СОДЕРЖАНИЕ

Обзорные и проблемные статьи

Ангиотензин-превращающий фермент 2-го типа, как молекулярный посредник для инфицирования клетки вирусами SARS-CoV и SARS-CoV-2
А. О. Шпаков 795

Молекулярные основы влияния метформина на репродуктивную систему
А. О. Шпаков 811

Экспериментальные статьи

Влияние раннего провоспалительного стресса на тревожное и депрессивно-подобное поведение крыс разного возраста
Н. Д. Брошевицкая, И. В. Павлова, М. И. Зайченко, В. А. Груздева, Г. А. Григорьян 823

Влияние гравитационной разгрузки и пищевой белковой недостаточности на накопление коллагена и минералов в костном матриксе после перелома голени
М. В. Стогов, Е. А. Киреева 843

Исследование иннервации двенадцатиперстной кишки крысы с использованием нейральных иммуногистохимических маркеров
Е. И. Чумасов, Е. С. Петрова, Д. Э. Коржевский 853

Влияние мозжечковой дисфункции, приобретенной в результате лечения опухоли, на функционирование саккадической системы у детей
М. А. Шурупова, В. Н. Касаткин, В. Н. Анисимов, А. В. Латанов 866

Event-Related Changes in EEG Spectral Power Corresponding to Creative and Trivial Decisions
N. V. Shemyakina and Zh. V. Nagornova 880

Биоэлектрическая активность головного мозга у детей с острым вирусным энцефалитом
В. Б. Войтенков, М. В. Синкин, Н. В. Скрипченко, Е. В. Екушева, Е. Ю. Горелик, Н. В. Марченко, А. В. Штеклейн, М. А. Бедова 890

Изучение состава полиненасыщенных жирных кислот и их индивидуальных соотношений у лиц зрелого возраста климатогеографически разных районов севера
Ф. А. Бичкаева, Н. И. Волкова, Д. С. Галстян, А. А. Бичкаев, А. А. Лобанов 898

Анализ показателей микроциркуляции симметричных органов человека в условиях изменения артериального давления
Л. В. Мезенцева 916

CONTENTS

Reviews and Topical Articles

Angiotensin-Converting Enzyme of the Type 2 as a Molecular Mediator for the Entry of SARS-Cov and SARS-Cov-2 Viruses into the Cell
A. O. Shpakov 795

The Molecular Basis of Metformin Effect on the Reproductive System
A. O. Shpakov 811

Experimental Articles

The Influence of Early Proinflammatory Stress on Anxious and Depressive-Like Behavior in Rats of Different Age
N. D. Broshevitskaya, I. V. Pavlova, M. I. Zaichenko, V. A. Gruzdeva, and G. A. Grigoryan 823

Effect of Gravitational Unloading and Food Protein Deficiency on the Accumulation of Collagen and Minerals in the Bone Matrix after a Fracture of Tibia
M. V. Stogov and E. A. Kireeva 843

Study of the Rat Duodenal Innervation Using Neural Immunohistochemical Markers
E. I. Chumasov, E. S. Petrova, and D. E. Korzhevskii 853

Influence of Surgery-Related Cerebellar Dysfunction on the Saccadic System Performance in Children
M. A. Shurupova, V. N. Kasatkin, V. N. Anisimov, and A. V. Latanov 866

Event-Related Changes in EEG Spectral Power Corresponding to Creative and Trivial Decisions
N. V. Shemyakina and Zh. V. Nagornova 880

Bioelectrical Activity of the Brain in Children with Acute Viral Encephalitis
V. B. Voitenkov, M. V. Sinkin, N. V. Skripchenko, E. V. Ekusheva, E. Yu. Gorelick, N. V. Marchenko, A. B. Shtekleyn, and M. A. Bedova 890

Study of the Composition of Polyunsaturated Fatty Acids and Their Individual Ratios in Persons of Mature Ageo Different Regions of the North
F. A. Bichkayeva, N. I. Volkova, D. S. Galstyan, A. A. Bichkayev, and A. A. Lobanov 898

Analysis of Characteristics of Microcirculation of Symmetrical Organs under Changes in Blood Pressure
L. V. Mezentseva 916

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 7, с. 795–810

ОБЗОРНЫЕ И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩИЙ ФЕРМЕНТ 2-ГО ТИПА, КАК МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ПОСРЕДНИК ДЛЯ ИНФИЦИРОВАНИЯ КЛЕТКИ ВИРУСАМИ SARS-CoV И SARS-CoV-2

© 2020 г. А. О. Шпаков*

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

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

Поступила в редакцию 10.04.2020 г.
После доработки 21.04.2020 г.
Принята к публикации 21.04.2020 г.

Для проникновения коронавируса SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome-CoronaVirus-2), возбудителя пандемии COVID-19, в клетку необходимо взаимодействие поверхностного шиповидного S-белка этого вируса с внеклеточным доменом мембранно-связанной формы ангиотензин-превращающего фермента 2-го типа (ACE2). Этот фермент, ключевое звено ренин-ангиотензиновой системы, отвечает за синтез ангиотензина-(1–7), наделенного вазодилаторными и противовоспалительными свойствами, из ангиотензина-II, мощного вазоконстриктора, синтез которого катализируется ангиотензин-превращающим ферментом (ACE), функциональным антагонистом ACE2. После сайт-специфичного гидролиза, осуществляемого локализованной в инфицируемой клетке трансмембранной сериновой протеазой TMPRSS2, вирусный S-белок специфично связывается с ACE2, что является триггером интернализации вируса в клетку путем эндоцитоза. Подавление этого процесса с помощью препаратов, ингибирующих протеазу TMPRSS2 и нарушающих взаимодействие S-белка с ACE2, позволяет предотвратить инфицирование и, тем самым, является перспективным подходом для лечения и профилактики COVID-19. Сходный механизм проникновения в клетку использует и вирус SARS-CoV, возбудитель атипичной пневмонии, родственный SARS-CoV-2. При лечении пациентов с артериальной гипертензией и сахарным диабетом с помощью ACE-ингибиторов, блокаторов ангиотензиновых рецепторов, статинов и некоторых антидиабетических препаратов экспрессия и активность ACE2, как правило, повышаются, что увеличивает риск заражения SARS-CoV-2 и ухудшает исход заболевания. В процессе инфицирования вирус, образуя комплекс с ACE2, снижает количество ACE2 на поверхности клеток, нарушает зависимые от ACE2 физиологические процессы, и это является одной из причин острого респираторного дистресс-синдрома и сердечной недостаточности у больных COVID-19. В настоящем обзоре анализируется функциональная роль ACE2 в инфицировании клеток вирусами SARS-CoV-2 и SARS-CoV, а также обсуждаются молекулярные механизмы этого процесса и его патофизиологические последствия.

Ключевые слова: ангиотензин-превращающий фермент 2-го типа, ренин-ангиотензиновая система, протеаза TMPRSS2, SARS-CoV-2, SARS-CoV, протеаза ADAM17, ингибитор ангиотензин-превращающего фермента, блокатор ангиотензинового рецептора 1-го типа

DOI: 10.31857/S0869813920060138

ВВЕДЕНИЕ

В декабре 2019 года в городе Ухань (КНР) была зарегистрирована новая коронавирусная инфекция, которая в дальнейшем стала стремительно распространяться по миру. 11 февраля 2020 года возбудитель этой инфекции был классифицирован Всемирной Организацией Здравоохранения как SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome-CoronaVirus-2), а само заболевание как COVID-19 [1]. Коронавирус SARS-CoV-2 размером 30 kb, представляет собой одноцепочечный РНК-содержащий вирус, который относится к семейству Coronaviridae. В его геноме закодированы четыре структурных белка – мембранный белок M, белок оболочки E, нуклеокапсидный белок N, а также относящийся к гликопротеинам шиповидный белок S (spike), который выступает над поверхностью вирусного капсида, образуя структуры наподобие “шипиков”, предназначенные для контакта с поверхностью клетки-хозяина [2]. Острая респираторная инфекция, вызываемая вирусом SARS-CoV-2, характеризуется сравнительно высокой смертностью среди пожилого населения (старше 60 лет), а также среди пациентов, страдающих заболеваниями сердечно-сосудистой системы, болезнями почек, сахарным диабетом, онкологическими и аутоиммунными заболеваниями [3–6]. Основываясь на имеющихся в настоящее время эпидемиологических данных, имеются основания считать, что по тяжести симптомов и уровню смертности инфекция, вызываемая SARS-CoV-2, по краней мере, не превосходит таковые, вызываемые родственным вирусом SARS-CoV, который стал причиной эпидемии в 2003 году. Однако широкое распространение вируса SARS-CoV-2, которое в настоящее время приобрело характер пандемии, и более быстрая, в сравнении с SARS-CoV, передача возбудителя от человека к человеку со сравнительно высоким репродуктивным числом создают высокие риски для здоровья людей во всех странах мира. Это ставит перед специалистами в области медицины, биологии и смежных наук задачу в самые сжатые сроки расшифровать молекулярные механизмы инфицирования клеток вирусом SARS-CoV-2, а также разработать эффективные подходы для лечения COVID-19.

Наибольший интерес представляют данные о том, что для эффективного проникновения в инфицированную клетку вирусу SARS-CoV-2 необходимо “содействие” одного из ключевых ферментов ренин-ангиотензиновой системы – ангиотензин-превращающего фермента 2-го типа (ACE2). Это хорошо согласуется с тем, что в наибольшей степени от COVID-19 страдают пожилые люди и пациенты с хроническими заболеваниями сердца и почек и сахарным диабетом, которые длительное время получают лечение антигипертензивными и антидиабетическими препаратами. У этих пациентов отмечаются наиболее выраженные изменения экспрессии и активности ACE2, которые, как правило, повышаются в результате проводимой фармакотерапии [7, 8]. В связи с этим развернута широкая дискуссия о том, как учесть фактор изменчивости экспрессии ACE2 у пациентов с диабетом и сердечно-сосудистой патологией при оценке рисков их заражения вирусом SARS-CoV-2 и при прогнозировании течения и исхода COVID-19, а также о том, как терапия этих пациентов с помощью ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента (ACE), блокаторов рецептора 1-го типа ангиотензина-II (AT1R), статинов, антидиабетических препаратов может повлиять на ACE2-опосредуемое их инфицирование вирусом SARS-CoV-2. Необходимо отметить, что вирус SARS-CoV, имеющий черты сходства с SARS-CoV-2, для проникновения в клетку хозяина также использует ACE2 [9–11]. Это указывает на то, что наработки по взаимодействию вируса SARS-CoV с ферментом ACE2, которые были сделаны ранее, еще задолго до пандемии COVID-19, могут быть успешно использованы для расшифровки молекулярных механизмов проникновения в клетку нового коронавируса SARS-CoV-2, что собственно уже взято на вооружение вирусологами и молекулярными биолога-

ми, пытающимися сдержать пандемию COVID-19 [12, 13]. Обсуждению этих вопросов и посвящен настоящий обзор. Однако сначала кратко остановимся на структурно-функциональной организации ренин-ангиотензиновой системы, а также на структуре и регуляторных свойствах ангиотензиновых рецепторов и нижележащих сигнальных каскадах и мишенях.

РЕНИН-АНГИОТЕНЗИНОВАЯ СИСТЕМА И АНГИОТЕНЗИНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ

Ренин-ангиотензиновая система включает ферменты с протеолитической активностью, вовлеченные во взаимопревращения пептидов ангиотензинового семейства, сами ангиотензиновые пептиды, их рецепторы и сопряженные с ними внутриклеточные сигнальные каскады и эффекторы (рис. 1).

Первую стадию превращений пептидов ангиотензинового семейства осуществляет ренин, фермент с протеолитической активностью, который отщепляет от молекулы ангиотензиногена (AGT), имеющего длину 153 аминокислотных остатка, *N*-концевой декапептид, соответствующий ангиотензину-I (ANG-I) [14]. AGT относят к семейству ингибиторов сериновых протеаз (серпинов), причем активность AGT во многом зависит от степени его гликозилирования [15]. Превращение ANG-I в ANG-II осуществляет фермент ACE, представляющий собой связанную с мембраной цинк- и хлорид-зависимую дипептидилкарбоксипептидазу (EC.3.4.15.1), каталитический сайт которой расположен во внеклеточном пространстве. Этот фермент является мишенью для большого числа ACE-ингибиторов, фармакологические эффекты которых направлены на ослабление артериальной гипертензии [16].

