *С* [5]. Однако гораздо чаще встречаются ситуации, когда иерархическая структура характеризуется нелинейностью и лабильностью, а особи формируют не диады (доминант–субординант), а триады, и даже тетрады, в которых позиции победителей и проигравших могут меняться для различных взаимодействующих между собой животных. По этой причине оценка доминантности особей и иерархической структуры групп зачастую оказывается затруднительной и требует комплексного подхода, включающего создание экспериментальных установок, обеспечивающих объективное наблюдение за поведением животных и регистрацию паттернов взаимодействий, а также разработку программных средств для последующего количественного анализа многосторонних взаимоотношений.

Для исследования доминантности животных в лабораторных условиях применяются поведенческие модели, подразумевающие контакт между животными из разных групп (модель конфликта) или же из одной. В последнем случае используют модели конкуренции, основанные на применении естественных физиологических подкрепляющих стимулов, таких как привлекательная для животных пища или сладкая вода. Для повышения мотивации животных до проведения эксперимента их ограничивают в доступе к пище или воде.

Одним из тестов, используемых для изучения диадических отношений, а именно уровня агрессии и доминантности, является “Стандартный тест оппонентов” (Standard Opponent Test). Тестируемое животное помещается в нейтральную среду с незнакомой особью своего вида – оппонентом. Далее проводится количественная оценка поведенческих актов обнюхивания тела и гениталий, преследования, встряхивания хвостом, количества укусов [6].

Разновидностью теста, не подразумевающего наличие конфликта между животными, является тест “Труба” [7], в котором две особи одного пола помещаются на противоположных концах прозрачной трубы. В процессе проявления исследовательской активности животные начинают двигаться по направлению к центру до момента встречи друг с другом. Доминантной считается та особь, которая при встрече будет иметь склонность двигаться вперед, в то время как подчиненная особь будет отступать назад до тех пор, пока не будет вытолкнута первой.

Для исследования социальных рангов крыс также используется “Система открытой норы” (Visible Burrow System) [8]. Экспериментальная установка состоит из нескольких камер, соединенных коридорами. Измеряемыми параметрами для выявления доминантности являются время, проведенное вне установки, ранение животных, количество конфликтов между особями в диадах и потеря массы тела.

В дополнение к поведенческим параметрам, также измеряются уровни кортикостерона, кортизола [1], тестостерона [2] и окситоцина в плазме крови или слюне [9].

Исследование социального статуса крыс в триадах в условиях конкуренции животных за доступ к поилке после 24-часовой питьевой депривации представлено в работе Д.Г. Иванова с соавт. [10]. В экспериментальную камеру, по центру которой находилась поилка с водой, помещали трех особей и в течение 8 мин регистрировали латентное время первого подхода к поилке, общее число подходов, а также длительность их питьевого поведения. Для каждой крысы также регистрировали количество контактов, когда особь отгоняла других от поилки (А) и число раз, когда другие особи отгоняли ее (Б). Социальный статус рассчитывался как вероятность доминирующего поведения (ВДП), равную отношению числа доминирования крысы над другими к сумме числа событий, когда животное отгоняло других и когда отгоняли его (ВДП = А/(А + Б)). Доминантами считались животные, вероятность доминирующего поведения которых превышала или была равна 0.65; субдоминантами считались особи со значением индекса между 0.35 и 0.65; субординанты характеризовались значениями ВДП меньшими или равными 0.35.

П.Д. Шабанов и А.А. Лебедев [11] в своей работе исследовали модель конкурентных взаимоотношений крыс (группы по 8–10 особей) за доступ к поилке. После суточной питьевой депривации животных помещали в экспериментальную клетку, где им было необходимо достигнуть поилки, находящейся на расстоянии 22 см от пола и соединенной с полом клетки наклонной лестницей. Конкурентоспособность (Кп) крыс определяли как соотношение времени питья (в минутах) из поилки (Тп) к общему времени эксперимента (То) и выражали через индекс Кп (Кп = Тп/То). Более высокие значения коэффициента соответствовали более высокой конкурентоспособности крысы, т.е. большей успешности в доступе к воде.

Данные, полученные в результате наблюдений за взаимоотношениями между животными в группах, обрабатываются с помощью математических методов, включая построение и анализ социометрических матриц для выявления иерархической структуры и доминантности особей [12, 13]. Часто в работах используются индексы линейности [14], отражающие, насколько внутригрупповые отношения соответствуют линейному типу иерархии. Однако при использовании подобных подходов важно учитывать, что организация сообществ зачастую является нелинейной [7].

Исходя из вышеизложенного, разработка новых подходов к исследованию индивидуальных социальных рангов (доминантности) особей и иерархической структуры групп млекопитающих, а также создание новых экспериментальных лабораторных комплексов и их программного обеспечения является актуальной современной задачей физиологии и социоэтологии.

Целью настоящей работы была разработка и апробация лабораторных методов определения социальных рангов особей и иерархической структуры в малых группах крыс в процессе конкуренции за подкрепление на фоне доминирующего мотивационного состояния.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на самцах крыс линии Вистар (n = 16) с исходной массой на момент начала исследования 150–200 г. Крысы содержались в группах по 5–6 особей (3 группы) в условиях вивария при температуре 22°С и регулярном световом цикле (включение света в 8:00, выключение в 22:00). На протяжении всего периода исследования животные находились в условиях свободного доступа к воде и корму (“Полнорационный комбикорм для лабораторных животных ПК 120-1240” в виде экструдированных гранул, ЗАО "Гатчинский ККЗ”, Россия) за исключением дней, предшествующих тестированию доминантности. Содержание пищевых ве-

ществ, витаминов и минералов в корме соответствовало международным стандартам и позволяло полностью обеспечить все физиологические потребности животных. Исследование было выполнено с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директиве европейского сообщества (86/609/ЕС) и в соответствии с принципами Базельской декларации и требованиями, указанными в Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. Проведение эксперимента было одобрено этическим комитетом ФГБНУ "НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина".

Нами был создан экспериментальный комплекс для исследования иерархического статуса крыс в малых группах, схожий по конструкции с использованным П.Д. Шабановым и А.А. Лебедевым [11]. Установка включала камеру (52 × 30 × 19 см) с прозрачными стенами, к одной из которых прилегала приподнятая платформа в форме куба (10 × 10 см), на которую могла забраться только одна крыса. Над платформой располагался кончик поилки, закрепленной на наружной стороне камеры на регулируемой высоте, так, чтобы крысы могли достичь поилки в вертикальной стойке.

Для дистанционного наблюдения за крысами, записи и регистрации поведенческих паттернов над экспериментальным боксом была установлена веб-камера. Каждой крысе присваивался свой номер, который наносился маркером на спинку.

Перед экспериментальной сессией животные подвергались суточной питьевой депривации. Крыс одной группы помещали в экспериментальную камеру на 30 мин, где они вступали в конкуренцию за доступ поилке, поочередно забираясь на платформу и сталкивая друг друга.

Поведенческие паттерны регистрировали дистанционно на компьютере с помощью разработанной нами программы "Этограф". Посредством нажатия на клавишу, соответствующую номеру крысы, экспериментатор отмечал, какая именно особь забралась на платформу. Если крыса слезала сама, за ее номером следовал ноль, если же ее сталкивала другая особь – отмечали номер столкнувшего животного. После окончания наблюдения в программе "Этограф" автоматически создавался файл, содержащий данные об эксперименте (дата и время проведения, количество животных, масса тела, возраст и пол каждой крысы), суммарное количество (N) и общая длительность (T) питьевых актов для каждой крысы, а также полная временная динамика (время начала и длительность) зарегистрированных событий.

Тестирование доминантности и оценку иерархической организации групп проводили один раз в неделю на протяжении 9 недель, начиная с момента получения крыс из питомника и формирования групп с использованием процедуры рандомизации.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На основе данных зарегистрированной поведенческой активности строили гистограммы распределения количеств и длительностей питьевых актов всех крыс внутри группы за экспериментальную сессию. На рис. 1 представлен пример гистограмм, построенных для всех крыс одной из экспериментальных групп.

Расчет доли времени питья T по каждой крысе (в % от общего времени сессии) совпадает с определением коэффициента конкурентоспособности, предложенным П.Д. Шабановым и А.А. Лебедевым [11]. В нашей работе мы предлагаем учитывать не только суммарную длительность питья каждой особи, но и количество ее питьевых актов N (в % от общего количества питьевых актов всех крыс в группе), так как показатель T напрямую не отражает конкурентные взаимодействия между особями.

В дополнение к статистическим показателям питьевой активности мы предлагаем определять доминантность крыс, рассчитывая соотношение числа побед и по-

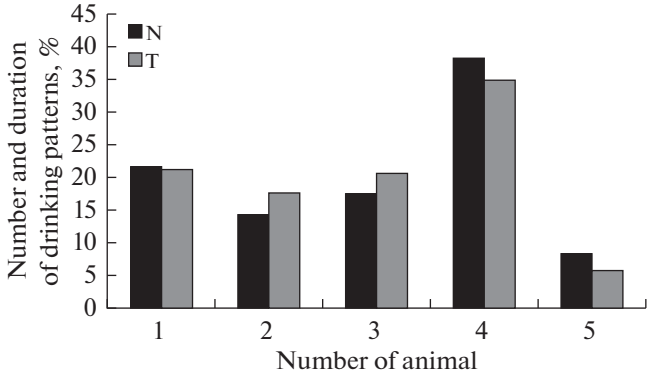

Рис. 1. Пример гистограмм распределения количеств и длительностей питьевых актов всех животных из одной группы в течение 30-минутной экспериментальной сессии. Данные представлены в процентах от общей активности (*N* %) и общего времени питья (*T* %) за данную сессию.