Экзопептидаза ACE2 (EC.3.4.17.23), осуществляющая превращение ANG-II до ANG-(1–7) и ANG-I до ANG-(1–9), несмотря на заметный уровень гомологии с ферментом ACE (около 40% идентичных и 60% сходных по физико-химическим характеристикам аминокислотных остатков), имеет противоположную по отношению к нему функциональную активность, поскольку предотвращает вазоконстрикторные эффекты ANG-II и, напротив, усиливает противодействующие им вазодилаторные эффекты пептидов ANG-(1–7) и ANG-(1–9) [17–20]. В отличие от ACE, фермент ACE2 является монокарбоксипептидазой и характеризуется сравнительно низкой специфичностью, гидролизуя не только ангиотензиновые пептиды, но также апелин, опиоидные пептиды и кинины. Ингибиторы ACE не влияют на каталитическую активность ACE2, поскольку в области каталитических и аллостерических сайтов, мишеней этих ингибиторов, молекулы ACE и ACE2 существенно различаются. Имеются две формы ACE2 – функционально активная мембранно-связанная форма, которая, наряду с *N*-концевым каталитическим эктодоменом, включает трансмембранный домен и небольшой по размеру цитоплазматический домен, и растворимая форма, соответствующая *N*-концевому эктодомену, которая генерируется путем отщепления внеклеточной части молекулы ACE2 от ее трансмембранного домена [17]. Этот процесс осуществляется значительной по размеру мембранно-связанной протеазой ADAM17 [21–23]. Протеаза ADAM17 представляет собой трансмембранный белок I-го типа и содержит несколько функциональных доменов – (1) *N*-концевой домен, который выполняет функцию “внутреннего” блокатора протеазной активности, (2) металлопротеазный (каталитический) домен, (3) дезинтегриновый домен, (4) обогащенный остатками цистеина проксимальный к мембране домен, (5) трансмембранный домен и (6) небольшой цитоплазматический участок [24]. По топологии в плазматической мембране оба фермента, ACE2 и ADAM17, сходны между собой. Сравнительно высокий уровень экспрессии ACE2 и ADAM17 обнаружен в сердце, легких, почках, мозге и семенниках, в то время как в других тканях он ниже или незначителен. Эти данные указывают на не-

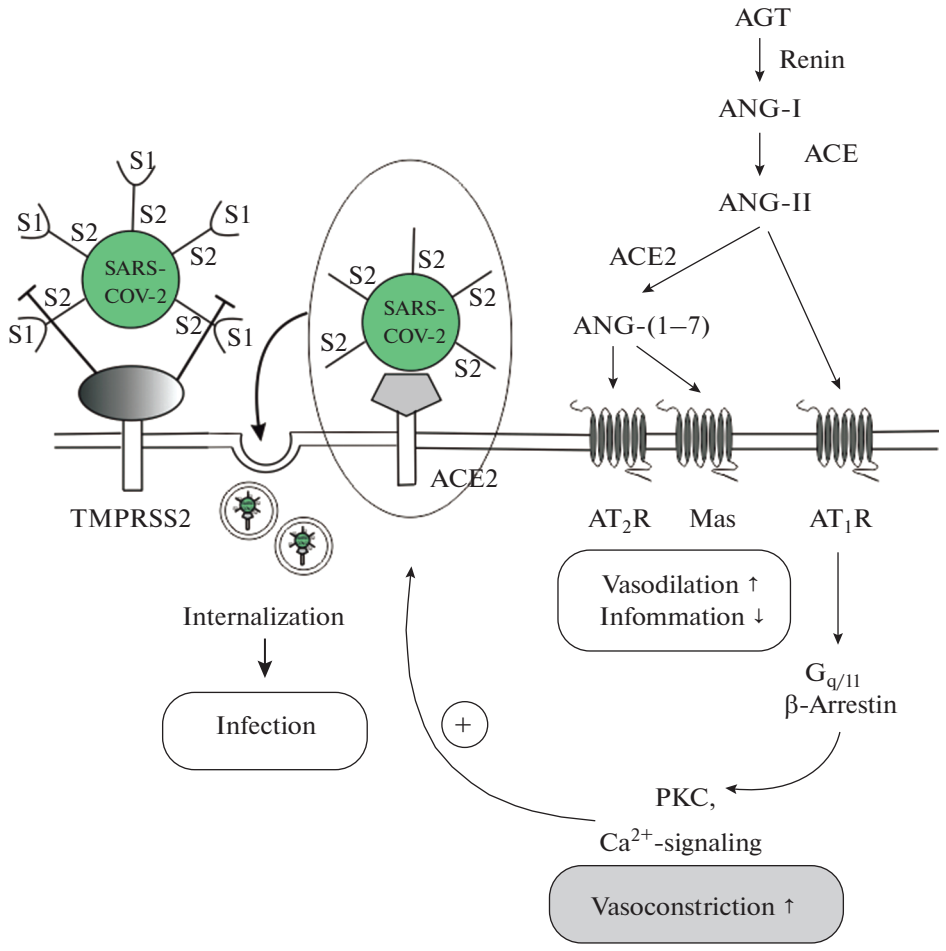


Рис. 1. Роль протеазы TMPRSS2, ACE2 и компонентов ангиотензинового пути в проникновении вируса SARS-CoV-2 в клетку.

Условные обозначения: TMPRSS2 – трансмембранная сериновая протеаза (transmembrane protease, serine 2); ACE – ангиотензин-превращающий фермент; ACE2 – ангиотензин-превращающий фермент 2-го типа; AT1R – рецептор 1-го типа ангиотензина-II; AGT – ангиотензиноген; ANG-I – ангиотензин-I; ANG-II – ангиотензин-II; ANG-(1–7) – ангиотензин-(1–7); $G_{q/11}$ – гетеротримерный $G_{q/11}$-белок; PKC – протеинкиназа C; S1, S2 – субдомены S1 и S2 в поверхностном шиповидном вирусном S-белке.

Fig. 1. The role of the protease TMPRSS2, ACE2 and angiotensin pathway components in the penetration of the SARS-CoV-2 virus into the cell.

Abbreviations: TMPRSS2 – transmembrane serine protease (transmembrane protease, serine 2); ACE – angiotensin-converting enzyme; ACE2 – type 2 angiotensin-converting enzyme; AT1R – angiotensin-II receptor of the type 1; AGT – angiotensinogen; ANG-I – angiotensin-I; ANG-II - angiotensin-II; ANG-(1–7) – angiotensin-(1–7); $G_{q/11}$ – heterotrimeric $G_{q/11}$ protein; PKC – protein kinase C; S1, S2 – the subdomains S1 and S2 in the surface spike viral protein S.

равномерное распределение экспрессии и активности этих ферментов в различных органах и тканях и на тесную взаимосвязь между ними [17, 24]. Следует, однако, отметить, что протеаза ADAM17, помимо ACE2, контролирует активность еще множества других белков, компонентов сигнальных и эффекторных систем [24].

Основными мишенями ANG-II являются два подтипа G-белок-сопряженных рецепторов – AT1R и AT2R, которые сильно различаются как по спектру регулируемых через них сигнальных каскадов, так и по физиологическим ответам [25–27]. При этом AT2R может модулировать функциональную активность AT1R, образуя с ним гетеродимерный рецепторный комплекс [28, 29], а также подавлять активность пострецепторных звеньев AT1R-активируемых сигнальных каскадов [30].

Связывание рецептора AT1R с агонистами приводит к стимуляции гетеротримерного $G_{q/11}$-белка, который активирует фосфоинозитид-специфичную фосфолипазу Cβ. Результатом этого является образование инозитол-1, 4, 5-трифосфата, который, активируя специфичные к нему внутриклеточные рецепторы, стимулирует высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо, а также синтез диацилглицерола, который активирует форбол-чувствительные изоформы протеинкиназы C (PKC) [26, 31]. Наряду с этим, AT1R-агонисты активируют регуляторные белки β-аррестины, стимулируя каскад митогенактивируемых протеинкиназ (MAPK) и ряд других β-аррестин-зависимых путей [26, 32]. Важно отметить, что ANG-II-индуцированная активация ERK1/2, ключевых компонентов каскада MAPK, может осуществляться как с участием $G_{q/11}$-белков [33], так и независимо от G-белков, путем активации β-аррестинов [32, 34]. В отличие от AT1R, рецептор AT2R реализует свои эффекты по путям, независимым от G-белков и β-аррестинов, что не типично для “классических” G-белок-сопряженных рецепторов. Его эффекты, как отмечалось выше, могут реализовываться путем образования гетеродимерных комплексов с AT1R, Mas-рецептором и другими G-белок-сопряженными рецепторами. Наряду с этим, будучи активирован ANG-II, рецептор AT2R через неканонические каскады способен повышать активность различных изоформ NO-синтаз и активировать, тем самым, NO-зависимые пути, а также стимулировать MAPK- и 3-фосфоинозитидный пути [27, 29, 35, 36].

Ангиотензиновые пептиды ANG-(1–7) и его укороченный аналог ANG-(1–5) специфично взаимодействуют с G-белок-сопряженным Mas-рецептором, продуктом протоонкогена MAS1, через посредство которого они оказывают противовоспалительный, вазодилаторный и антифибротический эффекты на клетки-мишени [29, 37]. Если Mas-рецептор является функциональным антагонистом AT1R, то его основной лиганд пептид ANG-(1–7) – функциональным антагонистом ANG-II. Пептид ANG-(1–7) может быть получен гидролитическим расщеплением ANG-I или ANG-(1–9) с помощью неприлизина, но основной его пул получается в ходе катализируемого ACE2 гидролиза ANG-II [16].

ACE2-ОПОСРЕДУЕМЫЙ МЕХАНИЗМ ПРОНИКНОВЕНИЯ ВИРУСА SARS-COV В КЛЕТКУ

Как уже отмечалось, еще до появления SARS-CoV-2, при изучении родственного ему вируса SARS-CoV, возбудителя острого респираторного синдрома, была показана способность последнего использовать мембранно-связанную форму ACE2 для проникновения в клетку хозяина [9–11]. После установления взаимосвязи между проникновением SARS-CoV в клетки легких человека и присутствием в них ACE2 был выявлен протеолитический фермент, который необходим для такого проникновения. Им оказалась трансмембранная сериновая протеаза TMPRSS2 (transmembrane protease, serine 2), которая с высокой интенсивностью экспрессируется в эпителиальных клетках легких человека и способствует их инфицированию вирусом гриппа A и метапневмовирусом [38–41]. При изучении вируса гриппа A было показано, что протеаза TMPRSS2 расщепляет гликопротеид гемагглютенин его оболочки, в результате чего вирус гриппа A приобретает способность сливаться с мембраной клетки-хозяина и в дальнейшем путем эндоцитоза проникать внутрь

клетки [38, 40]. В случае SARS-CoV, протеаза TMPRSS2 осуществляет частичный гидролиз поверхностного вирусного шиповидного белка S, тем самым, вызывая его праймирование, что индуцирует эффективное слияние вируса с плазматической мембраной и его интернализацию внутрь клетки хозяина [10]. Следует отметить, что репликация вирусов в клетках с повышенной экспрессией протеазы TMPRSS2 не сопровождается увеличением способности вируса к инфицированию и изменениями структуры вирусного белка S, что указывает на участие протеазы TMPRSS2 именно в процессе проникновения вируса через клеточную мембрану, а не в контроле его дальнейшей репликации [10].

В дальнейшем было показано, что протеаза TMPRSS2 способна не только расщеплять и активировать вирусный белок S, но и расщеплять мембранную форму ACE2, что также вносит определенный вклад в проникновение вируса SARS-CoV в клетку. Расщепление осуществляется по остаткам лизина и аргинина, расположенным в сегменте 697–716 ACE2. Сайты, мишени протеазы TMPRSS2, отличаются от таковых, по которым фермент расщепляется трансмембранной эктопротеазой ADAM17, вследствие чего и последствия такого расщепления различны. Так TMPRSS2-индуцированное расщепление ACE2 способствует инфицированию клетки вирусом, в то время как расщепление фермента с помощью ADAM17, напротив, этот процесс угнетает [11].

В 2005 году английскими учеными было установлено, что расщепление ACE2 с помощью протеазы ADAM17 приводит к появлению растворимой формы ACE2, которая специфически связывается с поверхностным белком S вируса SARS-CoV и, тем самым, препятствует его взаимодействию с мембранной формой ACE2, вовлеченной в инфицирование клетки-мишени [21]. Малые интерферирующие РНК, ингибирующие синтез ADAM17, подавляют процесс расщепления ACE2, в то время как повышенная экспрессия ADAM17, напротив, стимулирует его. Показано, что форболовый эфир – форбол-12-миристат-13-ацетат в клетках HEK-293 и Huh-7 с экспрессированной в них мембранно-связанной ACE2 стимулирует процесс ADAM17-индуцированного расщепления молекулы ACE2, причем селективные ингибиторы металлопротеиназы TAPI-1 и GM6001 предотвращают этот процесс. Эти данные свидетельствуют о том, что в процесс активации ADAM17 вовлечены сигнальные пути, реализуемые через форбол-чувствительные изоформы ПКС [21]. В дальнейшем было показано, что в нейронах и глиальных клетках мозга пациентов с гипертензией, у которых была повышена экспрессия и активность ACE2, повышалась и активность протеазы ADAM17. При этом активность ADAM17, а, следовательно, и накопление растворимых форм ACE2 повышались при ANG-II-индуцированной стимуляции рецептора AT1R [22]. Все это указывает на то, что ANG-II и другие AT1R-агонисты стимулирует сигнальный каскад, включающий AT1R, $G_{q/11}$-белок и фосфолипазу Cβ, результатом чего является повышение продукции диацилглицерола, активация форбол-чувствительных изоформ PKC и интенсификация ADAM17-индуцированного расщепления ACE2 [23]. Имеются основания считать, что и другие активаторы этих изоформ PKC способны стимулировать ADAM17 и индуцировать гидролиз мембранно-связанной ACE2.

С целью расшифровки механизмов взаимодействия белка S вируса SARS-CoV с мембранно-связанной формой ACE2 были идентифицированы ключевые аминокислотные остатки, вовлеченные в этот процесс. В результате было установлено, что для взаимодействия с ACE2 человека наиболее важны остатки Tyr^{442}, Leu^{472}, Asn^{479}, Asp^{480}, Thr^{487} и Tyr^{491} вирусного белка S SARS-CoV (NP_828851.1). Эти аминокислотные остатки входят в состав так называемого “рецептор”-связывающего домена, соответствующего последовательности 424–494 белка S [42, 43]. В свою очередь, в структуре ACE2 выявлены высококонсервативные аминокислотные

остатки Lys^{31}, Glu^{35}, Asp^{38}, Met^{82} и Lys^{353}, четыре из которых расположены в *N*-концевой части эктодомена фермента, ответственные за взаимодействие с вирусным белком [43].

Комплекс проведенных исследований позволил высказать вполне обоснованное предположение о том, что подавление TMPRSS2/ACE2-опосредованного проникновения вируса SARS-CoV в клетку может быть одним из эффективных путей предотвращения острой респираторной инфекции, вызываемой этим коронавирусом [10, 11]. Определенные надежды связывали и с регуляцией функциональной активности трансмембранной протеазы ADAM17, которая, в отличие от протеазы TMPRSS2, предотвращает инфицирование клеток вирусом SARS-CoV. Однако прекращение эпидемии и переоценка перспектив разработки вакцин против SARS-CoV не позволили этим работам получить достойное продолжение. В то же время, имеющиеся наработки стали практическим и теоретическим заделом для изучения ACE2-опосредуемых механизмов инфицирования клеток новым вирусом SARS-CoV-2.