Fig. 1. Histograms of the distribution of the number and duration of drinking patterns of all animals of one group within a 30-min experimental session. The data are presented as a percentage of the total activity (*N* %) and total drinking time (*T* %) within a given session.

ражений во всех диадах с учетом результативности каждой крысы относительно суммарной активности группы. На основе данных динамики поведенческих паттернов составляли социометрические матрицы, содержащие количество побед и поражений каждой особи в результате ее диадических взаимодействий с каждым из представителей группы. В таблице также учитывались акты, когда животное без борьбы залезало на пустую платформу и самостоятельно покидало ее. Пример социометрической матрицы, построенной на основе результатов одной экспериментальной сессии, приведен в табл. 1.

Для определения иерархического статуса каждой особи нами был разработан индекс *HS*, рассчитываемый по следующей формуле:

$$HS = (W/L \times IA)\ /GA(3),$$

где *W* – суммарное количество побед данной крысы над другими особями группы; *L* – суммарное количество проигрышей данной особи другим животным группы; *IA* – индивидуальная активность каждой особи, выражаемая как сумма всех побед (*W*) и актов, когда крыса залезла на пустую платформу без конкуренции (*O*1) или как сумма всех поражений (*L*) и актов, когда крыса покинула платформу без борьбы (*O*2); *GA* – общая активность группы, равная сумме индивидуальных активностей всех особей в группе.

Индекс *HS* может принимать любые значения от 0 до 1, а сумма значений *HS* всех животных в группе внутри одной сессии равняется единице. Иерархическая организация группы определяется путем сопоставления рангов. Крысы, характеризующиеся наибольшей величиной индекса *HS*, являются доминантными, в то время как особи с меньшим значениям ранга занимают подчиненное положение. При близких значениях индекса у двух особей, оценивается результат их диадического взаимодействия, а именно отношение их побед друг над другом (рис. 2).

Индекс *HS* характеризуется высокой лабильностью и обладает чувствительностью к изменению внешних факторов, включая социальный контекст и обучение. Предполагается, что после становления и в отсутствии внешних воздействий соци-

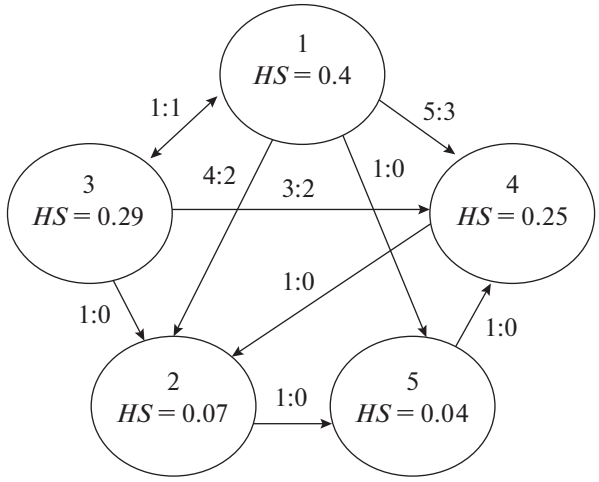

Рис. 2. Схематичное представление иерархической организации группы животных на основе данных Таблицы 1. В каждой ячейке отображен номер животного и соответствующее значение социального ранга *HS*. Стрелки направлены в сторону от "победителя" к "проигравшему" с указанием соотношения побед к поражениям.

Fig. 2. Schematic presentation of the hierarchical organization of the group according to the data shown in Table 1. Each cell contains the number of the animal and a corresponding value of social rank (*HS*). The arrows point from the "winner" toward the "loser" with the win to loss ratio indicated above.

альная структура группы относительно стабильна и изменения индексов у животных одной группы незначительны.

В отличие от гистограмм социометрический метод определения доминантного статуса животных более предпочтителен, так как индекс *HS* является нормированным показателем и позволяет объективно оценить ранги особей на основе их анта-

Таблица 1. Пример социометрической матрицы, содержащей количество побед и поражений каждой крысы в конкуренции за поилку после суточной питьевой депривации, а также количество актов, когда животное без борьбы залезло на пустую платформу или покинуло ее
Table 1. Sociometric matrix containing the total number of wins and losses of each rat in the competition for the access to a drinking bowl after 24-h water deprivation and the number of events when animals climbed to or left the platform without competition.

Номер крысы (*i*) Number of animal (*i*)	1	2	3	4	5	W	$O1_i$	$IA_i = W_i + O1_i$	HS
1		4	1	5	1	11	39	50	0.40
2	2		0	0	1	3	30	33	0.07
3	1	1		3	0	5	35	40	0.29
4	3	1	2		0	6	81	87	0.25
5	0	0	0	1		1	18	19	0.04
L	6	6	3	9	2	$GA = \sum IA_i = 229$			
$O2_i$	44	27	37	78	17				
$IA_i = L_i + O2_i$	50	33	40	87	19				

гонистических отношений с другими субъектами в диадах, в то время как гистограммы распределения количества питьевых актов и их длительностей не оценивают взаимоотношения между особями, а отражают суммарную способность удовлетворения жажды каждым индивидуумом за все время экспериментальной сессии, аналогично показателю конкурентоспособности, описанному в работе П.Д. Шабанова и А.А. Лебедева. Более того, зачастую доминантность животного, рассчитанная по показателю количеств питьевых актов, не всегда совпадает с ее оценкой по длительности питья и наоборот. Индекс *HS* позволяет оценить ранг животного в группе на основе соотношения количеств побед и поражений с учетом доли его индивидуальной питьевой активности в общей активности группы за 30-минутный период исследования.

Сопоставление результатов гистограмм распределения количества и длительностей питьевых актов и значений индекса *HS*, рассчитанного по социометрической матрице, свидетельствует о том, что конкурентоспособность животного, определенная по гистограммам, может быть не тождественна социальному рангу. Например, по приведенным выше данным видно, что питьевая активность крысы 4 была ваше остальных (рис. 1), в то время как результаты социометрической матрицы (табл. 1) свидетельствуют о том, что эта особь удовлетворяла питьевую мотивацию преимущественно избегая антагонистических контактов (т.е. залезая на пустую платформу). Самый высокий ранг в группе был у крысы 1 как результат преобладания ее побед над всеми другими особями группы.

Предложенная нами экспериментальная модель отличается от предложенной Д.Г. Ивановым по ряду параметров. В работе Д.Г. Иванова наблюдения проводились только за группами из трех животных, а их время составляло 8 мин, что, по нашему мнению, недостаточно для того, чтобы полноценно оценить динамику питьевого и конкурентного поведения особей. Предложенный Д.Г. Ивановым индекс ВДП (вероятность доминантного поведения) имеет один существенный недостаток: он может принимать равные значения у особей, проявляющих разную суммарную активность. Например, значение индекса ВДП = 0.66, определенное автором как доминантное, может быть присвоено как крысе с высокой активность (соотношение 8 побед особи к ее 12 контактам со всеми другими крысами), так и крысе с низкой активностью (соотношение 2/3 соответственно). Предложенный нами индекс позволяет избежать этой проблемы за счет учета доли индивидуальной результативности каждой крысы в суммарной активности группы.

Существуют разнообразные методы определения социальных рангов особей в группах [15], основанные на построении социометрических матриц, которые содержат количественные значения побед и поражений между всеми возможными парами особей группы. T.H. Clutton-Brock с соавт. [16] изучали поведение самцов благородных оленей во время поединков в естественной среде обитания и фиксировали соотношения побед и поражений. На основе полученных данных рассчитывали индекс *CBI* (Clutton-Brock's Index), учитывающий прямые и непрямые победы и поражения. Под прямыми победами в данном случае понимается количество побежденных данным самцом особей, в то время как непрямые победы определяются как общее количество особей, побежденных теми, над которыми одержал победу данный самец. Таким образом, непрямые победы могут характеризоваться, согласно работе M.C. Appleby [5], как линейные: самец, доминирующий над другими самцами, также доминирует над теми, над кем доминируют им побежденные. Это может быть выражено в виде схемы: $A > B > C$, $A > C$. Расчет индекса *CBI* проводится согласно следующей формуле [17]:

$$CBI = (B + b + 1)/(L + l + 1) \quad (1),$$

где B – количество особей, над которыми доминирует данный самец; b –количество особей, над которыми доминируют проигравшие данному самцу особи; L – количе-

ство особей, доминирующих над данным самцом; l – количество особей, доминирующих над теми, кто доминирует над данным самцом.