ACE2-ОПОСРЕДУЕМЫЙ МЕХАНИЗМ ПРОНИКНОВЕНИЯ ВИРУСА SARS-COV В КЛЕТКУ

С учетом структурного и функционального сходства вирусов SARS-CoV и SARS-CoV-2 уже в самом начале исследований, стартовавших в начале 2020 года, основное внимание было сконцентрировано на роли ACE2 и протеаз TMPRSS2 и ADAM17 в молекулярных механизмах проникновения вируса SARS-CoV-2 в клетку. Изучали молекулярные основы взаимодействия ACE2 с поверхностным белком S вируса SARS-CoV-2 и роль в этом трансмембранных протеаз TMPRSS2 и ADAM17, способных изменять структуру белка S (TMPRSS2) и вызывать гидролитическое расщепление мембранно-связанной формы ACE2 (ADAM17, TMPRSS2) [7, 12, 13, 44–49].

Поверхностные белки S вирусов SARS-CoV и SARS-CoV-2 имеют значительное сходство первичной структуры (76% идентичных аминокислотных остатков), в том числе в области “рецептор”-связывающего домена этих белков. При этом пять из шести аминокислотных остатков, играющих ключевую роль во взаимодействии белка S SARS-CoV с мембранно-связанной формой ACE2, в структуре белка S SARS-CoV-2 (YP_009724390.1) были изменены (Leu^{455}, Phe^{486}, Gln^{493}, Ser^{494}, Asn^{501}), за исключением остатка Tyr^{505} белка S SARS-CoV-2, соответствующего остатку Tyr^{491} белка S SARS-CoV. Несмотря на этот факт, топология и конформационные характеристики ACE2-связывающего сайта белков S обоих вирусов являются сходными [45]. Согласно данным молекулярного моделирования, наибольшую аффинность к белку S SARS-CoV-2 имеют ACE2 человека, панголина, собаки, кошки, золотистого хомячка, в то время как, например, ACE2 мышей и крыс с этим белком взаимодействует слабо. В сконструированной модели дистанция между остатком Phe^{486} в белке S SARS-CoV-2 и остатком Met^{82} в ACE2 человека в комплексе между этими белками составляет 3.753Å. В модели комплекса белка S SARS-CoV-2 с ACE2 панголина, собаки, кошки и золотистого хомячка, эта дистанция равна 1.621, 2.695, 3.753 и 2.024 Å соответственно, что может указывать на возможность эффективного проникновения вируса в клетки этих животных. Способность ACE2 эффективно взаимодействовать с белком S SARS-CoV-2 во многом обусловлена природой аминокислотного остатка в положении 82. Теоретический анализ показывает, что мутантный ACE2 человека с заменой остатка метионина в этом положении на аспарагин будет еще больше способствовать проникновению вируса SARS-CoV-2 в клетку в сравнении с ACE2 дикого типа [45]. Другие авторы, основываясь на результатах проведенного ими структурного анализа ACE2 и взаимодействия этого фермента с белком S SARS-CoV-2, показали, что, наряду с человеком, такое взаимодей-

ствие возможно у целого ряда млекопитающих (панголин, свинья, овца, кошка, собака и др.), имеются формы ACE2, которые способны с высокой эффективностью взаимодействовать с вирусным белком S SARS-CoV-2. Полученные ими результаты свидетельствуют в пользу высокой вероятности инфицирования этих животных вирусом SARS-CoV-2. Исключение составляют мыши и крысы, что создает ограничения для их использования в экспериментах по изучению SARS-CoV-2 [47].

Показано, что, как и в случае SARS-CoV, протеаза TMPRSS2 играет исключительно важную роль в ACE2-опосредованном проникновении вируса SARS-CoV-2 в клетку-мишень [6, 13, 46]. Мишенью TMPRSS2 также является белок S, который расщепляется протеазой по двум сайтам. Один из них обогащен остатками аргинина и расположен на границе двух субдоменов S1 и S2, вследствие чего его обозначают S1/S2, в то время как другой локализован в *N*-концевой части S2-домена и потому назван S2-сайтом. Следует отметить, что субдомен S1 содержит "рецептор"-связывающий участок и отвечает за прикрепление к мембранносвязанной ACE2, а субдомен S2 отвечает за формирование комплекса с эктодоменом ACE2 и дальнейшее проникновение вирусной частицы в клетку. Протеолиз по S1/S2-сайту осуществляется гораздо интенсивнее, чем по сайту S2, и играет исключительно важную роль в проникновении вируса в клетку. В пользу этого свидетельствуют данные о большом количестве расщепленного по S1/S2-сайту вирусного S-белка внутри клетки, инфицированной SARS-CoV-2. Расщепление вирусного белка S позволяет S2-субдомену высвободиться из комплекса с S1-субдоменом, после чего он приобретает способность эффективно взаимодействовать с эктодоменом ACE2 и образовывать комплекс ACE2–S2(SARS-CoV-2), обеспечивающий интернализацию вируса в клетку путем эндоцитоза [13, 50]. Важно отметить, что сайт для расщепления S1/S2 отсутствует в S-белках других вирусов, в том числе в S-белке вируса RaTG13, филогенетически наиболее близкого SARS-CoV-2. Это указывает на то, что TMPRSS2 способен опосредовать проникновение SARS-CoV-2 в клетку хозяина, но, как полагают, может оказаться неэффективным в отношении вируса атипичной аневмонии SARS-CoV и некоторых других родственных SARS-CoV-2 коронавирусов [13]. Клеточная культура VeroE6, в которой был экспрессирован TMPRSS2, обладала высокой способностью инфицироваться SARS-CoV-2, в то время как в отсутствие протеазы вирус в клетки не проникал и заражения не происходило [46].

Наряду с TMPRSS2, катепсины B и L, эндосомные цистеиновые протеазы, также способны расщеплять вирусные S-белки коронавирусов [51]. Однако в случае SARS-CoV и ряда других родственных ему вирусов это не приводит к "правильному" праймированию S-белка и проникновению вирусной частицы в клетку [50, 52, 53], а в случае SARS-CoV-2, как предполагают, может вносить лишь незначительный вклад в этот процесс [13]. На это указывают данные о том, что инфицирование вирусом SARS-CoV-2 клеток Calu-3, обработанных мезилатом камостата, селективным ингибитором TMPRSS2, было ослаблено, но не блокировано полностью. Это может быть обусловлено праймированием S-белка катепсинами B и L, хотя нельзя исключать и неполного ингибирования TMPRSS2 [13]. В этой связи необходимо отметить, что определенный вклад в проникновение в клетку вируса ближневосточного респираторного синдрома (Middle East respiratory syndrome-CoV, MERS-CoV), вносит сериновая протеаза фурин, но при этом для эффективного инфицирования необходима и протеаза TMPRSS2 [54, 55]. Все вышесказанное свидетельствует о том, что мезилат камостата и другие ингибиторы протеазы TMPRSS2 представляют значительный интерес для разработки препаратов, предназначенных для предотвращения и лечения коронавирусной инфекции, тем более что сам мезилат камостата уже прошел клинические испытания и одобрен для применения, как фармакологический препарат [52, 53].

В отношении роли протеазы ADAM17 в инфицировании вирусом SARS-CoV-2 прямых данных пока не получено, хотя и предполагается, что активация ANG-II сигнального пути, включающего AT1R и форбол-чувствительные формы PKC, должна усиливать протеолиз мембранно-связанной формы ACE2 и, тем самым, влиять на ее участие в проникновении вируса в клетку. Однако однозначные выводы о взаимосвязи между активностью ADAM17 и ACE2-опосредованным эндоцитозом вируса SARS-CoV-2 внутрь клетки могут быть сделаны только после проведения соответствующих экспериментов [7].

КЛИНИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ УЧАСТИЯ ACE2 В ИНФИЦИРОВАНИИ КЛЕТОК-МИШЕНЕЙ ВИРУСОМ SARS-COV-2

Основной контингент пациентов, которые наиболее тяжело переносят инфекцию, вызываемую SARS-CoV-2, составляют пожилые люди, страдающие атеросклерозом, гипертонической болезнью, ишемической болезнью сердца, сахарным диабетом, заболеваниями почек и легких. Многие из этих заболеваний обусловлены нарушением функционирования ренин-ангиотензиновой системы и сопровождаются компенсаторными или вызванными фармакологическими препаратами изменениями экспрессии ACE2 [3–6, 56, 57]. Поскольку мембранносвязанная форма ACE2 усиливает проникновение SARS-CoV-2 в клетку-мишень, то повышение экспрессии и количества этой формы фермента в мембране должно способствовать заражению вирусом SARS-CoV-2 и утяжелять течение COVID-19. В этой связи необходимо отметить, что ACE2 экспрессируется в основном в тех тканях, которые являются основными мишенями для SARS-CoV-2 и первыми подвергаются инфицированию – это легкие, почки, кишечник, стенки кровеносных сосудов, мозг, семенники [17, 18, 58-62].

Времени с начала пандемии прошло немного, вследствие чего вопрос о том, насколько уровни экспрессии и активности ACE2 у пациентов коррелируют с тяжестью заболевания, и как на это влияет системная терапия пациентов с хроническими заболеваниями сердечно-сосудистой системы и сахарным диабетом еще остается открытым. Но ряд важных соображений по этому поводу уместно высказать именно сейчас.

При сахарном диабете активность ACE2 снижается, что во многом обусловлено избыточным гликированием молекулы фермента в условиях характерной для диабетической патологии длительной гипергликемии, и это снижение является одной из первопричин предрасположенности пациентов с диабетом к тяжелым заболеваниям легких [63]. Снижение при диабете активности ACE2 и уровня ANG-(1–7), для которого характерно выраженное противовоспалительное и антиоксидантное действие, ослабляет защиту ткани легкого от вирусных инфекций, как это показано на примере характеризующегося высокой летальностью птичьего гриппа-A (H5N1) [64]. Имеются веские основания считать, что лечение сахарного диабета с помощью некоторых антидиабетических препаратов, в том числе пиоглитазона и лираглутида, повышает экспрессию ACE2, что было продемонстрировано в экспериментах с животными [3, 65]. Так лираглутид, аналог глюкагоподобного пептида-1, при его введении как здоровым крысам, так и животным с экспериментальным диабетом в значительной степени повышал экспрессию ACE2 в легких и увеличивал уровень циркулирующего в крови ANG-(1–7) [65]. Сахарный диабет обычно сопровождается дисфункциями сердечно-сосудистой системы – атеросклерозом и гипертензией, что требует специфической терапии с помощью ингибиторов ACE, блокаторов AT1R и статинов. Их применение также приводит к значительному повышению экспрессии ACE2, причем этот эффект отмечается у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и без диабетической патологии [3, 8, 57]. Он под-

твержден в экспериментах на животных [8, 66-68]. Показано, что при введении нормотензивным крысам лизиноприла, ингибитора ACE, и лозартана, антагониста AT1R, экспрессия ACE2 в сердце повышалась в 4.7 и 2.8 раза, соответственно [67]. Повышение экспрессии ACE2 в сердечной мышце отмечали и при введении этих препаратов гипертензивным трансгенным крысам линии Ren-2 [68]. При введении как нормотензивным, так и гипертензивным крысам лизиноприла и лозартана также повышалась экспрессия и активность ACE2 в почках, хотя и в меньшей степени, чем в сердце [68, 69]. При изучении влияния различных блокаторов AT1R на мышей было обнаружено повышение примерно в два раза количества белка ACE2 в сердечной мышце [70]].

Таким образом, возникает замкнутый круг. С одной стороны, в отсутствие лечения уровень ACE2, как правило, снижен, что сопровождается опасными для жизни функциональными расстройствами и ослаблением иммунитета, и это критично в условиях COVID-19. С другой стороны, лечение некоторыми антидиабетическими и антигипертензивными препаратами приводит к повышению экспрессии ACE2, что способствует проникновению вируса SARS-CoV-2 в клетку. Важно отметить, что в условиях инфицирования клеток вирусом SARS-CoV-2 в результате вирусопосредуемого эндоцитоза фермента ACE2 и его дальнейшей внутриклеточной деградации количество функционально активного ACE2 на поверхности клетки-мишени резко снижается. Это в еще большей степени усугубляет функциональные нарушения в легких, сердечно-сосудистой системе и почках и способствует развитию острого респираторного дистресс-синдрома и острой сердечной недостаточности при COVID-19 [8, 71]. В этой связи ряд исследователей предлагают на время заболевания COVID-19 пациентам, которые системно принимают ингибиторы ACE, блокаторы AT1R и статины, отказаться от этих препаратов и заменить их, например, блокаторами кальциевых каналов или использовать комбинированную терапию [3, 57]. Несмотря на то, что в доступной литературе данные о влиянии блокаторов кальциевых каналов на экспрессию и активность ACE2 отсутствуют, нельзя исключить, что вызываемое ими снижение концентрации ионов кальция в клетке также способно привести к усилению экспрессии ACE2. Это обусловлено тем, что блокирование кальциевого сигналинга приводит к ингибированию того же AT1R-зависимого сигнального каскада, который подавляется при ингибировании AT1R или снижении продукции ANG-II.