Однако недостатком данного индекса является то, что он не учитывает количество побед и поражений, а проводит только качественную оценку диадических взаимоотношений внутри каждой пары особей (над сколькими особями доминирует данный самец и сколько особей доминирует над ним), рассчитывая количество животных, но не количество антагонистических взаимодействий. По этой причине индекс *CBI* больше подходит для изучения взаимоотношений внутри больших групп животных в естественных условиях на уровне целой популяции. Предложенный нами индекс *HS* обладает бóльшей силой при изучении поведения лабораторных животных в малых группах, существующих совместно на протяжении длительного периода времени и характеризующихся многократными диадическими антагонистическими контактами.

H.A David [18, 19] предложил индекс *DS* (David's Score), который учитывает количество побед и поражений особей посредством расчета доли диадических взаимодействий каждого субъекта группы. В социометрическую таблицу вносятся значения соотношений побед особи к сумме побед и поражений. Для расчета используются взвешенные доли побед и поражений. Индекс рассчитывается по следующей формуле:

$$DS = w + w_2 - l - l_2 (2),$$

где w – суммарная доля побед данной особи; w_2 – сумма взвешенных долей побед индивидуумов, побежденных данной особью; l – суммарная доля проигрышей; l_2 – сумма взвешенных долей проигрышей индивидуумов, победивших данную особь. Данные для расчета показателей w_2 и l_2 получаются в результате умножения долей побед и поражений каждого противника на соответствующие значения w и l [17].

Значения индекса *DS* могут принимать как положительное, так и отрицательное значения. Недостатком данного метода является то, что в случае отсутствия активности животного (когда абсолютное значение его активности равно нулю), индекс *DS* может превзойти индексы с отрицательным значением, что приведет к неправильной интерпретации результатов. К тому же, не учитывается общая активность животного помимо непосредственного взаимодействия с другими особями. В отличие от индекса *DS*, предложенный нами индекс *HS* не принимает отрицательные значения и позволяет выявить животных, чья активность была равна нулю.

В дополнение к статистическому и социометрическому методам оценки рангов нами предлагается проводить дополнительный анализ динамики питьевой активности животных на протяжении сессии, который позволяет выявить более ранний доступ особи к поилке по сравнению с другими крысами и индивидуальный временной паттерн ее активности в течение эксперимента (рис. 3).

На рис. 3 представлен график, отображающий индивидуальные динамики моментов осуществления и длительностей питьевых актов крысами одной из групп за 30-минутную экспериментальную сессию. Он иллюстрирует, что животные удовлетворяли питьевую мотивацию в разные периоды времени – раньше или позже других особей. Так, например, пятая крыса смогла попить лишь в конце эксперимента, в то время как первая и четвертая крысы достигали поилки как в начале, так и на протяжении всей сессии. Третья крыса была наиболее активна во второй половине сессии, а вторая особь демонстрировала эпизодическую активность на протяжении всего опыта. Такой анализ позволяет получить дополнительные качественные критерии для уточнения социальной позиции животного в группе, особенно при равных значениях ранее рассчитанных социальных рангов. Индекс *HS* и гистограммы распределения количеств и длительностей питьевых актов являются интегральными показателями, отражающими социальное положение каждой кры-

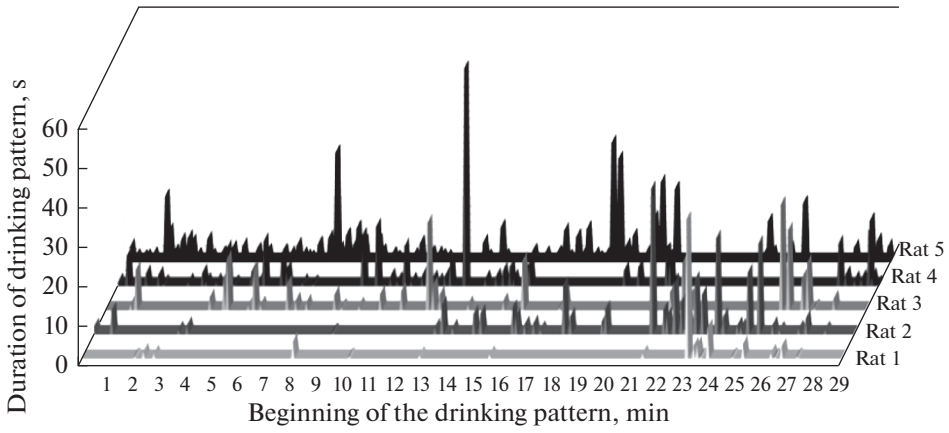

Рис. 3. Пример динамик паттернов питьевых актов всех крыс одной из групп в течение 30-минутной экспериментальной сессии. По оси абсцисс – время экспериментальной сессии (мин), по оси ординат – длительность питьевых актов каждой крысы.

Fig. 3. The dynamics of drinking patterns of all rats of one group within a 30-min experimental session. The X axis shows the time of experimental session (min); the Y axis shows the duration of each rat's drinking patterns.