Значительный уровень экспрессии ACE2 показан в некоторых отделах мозга. С одной стороны, это еще один путь распространения инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, и, с другой, причина резкого снижения уровня ACE2 в ЦНС, как результат его совместной интернализации с вирусными частицами в нейроны [3]. Высокое содержание вирусных частиц и ассоциированный с этим перенос деградирующих форм ACE2 были выявлены в стволе мозга и отходящих от него черепных нервах [72, 73]. В результате отмечали активацию апоптотических процессов в этих клетках и их гибель, что приводило к нарушению функционирования центров мозга, ответственных за регуляцию артериального давления и дыхания. Необходимо отметить, что снижение уровня ACE2 в стволе мозга может также вызывать нарушение тонуса симпатической нервной системы и обострять артериальную гипертензию [74–76], что, согласно имеющимся сообщениям, характерно для COVID-19.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установление ключевой роли ренин-ангиотензиновой системы и ACE2 в инфицировании клеток хозяина возбудителем атипичной пневмонии SARS-CoV, а также новым вирусом SARS-CoV-2, возбудителем новой пандемии COVID-19, не только позволяет выделить группы риска, наиболее восприимчивые к этим заболеваниям,

но и разработать новые подходы для создания противовирусных препаратов, предотвращающих коронавирусную инфекцию. Результаты клинических наблюдений пациентов с COVID-19 показывают, что баланс вазоконстрикторных и вазодилаторных влияний, реализуемых пептидами ангиотензинового семейства через различные типы ангиотензиновых рецепторов, соотношение между активностью ACE и его функционального антагониста ACE2, паттерн мембранно-связанных протеаз (TMPRSS2, ADAM17), определяющих судьбу ACE2 и способность вируса интернализоваться в клетку, не только влияют на процессы заражения человека вирусом SARS-CoV-2, но и во многом предопределяют патогенез и исход COVID-19. В настоящее время предложено несколько подходов для создания препаратов, в основе действия которых лежит нарушение способности вируса проникать в клетку – в первую очередь это ингибиторы протеазы TMPRSS2, а также соединения, способные препятствовать эффективному взаимодействию ACE2 с вирусным белком S. Определенные надежды связывают и с генерацией растворимых форм ACE2, которые способны нейтрализовать вирусные частицы. Однако в этом случае возникают риски гиперпродукции ANG-(1–7) с развитием у пациента гипотонии. Не менее эффективными являются меры, направленные на нормализацию ренин-ангиотензиновой системы и на оптимизацию стратегии применения фармакологических препаратов, мишенями которых являются ACE и AT1R, поскольку дисбаланс в системе ACE–ANG-II/ACE2–ANG-(1–7) может иметь самые пагубные последствия для пациента в условиях SARS-CoV-2 инфицирования. Все эти подходы востребованы, и в сочетании с разработкой вакцин против вируса SARS-CoV-2, которые также находятся только в начале пути [77–79], могут остановить пандемию COVID-19, унесшую по данным на апрель 2020 года уже более 180 тысяч человеческих жизней.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана госзаданием ИЭФБ РАН (№ АААА-А18-118012290427-7).

Автор данной статьи сообщает об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. World Health Organization. WHO Director-General's remarks at the media briefing on 2019-nCoV on 11 February 2020. 2020. https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020.
2. *Wu A., Peng Y., Huang B., Ding X., Wang X., Niu P., Meng J., Zhu Z., Zhang Z., Wang J., Sheng J., Quan L., Xia Z., Tan W., Cheng G., Jiang T.* Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. Cell Host Microbe. 27(3): 325e328. 2020. https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.02.001
3. *Fang L., Karakiulakis G., Roth M.* Are patients with hypertension and diabetes mellitus at increased risk for Covid-19 infection? Lancet Respir. Med. 8(4): e21. 2020. https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30116-8
4. *Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., Zhang L., Fan G., Xu J., Gu X., Cheng Z., Yu T., Xia J., Wei Y., Wu W., Xie X., Yin W., Li H., Liu M., Xiao Y., Gao H., Guo L., Xie J., Wang G., Jiang R., Gao Z., Jin Q., Wang J., Cao B.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan. China. Lancet. 395: 497–506. 2020. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5
5. *Zheng Y.Y., Ma Y.T., Zhang J.Y., Xie X.* COVID-19 and the cardiovascular system. Nat. Rev. Cardiol. 2020. https://doi.org/10.1038/s41569-020-0360-5
6. *Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., Si H.R., Zhu Y., Li B., Huang C.L., Chen H.D., Chen J., Luo Y., Guo H., Jiang R.D., Liu M.Q., . Chen Y., Shen X.R., Wang X., Zheng X.S., Zhao K., Chen Q.J., Deng F., Liu L.L., Yan B., Zhan F.X., Wang Y.Y., Xiao G.F.*, Shi Z.L. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature. 579(7798): 270–273. 2020. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7

7. *Danser A.H.J., Epstein M., Batlle D.* Renin-angiotensin system blockers and the COVID-19 Pandemic: At present there is no evidence to abandon renin-angiotensin system blockers. Hypertension. HYPERTENSIONAHA12015082. 2020. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15082
8. *South A.M., Diz D., Chappell M.C.* COVID-19, ACE2 and the Cardiovascular Consequences. Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 2020. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00217.2020
9. *Li W., Moore M.J., Vasilieva N., Sui J., Wong S.K., Berne M.A., Somasundaran M., Sullivan J.L., Luzuriaga K., Greenough T.C., Choe H., Farzan M.* Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. Nature. 426: 450–454. 2003. https://doi.org/10.1038/nature02145
10. *Matsuyama S., Nagata N., Shirato K., Kawase M., Takeda M., Taguchi F.* Efficient activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by the transmembrane protease TMPRSS2. J. Virol. 84: 12658–12664. 2010. https://doi.org/10.1128/JVI.01542-10
11. *Heurich A., Hofmann-Winkler H., Gierer S., Liepold T., Jahn O., Pöhlmann S.* TMPRSS2 and ADAM17 cleave ACE2 differentially and only proteolysis by TMPRSS2 augments entry driven by the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. J. Virol. 88(2): 1293–307. 2014. https://doi.org/10.1128/JVI.02202-13
12. *Batlle D., Wysocki J., Satchell K.* Soluble angiotensin-converting enzyme 2: a potential approach for coronavirus infection therapy? Clin. Sci. (Lond). 134: 543–545. 2020. https://doi.org/10.1042/CS20200163
13. *Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S., Kruger N., Herrler T., Erichsen S., Schiergens T.S., Herrler G., Wu N.H., Nitsche A., Müller M.A., Drosten C., Pöhlmann S.* SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. Cell. pii: S0092-8674(20)30229-4. 2020. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052
14. *Lu H., Cassis L.A., Kooi C.W., Daugherty A.* Structure and functions of angiotensinogen. Hypertens. Res. 39(7): 492–500. 2016. https://doi.org/10.1038/hr.2016.17
15. *Wu C., Lu H., Cassis L.A., Daugherty A.* Molecular and pathophysiological features of angiotensinogen: a mini review. N. Am. J. Med. Sci. (Boston). 4: 183–190. 2011. https://doi.org/10.7156/v4i4p183
16. *Arendse L.B., Danser A.H.J., Poglitsch M., Touyz R.M., Burnett J.C. Jr., Llorens-Cortes C., Ehlers M.R., Sturrock E.D.* Novel Therapeutic approaches targeting the renin-angiotensin system and associated peptides in hypertension and heart failure. Pharmacol. Rev. 71(4): 539–570. 2019. https://doi.org/10.1124/pr.118.017129
17. *Donoghue M., Hsieh F., Baronas E., Godbout K., Gosselin M., Stagliano N., Donovan M., Woolf B., Robison K., Jeyaseelan R., Breitbart R.E., Acton S.* A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1–9. Circ Res. 87: E1–9. 2000. https://doi.org/10.1161/01.res.87.5.e1
18. *Tipnis S.R., Hooper N.M., Hyde R., Karran E., Christie G., Turner A.J.* A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. J. Biol. Chem. 275(43): 33238–33243. 2000. https://doi.org/10.1074/jbc.M002615200
19. *Varagic J., Ahmad S., Nagata S., Ferrario C.M.* ACE2: angiotensin II/angiotensin-(1–7) balance in cardiac and renal injury. Curr. Hypertens. Rep. 16(3): 420. 2014. https://doi.org/10.1007/s11906-014-0420-5
20. *Patel V.B., Zhong J.C., Grant M.B., Oudit G.Y.* Role of the ACE2/Angiotensin 1–7 Axis of the Renin-Angiotensin System in Heart Failure. Circ. Res. 118(8): 1313–1326. 2016. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.307708
21. *Lambert D.W., Yarski M., Warner F.J., Thornhill P., Parkin E.T., Smith A.I., Hooper N.M., Turner A.J.* Tumor necrosis factor-alpha convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain shedding of the severe-acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) receptor, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2). J. Biol. Chem. 280(34): 30113–30119. 2005. https://doi.org/10.1074/jbc.M505111200
22. *Xu J., Sriramula S., Xia H., Moreno-Walton L., Culicchia F., Domenig O., Poglitsch M., Lazartigues E.* Clinical relevance and role of neuronal AT1 receptors in ADAM17-mediated ACE2 shedding in neurogenic hypertension. Circ. Res. 121: 43–55. 2017. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.310509
23. *Mukerjee S., Gao H., Xu J., Sato R., Zsombok A., Lazartigues E.* ACE2 and ADAM17 Interaction Regulates the Activity of Presympathetic Neurons. Hypertension. 74(5): 1181–1191. 2019. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.13133
24. *Zunke F., Rose-John S.* The shedding protease ADAM17: Physiology and pathophysiology. Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res. 1864(11 Pt B): 2059–2070. 2017. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.07.001

25. *Kaschina E., Namsolleck P., Unger T.* AT2 receptors in cardiovascular and renal diseases. Pharmacol. Res. 125(Pt A): 39–47. 2017. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.07.008
26. *Balakumar P., Jagadeesh G.* Structural determinants for binding, activation, and functional selectivity of the angiotensin AT1 receptor. J. Mol. Endocrinol. 53(2): R71–92. 2014. https://doi.org/10.1530/JME-14-0125
27. *Zhang H., Han G.W., Batyuk A., Ishchenko A., White K.L., Patel N., Sadybekov A., Zamlynny B., Rudd M.T., Hollenstein K., Tolstikova A., White T.A., Hunter M.S., Weierstall U., Liu W., Babaoglu K., Moore E.L., Katz R.D., Shipman J.M., Garcia-Calvo M., Sharma S., Sheth P., Soisson S.M., Stevens R.C., Katritch V., Cherezov V.* Structural basis for selectivity and diversity in angiotensin II receptors. Nature. 544(7650): 327–332. 2017. https://doi.org/10.1038/nature22035
28. *AbdAlla S., Lother H., Abdel-tawab A.M., Quitterer U.* The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. J. Biol. Chem. 276(43): 39721–39726. 2001. https://doi.org/10.1074/jbc.M105253200
29. *Patel S., Hussain T.* Dimerization of AT2 and Mas Receptors in Control of Blood Pressure. Curr. Hypertens. Rep. 20(5): 41. 2018. https://doi.org/10.1007/s11906-018-0845-3
30. *Akazawa H., Yano M., Yabumoto C., Kudo-Sakamoto Y., Komuro I.* Angiotensin II type 1 and type 2 receptor-induced cell signaling. Curr. Pharm. Des. 19(17): 2988–2995. 2013. https://doi.org/10.2174/1381612811319170003
31. *Zhang H., Unal H., Desnoyer R., Han G.W., Patel N., Katritch V., Karnik S.S., Cherezov V., Stevens R.C.* Structural Basis for Ligand Recognition and Functional Selectivity at Angiotensin Receptor. J. Biol. Chem. 290(49): 29127–29139. 2015. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.689000
32. *Turu G., Balla A., Hunyady L.* The Role of β-arrestin proteins in organization of signaling and regulation of the AT1 angiotensin receptor. Front. Endocrinol. (Lausanne). 10: 519. 2019. https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00519
33. *Chiu T., Santiskulvong C., Rozengurt E.* ANG II stimulates PKC-dependent ERK activation, DNA synthesis, and cell division in intestinal epithelial cells. Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol. 285(1): G1–11. 2003. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00419.2002
34. *Hines J., Fluharty S.J., Yee D.K.* Structural determinants for the activation mechanism of the angiotensin II type 1 receptor differ for phosphoinositide hydrolysis and mitogen-activated protein kinase pathways. Biochem. Pharmacol. 66(2): 251–262. 2003. https://doi.org/10.1016/s0006-2952(03)00257-0
35. *Namsolleck P., Recarti C., Foulquier S., Steckelings U.M., Unger T.* AT2 Receptor and tissue injury: Therapeutic Implications. Curr. Hypertens. Rep. 16(2): 416. 2014. https://doi.org/10.1007/s11906-013-0416-6
36. *Saavedra J.M., Armando I.* Angiotensin II AT2 receptors contribute to regulate the sympathoadrenal and hormonal reaction to stress stimuli. Cell Mol. Neurobiol. 38(1): 85–108. 2018. https://doi.org/10.1007/s10571-017-0533-x
37. *Bennion D.M., Haltigan E., Regenhardt R.W., Steckelings U.M., Sumners C.* Neuroprotective mechanisms of the ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas axis in stroke. Curr. Hypertens Rep. 17(2): 3. 2015. https://doi.org/10.1007/s11906-014-0512-2
38. *Böttcher E., Matrosovich T., Beyerle M., Klenk H., Garten W., Matrosovich M.* Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. J. Virol. 80(19): 9896–9898. 2006. https://doi.org/10.1128/JVI.01118-06
39. *Shirogane Y., Takeda M., Iwasaki M., Ishiguro N., Takeuchi H., Nakatsu Y., Tahara M., Kikuta H., Yanagi Y.* Efficient multiplication of human metapneumovirus in Vero cells expressing the transmembrane serine protease TMPRSS2. J. Virol. 82(17): 8942–8946. 2008. https://doi.org/10.1128/JVI.00676-08
40. *Chaipan C., Kobasa D., Bertram S., Glowacka I., Steffen I., Tsegaye T.S., Takeda M., Bugge T.H., Kim S., Park Y., Marzi A., Pöhlmann S.* Proteolytic activation of the 1918 influenza virus hemagglutinin. J. Virol. 83(7): 3200–3211. 2009. https://doi.org/10.1128/JVI.02205-08
41. *Yun B., Zhang Y., Liu Y., Guan X., Wang Y., Qi X., Cui H., Liu C., Zhang Y., Gao H., Gao L., Li K., Gao Y., Wang X.* TMPRSS12 Is an Activating Protease for Subtype B Avian Metapneumovirus. J. Virol. 90(24): 11231–11246. 2016. https://doi.org/10.1128/JVI.01567-16
42. *Li F., Li W., Farzan M., Harrison S.C.* Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. Science. 309(5742): 1864–1868. 2005. https://doi.org/10.1126/science.1116480
43. *Wan Y., Shang J., Graham R., Baric R.S., Li F.* Receptor recognition by novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS. J. Virol. 94(7): pii: JVI.00127-20. 2020. https://doi.org/10.1128/JVI.00127-20

44. *Lan J., Ge J., Yu J., Shan S., Zhou H., Fan S., Zhang Q., Shi X., Wang Q., Zhang L., Wang X.* Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. Nature. 2020.
https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5
45. *Luan J., Lu Y., Jin X., Zhang L.* Spike protein recognition of mammalian ACE2 predicts the host range and an optimized ACE2 for SARS-CoV-2 infection. Biochem. Biophys. Res. Commun. pii: S0006-291X(20)30526-X. 2020.
https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.03.047
46. *Matsuyama S., Nao N., Shirato K., Kawase M., Saito S., Takayama I., Nagata N., Sekizuka T., Katoh H., Kato F., Sakata M., Tahara M., Kutsuna S., Ohmagari N., Kuroda M., Suzuki T., Kageyama T., Takeda M.* Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 117(13): 7001–7003. 2020.
https://doi.org/10.1073/pnas.2002589117
47. *Qiu Y., Zhao Y.B., Wang Q., Li J.Y., Zhou Z.J., Liao C.H., Ge X.Y.* Predicting the angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) utilizing capability as the receptor of SARS-CoV-2. Microbes Infect. pii: S1286-4579(20)30049-6. 2020.
https://doi.org/10.1016/j.micinf.2020.03.003
48. *Shang J., Ye G., Shi K., Wan Y., Luo C., Aihara H., Geng Q., Auerbach A., Li F.* Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. Nature. 2020.
https://doi.org/10.1038/s41586-020-2179-y
49. *Yan R., Zhang Y., Li Y., Xia L., Guo Y., Zhou Q.* Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. Science. 367(6485): 1444–1448. 2020.
https://doi.org/10.1126/science.abb2762
50. *Iwata-Yoshikawa N., Okamura T., Shimizu Y., Hasegawa H., Takeda M., Nagata N.* TMPRSS2 Contributes to virus spread and immunopathology in the airways of murine models after coronavirus infection. J. Virol. 93(6): pii: e01815-18. 2019.
https://doi.org/10.1128/JVI.01815-18
51. *Simmons G., Gosalia D.N., Rennekamp A.J., Reeves J.D., Diamond S.L., Bates P.* Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102(33): 11876–11881. 2005.
https://doi.org/10.1073/pnas.0505577102
52. *Kawase M., Shirato K., van der Hoek L., Taguchi F., Matsuyama S.* Simultaneous treatment of human bronchial epithelial cells with serine and cysteine protease inhibitors prevents severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. J. Virol. 86(12): 6537–6545. 2012.
https://doi.org/10.1128/JVI.00094-12
53. *Zhou Y., Vedantham P., Lu K., Agudelo J., Carrion R. Jr., Nunneley J.W., Barnard D., Pöhlmann S., McKerrow J.H., Renslo A.R., Simmons G.* Protease inhibitors targeting coronavirus and filovirus entry. Antiviral Res. 116: 76-84. 2015.
https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.01.011
54. *Park J.E., Li K., Barlan A., Fehr A.R., Perlman S., McCray P.B., Jr., Gallagher T.* Proteolytic processing of middle east respiratory syndrome coronavirus spikes expands virus tropism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 113(43): 12262–12267. 2016.
https://doi.org/10.1073/pnas.1608147113
55. *Kleine-Weber H., Elzayat M.T., Hoffmann M., Pöhlmann S.* Functional analysis of potential cleavage sites in the MERS-coronavirus spike protein. Sci. Rep. 8(1): 16597. 2018.
https://doi.org/10.1038/s41598-018-34859-w
56. *Diaz J.H.* Hypothesis: angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers may increase the risk of severe COVID-19. J. Travel. Med. pii: taaa041. 2020.
https://doi.org/10.1093/jtm/taaa041
57. *Pal R., Bhansali A.* COVID-19, Diabetes Mellitus and ACE2: The conundrum. Diabetes Res. Clin. Pract. 29: 108132. 2020.
https://doi.org/10.1016/j.diabres.2020.108132
58. *Ferrario C.M., Varagic J.* The ANG-(1-7)/ACE2/mas axis in the regulation of nephron function. Am. J. Physiol. 298: F1297–F1305. 2010.
https://doi.org/10.1152/ajprenal.00110.2010
59. *Ohtsuki M., Morimoto S.-I., Izawa H., Ismail T.F., Ishibashi-Ueda H., Kato Y., Horii T., Isomura T., Suma H., Nomura M., Hishida H., Kurahashi H., Ozaki Y.* Angiotensin converting enzyme 2 gene expression increased compensatory for left ventricular remodeling in patients with end-stage heart failure. Int. J. Cardiol. 145(2): 333–334. 2010.
https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2009.11.057
60. *Wong S.H., Lui R.N., Sung J.J.* Covid-19 and the Digestive System. J. Gastroenterol. Hepatol. 2020.
https://doi.org/10.1111/jgh.15047
61. *Kreutz R., Algharably E.A.E., Azizi M., Dobrowolski P., Guzik T., Januszewicz A., Persu A., Prejbisz A., Riemer T.G., Wang J.G., Burnier M.* Hypertension, the renin-angiotensin system, and` the risk of lower respiratory tract infections and lung injury: implications for COVID-19. Cardiovasc. Res. pii: cvaa097. 2020.
https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa097

62. *Nicin L., Abplanalp W.T., Mellentin H., Kattih B., Tombor L., John D., Schmitto J.D., Heineke J., Emrich F., Arsalan M., Holubec T., Walther T., Zeiher A.M., Dimmeler S.* Cell type-specific expression of the putative SARS-CoV-2 receptor ACE2 in human hearts. Eur. Heart. J. 2020 Apr. 15. pii: ehaa311.
https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa311
63. *Tikellis C., Thomas M.C.* Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) Is a Key Modulator of the Renin Angiotensin System in Health and Disease. Int. J. Pept. 2012: 1–8. 2012.
https://doi.org/10.1155/2012/256294
64. *Zou Z., Yan Y., Shu Y., Gao R., Sun Y., Li X., Ju X., Liang Z., Liu Q., Zhao Y., Guo F., Bai T., Han Z., Zhu J., Zhou H., Huang F., Li C., Lu H., Li N., Li D., Jin N., Penninger J.M., Jiang C.* Angiotensin-converting enzyme 2 protects from lethal avian influenza A H5N1 infections. Nat. Commun. 5: 3594. 2014.
https://doi.org/10.1038/ncomms4594
65. *Romaní-Pérez M., Outeiriño-Iglesias V., Moya C.M., Santisteban P., González-Matías L.C., Vigo E.* Activation of the GLP-1 Receptor by Liraglutide Increases ACE2 Expression, Reversing Right Ventricle Hypertrophy, and Improving the Production of SP-A and SP-B in the Lungs of Type 1 Diabetes Rats. Endocrinology. 156(10):3559–3569. 2015.
https://doi.org/10.1210/en.2014-1685
66. *Stanziola L., Greene L.J., Santos R.A.S.* Effect of chronic angiotensin converting enzyme inhibition on angiotensin I and bradykinin metabolism in rats. Am. J. Hypertens. 12: 1021–1029. 1999.
https://doi.org/10.1016/S0895-7061(99)00090-4
67. *Ferrario C.M., Jessup J., Chappell M.C., Averill D.B., Brosnihan K.B., Tallant E.A., Diz D.I., Gallagher P.E.* Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition and Angiotensin II Receptor Blockers on Cardiac Angiotensin-Converting Enzyme 2. Circulation. 111: 2605–2610. 2005.
https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.510461
68. *Jessup J., Gallagher P.E., Averill D.B., Brosnihan K.B., Ann T.E., Chappell M.C., Ferrario C.M.* Effect of Angiotensin II blockade on a new congenic model of hypertension derived from the transgenic Ren-2 rat. Am. J. Physiol. Heart Circ. 291(5): H2166–7H2172. 2006.
https://doi.org/10.1152/ajpheart.00061.2006
69. *Ferrario C.M., Jessup J., Gallagher P.E., Averill D.B., Brosnihan K.B., Smith R., Chappell M.C.* Effect of renin-angiotensin system blockade on renal Angiotensin-(1-7)-forming enzymes, ACE-2 and receptors. Kidney Int. 68(5): 2189–2196. 2005.
https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00675.x
70. *Wang X., Ye Y., Gong H., Wu J., Yuan J., Wang S., Yin P., Ding Z., Kang L., Jiang Q., Zhang W., Li Y., Ge J., Zou Y.* The effects of different Angiotensin II Type 1 Receptor blockers on the regulation of the ACE-AngII-AT1 and ACE2-Ang-(1-7)-Mas axes in pressure overload-induced cardiac remodeling in male mice. Mol. Cell Cardiol. 97: 180–190. 2016.
https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.05.012
71. *Wu C., Chen X., Cai Y., Xia J., Zhou X., Xu S.* Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. JAMA Intern. Med. 2020. https://jamanetwork.com/journals/jamainternalmedicine/fullarticle/2763184.
72. *Li Y.C., Bai W.Z., Hashikawa T.* The neuroinvasive potential of SARS-CoV2 may play a role in the respiratory failure of COVCID-19 patients. J. Med. Virol. 1: 1–4. 2020.
https://doi.org/10.1002/jmv.25728
73. *Mao L., Wang M., Chen S., He Q., Chang J., Hong C., Zhou Y., Wang D., Li Y., Jin H., Bo H.* Neurological Manifestations of Hospitalized Patients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective case series study. MedRExiv. 2020.
https://doi.org/10.1101/2020.02.22.20026500
74. *Diz D.I., Garcia-Espinosa M.A., Gegick S., Tommasi E.N., Ferrario C.M., Ann Tallant E., Chappell M.C., Gallagher P.E.* Injections of angiotensin-converting enzyme 2 inhibitor MLN4760 into nucleus tractus solitarii reduce baroreceptor reflex sensitivity for heart rate control in rats. Exp. Physiol. 93(5): 694–700. 2008.
https://doi.org/10.1113/expphysiol.2007.040261
75. *Xu P., Sriramula S., Lazartigues E.* ACE2/ANG-(1-7)/Mas pathway in the brain: the axis of good. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 300(4): R804–R817. 2011.
https://doi.org/10.1152/ajpregu.00222.2010
76. *Alenina N., Bader M.* ACE2 in brain physiology and pathophysiology: Evidence from transgenic animal models. Neurochem. Res. 44(6): 1323–1329. 2019.
https://doi.org/10.1007/s11064-018-2679-4
77. *Chen W.H., Strych U., Hotez P.J., Bottazzi M.E.* The SARS-CoV-2 Vaccine Pipeline: an Overview. Curr. Trop. Med. Rep. 3: 1–4. 2020.
https://doi.org/10.1007/s40475-020-00201-6
78. *Amanat F., Krammer F.* SARS-CoV-2 Vaccines: Status Report. Immunity. pii: S1074-7613(20)30120-5. 2020.
https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.03.007

79. *Hotez P.J., Bottazzi M.E., Corry D.B.* The Potential Role of Th17 Immune Responses in Coronavirus Immunopathology and Vaccine-induced Immune Enhancement. Microbes Infect. pii: S1286-4579(20)30072-1. 2020.
https://doi.org/10.1016/j.micinf.2020.04.005

Angiotensin-Converting Enzyme of the Type 2 as a Molecular Mediator for the Entry of SARS-Cov and SARS-Cov-2 Viruses into the Cell

A. O. Shpakov*

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

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

To enter the SARS-CoV-2 coronavirus (Severe Acute Respiratory Syndrome-CoronaVirus-2), the causative agent of the COVID-19 pandemic, into the cell, the interaction of the surface spike S-protein of this virus with the extracellular domain of the membrane-bound form of the angiotensin-converting enzyme of the type 2 (ACE2) is necessary. This enzyme, a key element of the renin-angiotensin system, is responsible for the synthesis of angiotensin-(1–7), which has vasodilator and anti-inflammatory properties, from angiotensin-II, a powerful vasoconstrictor, the synthesis of which is catalyzed by the angiotensin-converting enzyme (ACE), a functional antagonist of ACE2. After the site-specific hydrolysis, which is carried out by the transmembrane serine protease TMPRSS2 localized in the infected cell, the viral S-protein specifically binds to ACE2, which triggers the internalization of the virus into the cell by endocytosis. Suppression of this process with drugs that inhibit the TMPRSS2 protease and disrupt the interaction of S-protein with ACE2 helps prevent infection and, therefore, is a promising approach for the treatment and prevention of COVID-19. A similar mechanism of penetration into the cell is used by the SARS-CoV virus, the causative agent of SARS, which is related to SARS-CoV-2. When treating patients with arterial hypertension and diabetes mellitus with ACE inhibitors, angiotensin receptor blockers, statins and some antidiabetic drugs, the expression and activity of ACE2 are usually increased, and this increases the risk of SARS-CoV-2 infection and worsens the outcome of this disease. During infection, the virus, forming a complex with ACE2, reduces the number of ACE2 on the cell surface, disrupts ACE2-dependent physiological processes, and this is one of the causes of acute respiratory distress syndrome and heart failure in patients with COVID-19. This review analyzes the functional role of ACE2 in cell infection with SARS-CoV-2 and SARS-CoV viruses, and discusses the molecular mechanisms of this process and its pathophysiological consequences.