сы в целом и общую питьевую активность животных, в то время как динамические характеристики питьевых актов внутри сессии позволяют оценить индивидуальный питьевой паттерн каждой крысы.

Более раннее удовлетворение мотивации жажды можно также выявить с помощью построения кумулятивных кривых длительностей доступа к поилке различными крысами в процессе эксперимента, а проведение по ним регрессионного анализа позволяет получить количественные характеристики паттернов питьевой активности крыс и сопоставить их значения между различными животными (рис. 4).

По кумулятивным графикам и показателям линейной регрессии $y_i = A_i x + B_i$ (A_i – наклон, B_i – пересечение с осью ординат) можно определить интенсивность и начало момента удовлетворения крысами питьевой мотивации. Так, на рис. 4 можно видеть, что четвертая крыса достигала поилки быстрее остальных и была активна на всем протяжении экспериментальной сессии, а временные промежутки, в которые эта крыса была неактивна, возникали лишь в конце наблюдения. Кумулятивные кривые для крыс 1 и 2 иллюстрируют меньшую для них доступность к осуществлению питьевых актов, что прослеживается на всем протяжении 30-минутной сессии. Третья и пятая крысы, как демонстрируют их кривые на рис. 4, смогли начать удовлетворять питьевую мотивацию в конкурентной среде своей группы только в середине или конце эксперимента соответственно.

Отличительной особенностью и преимуществом нашей модели является комплексный подход, позволяющий определить социальный статус каждого животного не только в данный период времени, но и проследить динамику формирования, стабильность или лабильность социальных рангов всех особей, которые содержатся совместно в течение длительного периода времени и могут при этом подвергаться различным экспериментальным воздействиям.

Таким образом, продемонстрировано, что разработанный нами метод является комплексным и не только учитывает и объединяет показатели, предложенные другими авторами, но и позволяет выявить индивидуальные характеристики питьевой и конкурентной активности каждой особи посредством построения графиков ди-

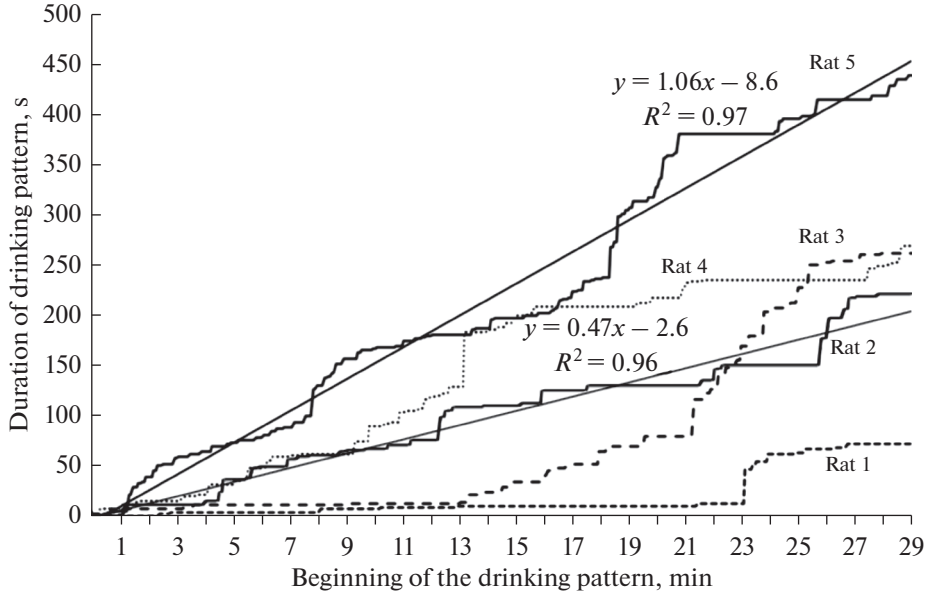

Рис. 4. Пример кумулятивных кривых длительностей питьевых актов в течение 30-минутного экспериментального сеанса у крыс одной из групп. По оси абсцисс – время экспериментальной сессии (мин), по оси ординат – текущие значения накопленной суммы длительностей осуществленных ранее питьевых актов. Для двух крыс представлены тренды и формулы с вычисленными характеристиками линейного регрессионного анализа. y – длительность питьевых актов, накопленная в течение экспериментальной сессии; x – время эксперимента; R^2 – величина достоверности аппроксимации.

Fig. 4. Cumulative curves representing the duration of drinking patterns of all animals of one group within a 30-min experimental session. The abscissa shows the time of experimental session (min); the ordinate shows current values of accumulated sum of drinking pattern durations. The trends and formulas with the parameters of linear regression are calculated and presented for two rats. y – the duration of drinking patterns, accumulated throughout the experimental session; x – time of the experiment; R^2 – reliability index.