Keywords: angiotensin-converting enzyme of the type 2, renin-angiotensin system, protease TMPRSS2, SARS-CoV-2, SARS-CoV, protease ADAM17, angiotensin-converting enzyme inhibitor, type 1 angiotensin receptor blocker

ЦИТИРОВАТЬ:

Шпаков А.О. Ангиотензин-превращающий фермент 2-го типа, как молекулярный посредник для инфицирования клетки вирусами SARS-Cov и SARS-Cov-2 . Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(6): 795–810.

DOI: 10.31857/S086981392006013

TO CITE THIS ARTICLE:

Shpakov A.O. Angiotensin-Converting Enzyme of the Type 2 as a Molecular Mediator for the Entry of SARS-Cov and SARS-Cov-2 Viruses into the Cell. Russian Journal of Physiology. 106(6): 795–810.

DOI: 10.31857/S086981392006013

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 7, с. 811–822

ОБЗОРНЫЕ И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ВЛИЯНИЯ МЕТФОРМИНА НА РЕПРОДУКТИВНУЮ СИСТЕМУ

© 2020 г. А. О. Шпаков*

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

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

Поступила в редакцию 03.02.2020 г.
После доработки 20.02.2020 г.
Принята к публикации 17.03.2020 г.

В основе действия метформина (МФ), который широко применяется для лечения сахарного диабета 2 типа и метаболического синдрома, лежит нормализация инсулиновой чувствительности, липидного и углеводного обмена. В последние годы появились данные экспериментальных и клинических исследований о том, что МФ нормализует нарушенные в условиях метаболических расстройств функции основных звеньев гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси, усиливая продукцию гонадолиберина, гипоталамического регулятора этой оси, а также восстанавливая стероидогенную активность гонад и нормализуя процессы сперматогенеза, фолликулогенеза и оогенеза. Применение МФ при синдроме поликистозных яичников и при других репродуктивных дисфункциях, ассоциированных с метаболическими нарушениями, предотвращает снижение фертильности и повышает результативность вспомогательных репродуктивных технологий. Современным достижениям в области изучения механизмов действия МФ и его использования для восстановления функций женской и мужской репродуктивных систем при метаболических заболеваниях и других патологиях посвящен настоящий обзор.

Ключевые слова: метформин, АМФ-активируемая протеинкиназа, митохондриальный комплекс I, репродуктивная система, сахарный диабет, стероидогенез, синдром поликистозных яичников

DOI: 10.31857/S086981392005009X

Метформин (МФ), впервые синтезированный еще в 1958 г., в настоящее время является основным препаратом для лечения сахарного диабета 2 типа (СД2) и метаболического синдрома (МС), а также широко применяется для коррекции массы тела и метаболических показателей при ожирении. В основе его терапевтического эффекта лежит способность повышать чувствительность тканей к инсулину, сниженную при СД2 и МС, улучшая, тем самым, инсулин-индуцированную утилизацию глюкозы, а также подавлять синтез глюкозы в печени *de novo* и снижать абсорбцию глюкозы в желудочно-кишечном тракте [1, 2]. Результатом этого является ослабление гипергликемии, гиперинсулинемии, восстановление липидного обмена. Будучи стабильным соединением, гидрофильным по природе, МФ при введении в организм легко преодолевает гистогематические барьеры, в том числе гематоэнцефалический барьер, и достигает множества тканей, включая мышцы, печень, поджелудочную железу, жировую ткань, гипоталамус, гипофиз, гонады. Его проникновение внутрь клетки может происходить как посредством ограниченной

пассивной диффузии, так и с помощью транспортеров органических катионов, таких как OCT1 (Organic Cation Transporter-1), OCT2 и MATE1 (Multidrug And Toxin Extrusion-1), причем активный транспорт МФ превалирует над пассивным [3]. Полиморфизмы в генах, кодирующих транспортеры органических катионов, вызывают значительные изменения в распределении МФ в тканях и меняют его фармакологический профиль [4, 5]. В клинике для лечения пациентов с СД2 используют МФ в дозах 30–50 мг/кг/сутки, что позволяет достичь уровня этого препарата в сыворотке крови 10–40 мкмоль/л [6]. Мыши примерно в 10 раз менее чувствительны к МФ в сравнении с человеком [6, 7]. Видоспецифичность эффектов МФ необходимо принимать во внимание как для сопоставления его эффективных доз при лечении человека и экспериментальных животных, так и для правильной интерпретации полученных результатов.

В последние годы появились свидетельства того, что МФ не только положительно влияет на метаболические показатели, пищевое поведение и энергетический обмен при СД2 и МС, но и способен восстанавливать нарушенные при этих патологических состояниях функции репродуктивной системы. В дальнейшем появились свидетельства того, что МФ, непосредственно воздействуя на различные звенья гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси, способен нормализовать репродуктивный потенциал и может быть использован во вспомогательных репродуктивных технологиях. Достижениям и перспективам использования МФ для восстановления функционирования женской и мужской репродуктивной систем при метаболических и других заболеваниях посвящен настоящий обзор.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ МЕТФОРМИНА

Сигнальные пути и мишени МФ, несмотря на большое число посвященных решению этого вопроса исследований, до сих пор мало изучены, что во многом обусловлено различиями механизмов действия МФ в различных типах клеток и у различных представителей позвоночных животных, разными дозами и стратегиями применения МФ, а также различиями метаболического и энергетического статуса организма, в том числе в условиях СД2, МС и других метаболических расстройств [2, 8, 9].

Основным механизмом ингибирующего действия МФ на глюконеогенез считают активацию АМФ-активируемой протеинкиназы (AMPK), основного энергетического сенсора клетки [9, 10]. Этот процесс может реализовываться как при воздействии сравнительно низких концентраций МФ на стабильность $\alpha\beta\gamma$-гетеротримерного комплекса AMPK, так и при ингибировании более высокими концентрациями МФ комплекса 1 дыхательной транспортной цепи митохондрий и фермента АМФ-дезаминазы (рис. 1). Показателем активации AMPK является фосфорилирование α-субъединицы фермента по остатку Thr^{172}, осуществляемое протеинкиназой LKB1. Стимулирующий эффект низких концентраций МФ на активность AMPK обусловлен стабилизацией комплекса между каталитической α-субъединицей и неактивными β- и γ-субъединицами, что позволяет протеинкиназе LKB1 более эффективно фосфорилировать AMPK и переводить ее в активное состояние [11]. Стабилизация $\alpha\beta\gamma$-комплекса AMPK также препятствует дефосфорилированию α-субъединицы AMPK фосфатазой PP2C, что позволяет AMPK более длительное время оставаться в активной фосфорилированной форме. Вызываемая МФ активация AMPK приводит к фосфорилированию активатора транскрипции CBP по остатку Ser^{436} с помощью атипичной протеинкиназы ι/λ, в результате чего нарушается ассоциация CBP с цАМФ-регулируемым транскрипционным фактором CREB. Это приводит к подавлению экспрессии генов, ответственных за глюконеогенез, в том числе кодирующих ферменты, катализирующие скорость-лимитирующие стадии глюконео-

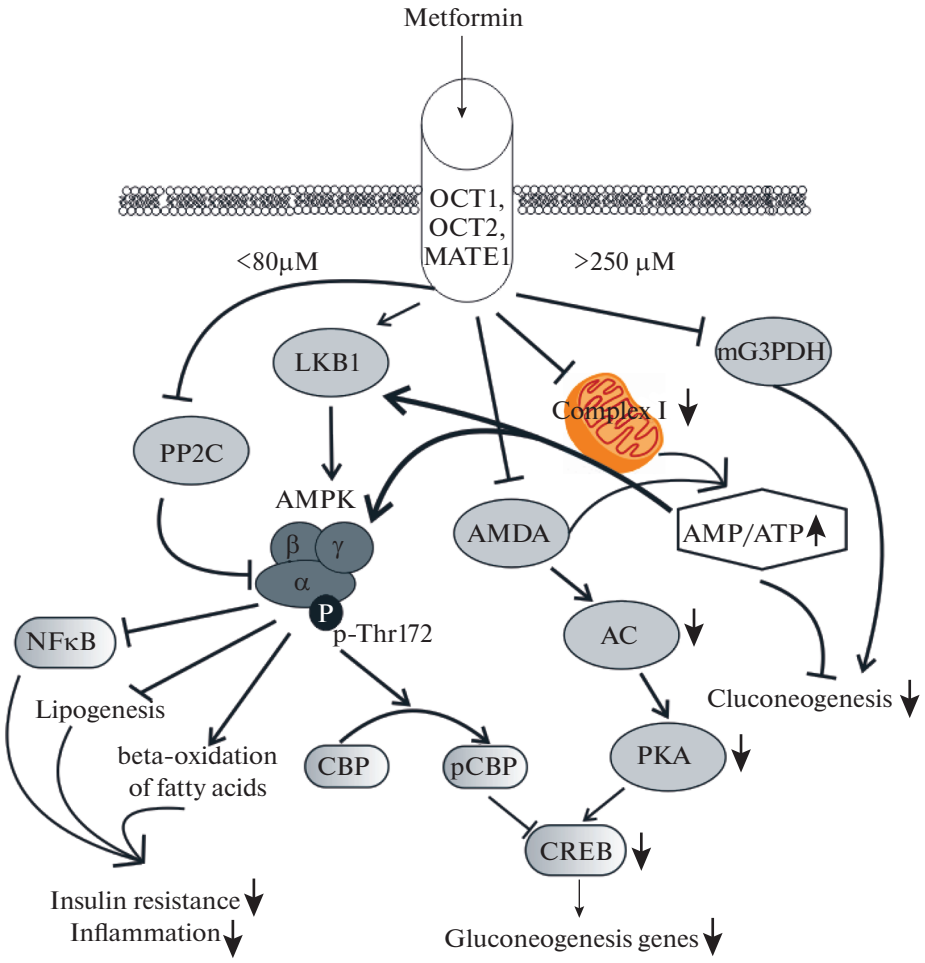


Рис. 1. Молекулярные механизмы действия метформина, осуществляемые путем активации AMPK и ингибирования митохондриального комплекса I дыхательной цепи переноса электронов.

Условные обозначения: OCT1, OCT2, MATE1 – транспортеры органических катионов; LKB1 – киназа печени B1; AMPKαβγ – гетеротримерная АМФ-активируемая протеинкиназа, состоящая из субъединиц α1/2 (мишень для активирующего фосфорилирования по остатку Thr^{172}), β1/2 и γ1/2/3; PP2C – протеинфосфатаза 2C; CREB – цАМФ-активируемый транскрипционный фактор (**c**AMP **r**esponse **e**lement-**b**inding protein); CBP, p-CBP – CREB-связывающий белок с ацетилтрансферазной активностью, коактиватор фактора CREB, и его фосфорилированная форма; AMPD1 – АМФ-дезаминаза; АЦ – аденилатциклаза; ПКА – протеинкиназа A; mG3PDH – митохондриальная глицерол-3-фосфатдегидрогеназа; NFκB – ядерный фактор κB; комплекс I – митохондриальный NADH-дегидрогеназный комплекс, первый комплекс дыхательной цепи переноса электронов.

Fig.1. The molecular mechanisms of metformin action which are carried out by activation of AMPK and inhibition of mitochondrial complex I of the respiratory electron transport chain.

Abbreviations: OST1, OST2, and MATE1 – the transporters of organic cations; LKB1 – liver kinase B1; AMPKαβγ – the heterotrimeric AMP-activated protein kinase consisting of the α1/2 (the target for activation phosphorylation at the Thr^{172} residue), β1/2 and γ1/2/3 subunits; PP2C – protein phosphatase 2C; CREB – cAMP-activated transcription factor (cAMP response element-binding protein); CBP, p-CBP – CREB-binding protein with acetyltransferase activity, a co-activator of the factor CREB, and its phosphorylated form; AMPD1 – AMP deaminase; AC – adenylyl cyclase; PKA – protein kinase A; mG3PDH – mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase; NFκB – nuclear factor κB; complex I – mitochondrial NADH-dehydrogenase complex, the first complex of the respiratory electron transport chain.

генеза, и к снижению продукции глюкозы гепатоцитами [12]. Эффект МФ на активность AMPK, обусловленный стабилизацией αβγ-комплекса, реализуется при его концентрациях ниже 80 мкМ, которые достигаются при пероральном приеме даже относительно низких терапевтических доз МФ [13].

В более высоких концентрациях МФ, ингибируя митохондриальный комплекс 1 и АМФ-дезаминазу, снижает продукцию АТФ и вызывает накопление АМФ внутри клетки, что приводит к увеличению соотношения [АМФ]/[АТФ] и активации AMPK [14, 15] (рис. 1). Однако концентрации МФ, достоверно повышающие соотношения [АМФ]/[АТФ] и [АДФ]/[АТФ], существенно превышают 250 мкМ [7, 14], и являются труднодостижимыми при клиническом его применении [13]. Независимо от механизмов МФ-индуцированной активации AMPK следствием этого являются стимуляция обеспечивающих выработку энергии катаболических путей, опосредующих усиление поглощения глюкозы клетками, повышение экспрессии и активности мембранных переносчиков глюкозы, усиление метаболических процессов, таких как гликолиз и окислительное фосфорилирование, нормализация митохондриального биогенеза (рис. 1). В дополнение к этому стимуляция активности AMPK приводит к активации β-окисления жирных кислот и к ингибированию процесса липогенеза, результатом чего является ослабление характерной для СД2 и МС дислипидемии и нормализация липидного обмена.