намики активности животных за каждую экспериментальную сессию, и проследить процесс становления, а также оценить устойчивость иерархической организации групп в течение длительного периода исследования. Он может быть успешно применен в исследованиях нейробиологических коррелятов социальной структуры в группах животных, а также для выявления эффектов фармакологических агентов на социальное поведение.

Известно, что активация префронтальной коры, являющейся основным центром исполнительного контроля, непосредственно связана с обработкой информации о социальной иерархии [20]. Хирургическое разрушение этой области вызывает изменения социального поведения животного и приводит к снижению его иерархического статуса. Ранее было показано [21], что крысы, у которых проводилось разрушение области медиальной префронтальной коры, проявляют субординантное поведение в процессе антагонистических взаимодействий и характеризуются снижением мотивации в процессе конкуренции за подкрепление. Разрушение передней поясной коры, активность которой связана с соревновательной способностью [21], приводит к снижению интереса крысы к другим особям группы и ухудшению социальной памяти, а также нарушению процесса принятия решений в группе [22]. Важный вклад в модуляцию доминантного поведения у животных вно-

сит эффективность синаптических связей в медиальной префронтальной коре [23], связанная с уровнем экспрессии генов *Ras* или субъединицы GluR4 глутаматных AMPA-рецепторов. В частности, показано, что воздействия, приводящие к увеличению или снижению экспрессии этих генов, сопровождались ростом или падением индексов доминантности соответственно. Фармакологическое ингибирование дофаминовых D2-рецепторов введением антагониста сульпирида приводит к снижению социального ранга у доминантных крыс. С другой стороны, введение антагониста дофаминовых D2-рецепторов животным с более низким социальным рангом не оказывает влияние на социальный статус особей [24].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные в данной работе методы и подходы к определению социальных рангов лабораторных животных, содержащихся в группах в течение длительного периода времени, позволяют проводить оценку иерархической структуры малых групп животных в лабораторных условиях с учетом индивидуальной активности каждой особи и временной динамики изменения паттернов питьевого поведения. Предложенный нормированный показатель социального ранга *HS* позволяет учитывать диадические взаимодействия крыс и их активность. Гистограммы распределения количеств и длительностей питьевых актов, паттерны питьевого поведения каждой крысы в группе, а также кумулятивные кривые длительностей питьевых актов позволяют проанализировать конкурентное поведение и индивидуальные характеристики каждой крысы как внутри одной сессии, так и на протяжении длительного периода. Разработанные модели и методы могут быть применены для изучения изменений социальной организации групп при различных этологических и нейрохимических воздействиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Creel S.* Dominance, aggression, and glucocorticoid levels in social carnivores. J. Mammal. 86(2): 255–64. 2005.
2. *Selmanoff M.K., Goldman B.D., Ginsburg B.E.* Serum testosterone, agonistic behavior, and dominance in inbred strains of mice. Horm. Behav. 8(1): 107–19. 1977.
3. *Watanabe N., Yamamoto M.* Neural mechanisms of social dominance. Front. Neurosci. 9: 154. 2015.
4. *Hobson E.A., DeDeo S.* Social Feedback and the Emergence of Rank in Animal Society. PLoS Comput. Biol. 11(9): e1004411. 2015.
5. *Appleby M.C.* The probability of linearity in hierarchies. Anim. Behav. 31(2): 600–608. 1983.
6. *Al-Maliki S., Brain P.F.* Effects of food deprivation on fighting behaviour in standard opponent tests by male and female “TO” strain albino mice. Anim. Behav. 27: 562–566. 1979.
7. *Lindzey G., Winston H., Manosevitz M.* Social Dominance in Inbred Mouse Strains. Nature. 191(4787): 474–476. 1961.
8. *Blanchard D.C., Spencer R.L., Weiss S.M., Blanchard R.J., McEwen B., Sakai R.R.* Visible burrow system as a model of chronic social stress: behavioral and neuroendocrine correlates. Psychoneuroendocrinology. 20(2): 117–134. 1995.
9. *Lee W., Hiura L., Yang E., Broekman K.A., Ophir A.G., Curley J.* Social status in mouse social hierarchies is associated with variation in oxytocin and vasopressin 1a receptor densities. bioRxiv (online). 2019.
10. *Иванов Д.Г., Семёнов Н.А., Зайцева М.С.* Методика определения социального статуса самцов крыс в триадах. Успехи современ естествознания. 9(1): 43–46. 2014. [*Ivanov D.G., Semenov N.A., Zaitseva M.S.* Methods for determining the social status of male rats in triads. Suc. Mod. Sci. 9(1): 43–46. 2014.(In Russ)].
11. *Шабанов П.Д., Лебедев А.А.* Зоосоциальное поведение крыс. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 5: 31. 2007. [*Shabanov P.D., Lebedev A.A.* Zoosocial behavior of rats. Rev. Clin. Pharmacol. Drug. Therapy. 5: 31. 2007. (In Russ)].
12. *Altmann J.* Observational study of behavior: sampling methods. Behaviour. 49(3): 227–267. 1974.
13. *Norscia I., Palagi E.* The socio-matrix reloaded: from hierarchy to dominance profile in wild lemurs. Peer. J. 3: e729. 2015.
14. *Landau H. G.* On dominance relations and the structure of animal societies: I. Effect of inherent characteristics. Bull. Math. Biophys. 13(1): 1–19. 1951.