Наряду с AMPK-зависимыми имеются и не зависимые от AMPK пути влияния МФ на эффекторные системы клетки. Подавляя активность АМФ-дезаминазы, МФ может вызвать АМФ-опосредуемое ингибирование фермента аденилатциклазы, что ведет к снижению уровня внутриклеточного цАМФ и ослаблению активности протеинкиназы А [16] (рис. 1). Снижение активности цАМФ-зависимых путей в печени, как и активация AMPK, ингибирует синтез глюкозы гепатоцитами. МФ ингибирует митохондриальную челночную глицерол-3-фосфатдегидрогеназу (mG3PDH), переносящую NADH из цитоплазмы в митохондрии [17]. Ингибирование активности mG3PDH повышает уровень NADH и снижает уровень NAD^+, что вызывает дефицит NAD^+, который вовлечен в реакцию превращения лактата в пируват. Поскольку снижение активности mG3PDH ингибирует процесс превращения лактата в глюкозу, то результатом является снижение интенсивности глюконеогенеза в гепатоцитах и накопление лактата, что может вызывать лактоацидоз при длительном лечении высокими дозами МФ [17, 18]. Недавно была идентифицирована еще одна мишень МФ – фермент H3K27me3-деметилаза KDM6A/UTX, ответственная за транскрипционную активность некоторых генов [19]. Ряд антидиабетических эффектов МФ может быть обусловлен изменениями в микробиоте кишечника, вследствие стимуляции роста бактерий, которые продуцируют короткоцепочечные жирные кислоты [20, 21]. Модулируя состав микробиоты у грызунов с СД2 и МС, МФ снижает уровни бактериальных липополисахаридов в крови [22], а также активирует AMPK-зависимые пути в мукозном слое кишечника, снижая абсорбцию глюкозы [23].

Среди механизмов действия МФ, направленных на усиление инсулиновых сигнальных путей, определяющую роль играет ингибирование активности ядерного фактора κB (NF-κB), вызывающего развитие инсулиновой резистентности, а также снижение экспрессии фосфатазы PTEN, которая дефосфорилирует фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат и, тем самым, предотвращает стимуляцию инсулином Akt-киназы, ключевого эффекторного звена 3-фосфоинозитидного пути. Ингибирующее влияние МФ на активность NF-κB-зависимых сигнальных путей осуществляется в основном через стимуляцию AMPK [2, 24]. Поскольку NF-κB играет ключевую роль в воспалительных реакциях, то вызываемое МФ ингибирование активности этого фактора способствует ослаблению процессов воспаления и повышает выживаемость клеток.

МЕТФОРМИН И ЖЕНСКАЯ РЕПРОДУКТИВНАЯ СИСТЕМА

Наибольшее число клинических данных по применению МФ для коррекции заболеваний женской репродуктивной системы и повышения эффективности вспомогательных репродуктивных технологий относятся к пациенткам с синдромом поликистозных яичников (СПКЯ), который встречается в среднем у 5–10% женщин репродуктивного возраста и гораздо чаще у женщин с СД2, МС и гестационным диабетом. СПКЯ диагностируется по трем основным критериям: (1) наличие олиго- или ановуляции, (2) гиперандрогения, (3) наличие 12 или большего числа фолликулов размером от 2 до 9 мм в каждом яичнике или увеличение объема яичников свыше 10 мл [25]. Для СПКЯ характерны резистентность к инсулину и лептину, повышение активности факторов воспаления, нарушения липидного и углеводного обмена. В настоящее время получено немало доказательств в пользу эффективности МФ для восстановления функций яичников у женщин с СПКЯ, причем в ряде стран МФ целенаправленно назначают во время беременности женщинам с СПКЯ и гестационным диабетом [26, 27].

Результаты обследования 2150 женщин с СПКЯ, полученные при проведении 27 клинических исследований, показали, что МФ повышает частоту овуляции, улучшает клинические показатели беременности, усиливает терапевтический эффект кломифен-цитрата – препарата, широко применяемого для лечения СКПЯ [28]. МФ усиливает терапевтический эффект нестероидного ингибитора ароматазы летрозола у женщин с СПКЯ, повышая частоту наступления беременности и коэффициент рождаемости [29]. Большинство авторов указывает на то, что МФ улучшает результативность контролируемой индукции овуляции и клинические показатели беременности у женщин с СПКЯ и СД2 [28, 30, 31]. Одни из них считают, что положительные эффекты МФ на фолликулогенез, овуляцию и развитие эмбриона у женщин с СПКЯ обусловлены его прямым действием на ткани яичников, в то время как другие связывают эти эффекты с нормализацией чувствительности тканей к инсулину, восстановлением метаболических показателей, снижением активности факторов воспаления [32].

Показано, что при длительном лечении пациенток с СКПЯ с помощью МФ отмечается снижение уровня андрогенов и нормализация уровня лютеинизирующего гормона, основного активатора синтеза андрогенов в фолликулярных клетках яичников, что приводит к возобновлению менструаций, сопровождающихся овуляцией, и восстановлению фертильности, в том числе при контролируемой индукции овуляции [33]. МФ предотвращает гиперандрогению посредством ослабления гиперинсулинемии, которая не только является одним из ведущих факторов, провоцирующих СПКЯ [34], но также усиливает синтез андрогенов яичниками [35] и снижает продукцию связывающего стероидные гормоны глобулина, повышая, тем самым, уровень свободных андрогенов в крови [36]. Наряду с ослаблением гиперандрогении, МФ предотвращает ее негативные последствия, как это показано на модели СПКЯ у мышей, индуцированной дегидроэпиандростероном. При лечении мышей МФ (500 мг/кг, 20 дней) отмечали нормализацию числа ооцитов, находящихся в метафазе II мейотического деления, восстановление потенциала внутренней мембраны митохондрий и содержания АТФ в ооцитах, ослабление окислительного стресса, что выражалось в снижении активных форм кислорода и нормализации уровня восстановленного глутатиона. В результате повышалось качество ооцитов и нормализовались начальные стадии эмбриогенеза [37].

Эффекты МФ на синтез андрогенов реализуются в основном через AMPK-зависимые механизмы [31]. При действии на культуру клеток теки яичников человека как в базальном состоянии, так и при воздействии активатора аденилатциклазы форсколина, МФ стимулировал AMPK и при этом снижал синтез андростендиона,

предшественника тестостерона. В клетках теки, стимулированных форсколином, он подавлял экспрессию генов белка StAR, транспортирующего холестерин в митохондрии (скорость-лимитирующая стадия синтеза тестостерона), и фермента 17α-гидроксилазы, катализирующего синтез андростендиона [38]. В пользу функциональной важности AMPK для женской фертильности свидетельствуют данные о том, что делеция каталитической α1-субъединицы AMPK в ооцитах мышей приводит к значительному снижению у мутантных животных как размера помета, так и количества эмбрионов после экстракорпорального оплодотворения, причинами чего являются нарушение клеточного деления и дисфункции митохондрий, зависимые от активности AMPK [39].

Наряду с ослаблением гиперандрогении МФ ингибирует экспрессию гена ароматазы в фолликулярных клетках, снижая продукцию эстрогенов, в том числе индуцированную ФСГ и другими гормонами [40, 41]. У значительной части женщин с СПКЯ отмечается повышение чувствительности клеток гранулезы яичников к ФСГ, инсулину и инсулиноподобному фактору роста-1 (ИФР-1). Наряду с этим в клетках гранулезы повышена экспрессия рецептора ФСГ и гиперактивированы внутриклеточные мишени этого гонадотропина [42]. Все это приводит к ускоренному росту и пролиферации фолликулярных клеток в ответ на воздействие ФСГ, инсулина и ИФР-1 [43]. Ослабляя стимулирующие эффекты ФСГ, инсулина и ИФР-1 на стероидогенез и ростовую активность клеток гранулезы, МФ нормализует процессы фолликулогенеза и овуляции. Таким образом, МФ обеспечивает отсрочку запуска системы, стимулирующей рост фолликулов, поскольку для нормальной дифференцировки и развития антральных фолликулов, способных войти в менструальный цикл, требуется около трех месяцев [40]. В пользу этого свидетельствуют данные о том, что трехмесячное введение о МФ пациенткам с СПКЯ улучшает показатели беременности и число новорожденных [28, 44].

Одной из причин ослабления чувствительности яичников к ФСГ, инсулину и ИФР-1 и подавления в них экспрессии ароматазы является МФ-индуцированное снижение экспрессии рецепторов ФСГ, инсулина и ИФР-1 в клетках гранулезы яичников [40, 41]. Наряду с этим МФ ингибирует фосфорилирование фактора CREB, предотвращая цАМФ-зависимую активацию экспрессии CREB-зависимых генов, и подавляет транслокацию в ядро фактора CRTC2, необходимого для сборки активационного комплекса, включающего CREB. Все эти процессы независимы от AMPK, что указывает на участие в контроле функций яичников как зависимых, так и независимых от AMPK механизмов действия МФ [40].

МЕТФОРМИН И МУЖСКАЯ РЕПРОДУКТИВНАЯ СИСТЕМА

У мужчин СД2 и МС также приводят к снижению фертильности, что обусловлено нарушениями сперматогенеза и стероидогенеза, снижением количества и качества сперматозоидов [45]. Лечение мужчин с МС, имеющих нарушения сперматогенеза – олигоспермию, тератозооспермию и астенозооспермию, с помощью МФ в течение 6 месяцев повышало число сперматозоидов, их подвижность, улучшало морфологию и, по крайней мере, частично восстанавливало фертильность. Основными причинами этого были повышение чувствительности тканей к инсулину, ослабление гипергликемии и гиперинсулинемии, а также нормализация андрогенного статуса, что было обусловлено снижением продукции связывающего стероидные гормоны глобулина и повышением уровня свободного тестостерона в крови [46]. Лечение МФ также восстанавливало пульсирующий выброс лютеинизирующего гормона, что указывает на нормализацию различных звеньев гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси, в том числе гипоталамических нейронов, секретирующих гонадолиберин, рилизинг-фактор лютеинизирующего гормона [46]. Необходимо от-

метить, что на уровне гипоталамуса МФ подобно лептину нормализует активность AMPK и улучшает функциональное состояние нейронов, продуцирующих проопиомеланокортин, предшественник α-меланоцитстимулирующего гормона и других пептидов меланокортинового семейства [47]. Поскольку меланокортиновые пептиды являются положительными регуляторами секреторной активности гонадолиберин-экспрессирующих нейронов [48, 49], то повышение их уровня в гипоталамических структурах приводит к усилению продукции гонадолиберина и активации гонадной оси, что и наблюдается при лечении МФ мужчин с МС. В той связи следует подчеркнуть, что многие эффекты МФ на фертильность у женщин с СПКЯ также могут быть обусловлены гипоталамическими механизмами действия МФ [50].

Лечение МФ восстанавливало массу и морфологию яичек, показатели сперматогенеза и уровень тестостерона в крови грызунов с метаболическими расстройствами, ассоциированными с репродуктивными дисфункциями [51–56]. Лечение диабетических крыс МФ восстанавливало систему антиоксидантной защиты и окислительно-восстановительный баланс в семенниках, предотвращало нарушение стабильности генома и изменения пролиферативной активности тестикулярных соматических и генеративных клеток, оказывая тем самым антигенотоксический эффект [51]. Четырехнедельное лечение самцов крыс с СД2 МФ и пиоглитазоном снижало долю дефектных сперматозоидов и повышало количество каудальных сперматозоидов [52]. Лечение МФ (100 мг/кг/сутки, 8 недель) самцов крыс линии Sprague–Dawley с МС, вызванным высокожировой диетой, восстанавливало уровни инсулина, лептина, эстрогенов и тестостерона в крови, существенно снижало число мелких, атрофированных, неправильной формы семенных канальцев, нормализовало количество сперматогоний, клеток Сертоли и Лейдига, уменьшало интенсивность апоптотических и провоспалительных процессов в тестикулярных клетках, повышало количество подвижных сперматозоидов и улучшало их морфологию [53]. Одним из ключевых механизмов положительного влияния МФ на функции сперматозоидов, как полагают, является его способность стимулировать AMPK в тестикулярной ткани. Фармакологическое подавление активности AMPK резко снижало долю сперматозоидов с прямолинейным направленным движением и скорость их движения [57].

Четырехнедельное лечение самцов крыс линии Sprague–Dawley с СД2 МФ в сравнительно высокой дозе (300 мг/кг/сутки) повышало уровень тестостерона в крови и семенниках, нормализовало количество клеток Лейдига, улучшало морфологические показатели сперматозоидов, препятствовало ДНК-фрагментации в ядрах сперматозоидов, восстанавливало экспрессию и активность транспортного белка StAR и стероидогенных ферментов – цитохрома CYP11A1 и дегидрогеназ 3β-HSD и 17β-HSD, а также повышало активность ферментов антиоксидантной защиты, ослабляя провоспалительные и апоптотические процессы в семенниках [55, 56]. Восстанавливающий эффект на функции тестикулярных клеток и сперматогенез МФ оказывал при лечении крыс с тестикулярной ишемией/реперфузией, вызванной перекрутом и деформацией яичек [54]. В этом случае прием МФ снижал уровень малонового альдегида, маркера окислительного стресса, и ингибировал активность каспазы-3, ключевого фермента апоптоза, в семенниках крыс. При этом МФ нормализовал активность системы антиоксидантной защиты в тестикулярных клетках уже через 4 ч после ишемии/реперфузии яичек [54].