15. *Bayly K.L., Evans C.S., Taylor A.* Measuring social structure: A comparison of eight dominance indices. Behav. Processes. 73(1): 1–12. 2006.
16. *Clutton-Brock T.H., Albon S.D.* The roaring of red deer and the evolution of honest advertisement. Behaviour. 69(3–4): 145–170. 1979.
17. *Bang A., Deshpande S., Sumana A., Gadagkar R.* Choosing an appropriate index to construct dominance hierarchies in animal societies: a comparison of three indices. Anim. Behav. 79(3): 631–636. 2010.
18. *David H.A.* Ranking from Unbalanced Paired-Comparison Data. Biometrika. 74(2): 432–6. 1987.
19. *David H.A.* The method of paired comparisons. New York, Hafner Pub. Co. 1963.
20. *Wang F., Kessels H.W., Hu H.* The mouse that roared: neural mechanisms of social hierarchy. Trends Neurosci. 37(11):674–682. 2014.
21. *Hillman K.L., Bilkey D.K.* Neural encoding of competitive effort in the anterior cingulate cortex. Nat. Neurosci. 15(9): 1290–1297. 2012.
22. *Rudebeck P.H., Walton M.E., Millette B.H.P., Shirley E., Rushworth M.F.S., Bannerman D.M.* Distinct contributions of frontal areas to emotion and social behaviour in the rat. Eur. J. Neurosci. 26(8): 2315–2326. 2007.
23. *Wang F., Zhu J., Zhu H., Zhang Q., Lin Z., Hu H.* Bidirectional control of social hierarchy by synaptic efficacy in medial prefrontal cortex. Science. 334(6056): 693–697. 2011.
24. *Yamaguchi Y., Lee Y-A., Kato A., Jas E., Goto Y.* The Roles of Dopamine D2 Receptor in the Social Hierarchy of Rodents and Primates. Sci. Rep. 7: 43348. 2017.

The Technique for Determination of Social Rank in Laboratory Animals in Small Groups

I. S. Matiulko[a, b, *], E. P. Murtazina[a], and B. V. Zhuravlev[a]

[a] *Anokhin Institute on Normal Physiology, Moscow, Russia*
[b] *Higher School of Economics, Moscow, Russia*
**e-mail: irinamatulko@gmail.com*

Here, we present the technique to determine the social rank in rats based on the quantitative analysis of sociometric matrices built using the data on the antagonistic relationships between the animals during competition for reward. We compare and evaluate the existing techniques and propose a new experimental model of the dominant behavior assessment in small groups of rats in laboratory conditions that considers the individual drinking activity of each rat, as well as the dyadic competitive relationships. The data analysis is based on the histograms of the drinking duration for rats, the ratio of the victories and losses in dyads during the competition for access to drinking bowl, and the evaluation of the motivation to satisfy the thirst during the periods of experimental sessions. The approbation of the developed technique has demonstrated that the implementation of these approaches allows for accurate determination of the social rank of each rat, as well as for monitoring of the dynamics of the formation, stability, and plasticity of social organization in the groups throughout the whole period of their existence. Therefore, this complex technique may help to determine the relationships between the hierarchical structure of the groups of social animals, their individual social rank, and various physiological, pharmacological, environmental, and other factors.

Keywords: social rank, hierarchical organization of group, dominance, sociometric matrix, competition, drinking motivation

ЦИТИРОВАТЬ:

Матюлько И.С., Муртазина Е.П., Журавлев Б.В. Методы определения социальных рангов животных в малых группах. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(1): 121–132.
DOI: 10.31857/S0869813920010082

TO CITE THIS ARTICLE:

Matiulko I.S., Murtazina E.P., Zhuravlev B.V. The Methods of the Determination of Social Rank in Laboratory Animals in Small Groups. Russian Journal of Physiology. 106(1): 121–132.
DOI: 10.31857/S0869813920010082