В то время как МФ оказывает положительное влияние на репродуктивные функции при лечении мужчин и экспериментальных животных с метаболическими расстройствами, при внутриутробном воздействии МФ демонстрирует ряд негативных эффектов на развитие семенников у плода. Так, введение МФ беременным самкам мышей уменьшало размеры яичек у новорожденных самцов, а во внутриутробный период снижало количество клеток Сертоли и Лейдига, прогени-

торных клеток и уровень андрогенов в семенниках плода [58]. В условиях *in vitro* при воздействии МФ на культивируемые клетки Лейдига снижалась продукция ими тестостерона и экспрессия генов стероидогенеза. Одним из факторов негативного влияния МФ на стероидогенез в культуре клеток Лейдига является накопление лактата, ведущее к лактоацидозу [58]. В свою очередь индуцированное МФ ингибирование ростовой активности тестикулярных клеток обусловлено его влиянием на клеточный цикл, о чем свидетельствуют уменьшение ФСГ-стимулированной пролиферации, повышение экспрессии и активности ингибиторов циклин-зависимой киназы (p19INK4d, p21Cip1, p27Kip1), снижение активности циклина D [59].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

МФ нормализует репродуктивные функции у женщин с СПКЯ и гестационным диабетом и у мужчин с СД2 и МС, восстанавливая процессы фолликулогенеза, оогенеза и сперматогенеза. Это обусловлено его стимулирующим влиянием на сниженную при этих заболеваниях активность AMPK в гонадах, а также активацией AMPK-независимых механизмов, в первую очередь аденилатциклазного сигнального пути, через который регулируется экспрессия большого числа генов и который вовлечен в контроль стероидогенеза, гаметогенеза, роста и дифференцировки тестикулярных и фолликулярных клеток. МФ может влиять на гонадолиберин-экспрессирующие гипоталамические нейроны, нормализуя функции гонад через центральные механизмы. Воздействие МФ на различные звенья гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси может осуществляться опосредованно, через ослабление гипергликемии и гиперинсулинемии и ассоциированных с ними окислительных и воспалительных процессов, что улучшает метаболический и гормональный статус репродуктивной системы и способствует восстановлению ее функций при СД2, МС и СПКЯ, а также вследствие нормализации интегративных связей между гипоталамическими системами, вовлеченными в центральную регуляцию репродуктивных функций [8, 47]. Доказанная роль МФ в контроле женской и мужской репродуктивной системы требует дальнейших усилий по расшифровке молекулярных механизмов его действия, которые характеризуются видовой, тканевой и клеточной специфичностью, в значительной степени зависят от метаболического статуса организма. Важно отметить, что МФ присущи и эпигенетические эффекты, поскольку имеются данные об отставленных эффектах пренатального применения МФ на транскрипционную активность генов в постнатальном периоде и взрослом состоянии [31, 60].

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом РФФИ (№ 18-515-45004 ИНД_а) и государственным заданием АААА-А18-118012290427-7.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор данной статьи сообщает об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sliwinska A., Drzewoski J.* Molecular action of metformin in hepatocytes: an updated insight. Curr. Diabetes Rev. 11(3): 175–181. 2015. https://doi.org/10.2174/1573399811666150325233108
2. *An H., He L.* Current understanding of metformin effect on the control of hyperglycemia in diabetes. J. Endocrinol. 228(3): R97–R106. 2016. https://doi.org/10.1530/JOE-15-0447
3. *Gong L., Goswami S., Giacomini K.M., Altman R.B., Klein T.E.* Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. Chemosphere. 104: 8897–8901. 2012. https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e3283559b22

4. *Shu Y., Brown C., Castro R.A., Shi R.J., Lin E.T., Owen R.P., Sheardown S.A., Yue L., Burchard E.G., Brett C.M., Giacomini K.M.* Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1, OCT1, on metformin pharmacokinetics. Clin. Pharmacol. Ther. 83(2): 273–280. 2008. https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100275
5. *Chang H.H., Hsueh Y.S., Cheng Y.W., Ou H.T., Wu M.H.* Association between Polymorphisms of OCT1 and Metabolic Response to Metformin in Women with Polycystic Ovary Syndrome. Int. J. Mol. Sci. 20(7): pii: E1720. 2019. https://doi.org/10.3390/ijms20071720
6. *Graham G.G., Punt J., Arora M., Day R.O., Doogue M.P., Duong J.K., Furlong T.J., Greenfield J.R., Greenup L.C., Kirkpatrick C.M., Ray J.E., Timmins P., Williams K.M.* Clinical pharmacokinetics of metformin. Clin. Pharmacokinet. 50(2): 81–98. 2011. https://doi.org/10.2165/11534750-000000000-00000
7. *Foretz M., Hébrard S., Leclerc J., Zarrinpashneh E., Soty M., Mithieux G., Sakamoto K., Andreelli F., Viollet B.* Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. J. Clin. Invest. 120(7): 2355–2369. 2010. https://doi.org/10.1172/JCI40671DS1
8. *Shpakov A.O., Derkach K.V.* Molecular Mechanisms of the Effects of Metformin on the Functional Activity of Brain Neurons. Neurosci. Behav. Physiol. 48(8): 969–977. 2018. https://doi.org/10.1007/s11055-018-0657-6
9. *Rena G., Hardie D.G., Pearson E.R.* The mechanisms of action of metformin. Diabetologia. 60(9): 1577–1585. 2017. https://doi.org/10.1007/s00125-017-4342-z
10. *Hardie D.G., Ross F.A., Hawley S.A.* AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 13(4): 251–262. 2012. https://doi.org/10.1038/nrm3311
11. *Meng S., Cao J., He Q., Xiong L., Chang E., Radovick S., Wondisford F.E., He L.* Metformin activates AMP-activated protein kinase by promoting formation of the alphabetagamma heterotrimeric complex. J. Biol. Chem. 290(6): 3793–3802. 2015. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.604421
12. *He L., Sabet A., Djedjos S., Miller R., Sun X.J., Hussain M.A., Radovick S., Wondisford F.E.* Metformin and Insulin Suppress Hepatic Gluconeogenesis through Phosphorylation of CREB Binding Protein. Cell. 137(4): 635–646. 2009. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.016
13. *He L., Wondisford F.E.* Metformin Action: Concentrations Matter. Cell Metab. 21(2): 159–162. 2015. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.01.003
14. *Cao J., Meng S.M., Chang E., Beckwith-Fickas K., Xiong L.S., Cole R.N., Radovick S., Wondisford F.E., He L.* Low Concentrations of Metformin Suppress Glucose Production in Hepatocytes through AMP-activated Protein Kinase (AMPK). J. Biol. Chem. 289(30): 20435–20446. 2014. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.567271
15. *Cameron A.R., Logie L., Patel K., Erhardt S., Bacon S., Middleton P., Harthill J., Forteath C., Coats J.T., Kerr C., Curry H., Stewart D., Sakamoto K., Repiščák P., Paterson M.J., Hassinen I., McDougall G., Rena G.* Metformin selectively targets redox control of complex I energy transduction. Redox Biol. 14: 187–197. 2018. https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.08.018
16. *Miller R.A., Chu Q.W., Xie J.X., Foretz M., Viollet B., Birnbaum M.J.* Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP. Nature. 494(7436): 256–260. 2013. https://doi.org/10.1038/nature11808
17. *Madiraju A.K., Erion D.M., Rahimi Y., Zhang X.-M., Braddock D.T., Albright R.A., Prigaro B.J., Wood J.L., Bhanot S., MacDonald M.J., Jurczak M.J., Camporez J.P., Lee H.Y., Cline G.W., Samuel V.T., Kibbey R.G., Shulman G.I.* Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. Nature. 510(7506): 542–546. 2014. https://doi.org/10.1038/nature13270
18. *Madiraju A.K., Qiu Y., Perry R.J., Rahimi Y., Zhang X.-M., Zhang D., Camporez J.G., Cline G.W., Butrico G.M., Kemp B.E., Casals G., Steinberg G.R., Vatner D.F., Petersen K.F., Shulman G.I.* Metformin inhibits gluconeogenesis via a redox-dependent mechanism in vivo. Nat. Med. 24(9): 1384–1394. 2018. https://doi.org/10.1038/s41591-018-0125-4
19. *Cuyàs E., Verdura S., Llorach-Pares L., Fernández-Arroyo S., Luciano-Mateo F., Cabré N., Stursa J., Werner L., Martin-Castillo B., Viollet B., Neuzil J., Joven J., Nonell-Canals A., Sanchez-Martinez M., Menendez J.A.* Metformin directly targets the H3K27me3 demethylase KDM6A/UTX. Aging Cell. 17(4): e12772. 2018. https://doi.org/10.1111/acel.12772
20. *Bauer P.V., Duca F.A., Waise T.M.Z., Rasmussen B.A., Abraham M.A., Dranse H.J., Puri A., O'Brien C.A., Lam T.K.T.* Metformin alters upper small intestinal microbiota that impact a glucose-SGLT1-sensing glucoregulatory pathway. Cell Metab. 27(1): 101–117. 2017. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.09.019
21. *Wu H., Esteve E., Tremaroli V., Khan M.T., Caesar R., Mannerås-Holm L., Ståhlman M., Olsson L.M., Serino M., Planas-Fèlix M., Xifra G., Mercader J.M., Torrents D., Burcelin R., Ricart W., Perkins R.,*

Fernàndez-Real J.M., Bäckhed F. Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naive type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug. Nat. Med. 23(7): 850–858. 2017.
https://doi.org/10.1038/nm.4345

22. *Shin N.R., Lee J.C., Lee H.Y., Kim M.S., Whon T.W., Lee M.S., Bae J.W.* An increase in the Akkermansia spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. Gut. 63(5): 727–735. 2014.
https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303839
23. *Duca F.A., Cote C.D., Rasmussen B.A., Zadeh-Tahmasebi M., Rutter G.A., Filippi B.M., Lam T.K.* Metformin activates a duodenal Ampk-dependent pathway to lower hepatic glucose production in rats. Nat. Med. 21(5): 506–511. 2015.
https://doi.org/10.1038/nm.3787
24. *Huang N.L., Chiang S.H., Hsueh C.H., Liang Y.J., Chen Y.J., Lai L.P.* Metformin inhibits TNF-alpha-induced I kappa B kinase phosphorylation, I kappa B-alpha degradation and IL-6 production in endothelial cells through PI3K-dependent AMPK phosphorylation. Int. J. Cardiol. 134(2): 169–175. 2009.
https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2008.04.010
25. *Cimino I., Casoni F., Liu X., Messina A., Parkash J., Jamin S.P., Catteau-Jonard S., Collier F., Baroncini M., Dewailly D., Pigny P., Prescott M., Campbell R., Herbison A.E., Prevot V., Giacobini P.* Novel role for anti-mullerian hormone in the regulation of GnRH neuron excitability and hormone secretion. Nat. Commun. 7: 1–12. 2016.
https://doi.org/10.1038/ncomms10055
26. *Sivalingam V.N., Myers J., Nicholas S., Balen A.H., Crosbie E.J.* Metformin in reproductive health, pregnancy and gynaecological cancer: established and emerging indications. Hum. Reprod. Update. 20(6): 853–868. 2014.
https://doi.org/10.1093/humupd/dmu037
27. *Martis R., Crowther C.A., Shepherd E., Alsweiler J., Downie M.R., Brown J.* Treatments for women with gestational diabetes mellitus: an overview of Cochrane systematic reviews. Cochrane Database Syst. Rev. 8: CD012327. 2018.
https://doi.org/10.1002/14651858.CD012327.pub2
28. *Tang T., Lord J., Norman R., Yasmin E., Balen A.* Insulin-sensitising drugs (metformin, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) forwomenwith polycystic ovary syndrome, oligo amenorrhoea and subfertility. Cochrane Database Syst. Rev. 5–7: CD003053. 2012.
https://doi.org/10.1002/14651858.CD003053.pub5
29. *Yu Y., Fang L., Zhang R., He J., Xiong Y., Guo X., Du Q., Huang Y., Sun Y.* Comparative effectiveness of 9 ovulation-induction therapies in patients with clomiphene citrate-resistant polycystic ovary syndrome: a network meta-analysis. Sci. Rep. 7(1): 1–12. 2017.
https://doi.org/10.1038/s41598-017-03803-9
30. *Palomba S., Falbo A., La Sala G.B.* Metformin and gonadotropins for ovulation induction in patients with polycystic ovary syndrome: a systematic review with meta-analysis of randomized controlled trials. Reprod. Biol. Endocrinol. 12: 3. 2014.
https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-3
31. *Faure M., Bertoldo M.J., Khoueiry R., Bongrani A., Brion F., Giulivi C., Dupont J., Froment P.* Metformin in Reproductive Biology. Front Endocrinol. (Lausanne). 9: 675. 2018.
https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00675
32. *Kalem M.N., Kalem Z., Gurgan T.* Effect of metformin and oral contraceptives on polycystic ovary syndrome and IVF cycles. J. Endocrinol. Invest. 40(7): 745–752. 2017.
https://doi.org/10.1007/s40618-017-0634-x
33. *Barbieri R.L., Makris A., Randall R.W., Daniels G., Kistner R.W., Ryan K.J.* Insulin stimulates androgen accumulation in incubations of ovarian stroma obtained from women with hyperandrogenism. J. Clin. Endocrinol. Metab. 62(5): 904–910. 1986.
https://doi.org/10.1210/jcem-62-5-904
34. *Stepto N.K., Cassar S., Joham A.E., Hutchison S.K., Harrison C.L., Goldstein R.F., Teede H.J.* Women with polycystic ovary syndrome have intrinsic insulin resistance on euglycaemic-hyperinsulaemic clamp. Hum. Reprod. 28(3): 777–784. 2013.
https://doi.org/10.1093/humrep/des463
35. *Adashi E.Y., Resnick C.E., D'Ercole A.J., Svoboda M.E., Van Wyk J.J.* Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. Endocr. Rev. 6: 400–420. 1985.
https://doi.org/10.1210/edrv-6-3-400
36. *Nestler J.E., Powers L.P., Matt D.W.* A direct effect of hyperinsulinemia on serum sex hormone-binding globulin levels in obese women with the polycystic ovary syndrome. J. Clin. Endocrinol. Metab. 72(1): 83–89. 1991.
https://doi.org/10.1210/jcem-72-1-83
37. *Huang Y., Yu Y., Gao J., Li R., Zhang C.* Impaired oocyte quality induced by dehydroepiandrosterone is partially rescued by metformin treatment. PLoS One. 10:e 0122370. 2015.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122370

38. *Attia G.R., Rainey W.E., Carr B.R.* Metformin directly inhibits androgen production in human thecal cells. Fertil. Steril. 76(3): 517–524. 2001. https://doi.org/10.1016/S0015-0282(01)01975-6
39. *Bertoldo M.J., Guibert E., Faure M., Ramé C., Foretz M., Viollet B., Dupont J., Froment P.* Specific deletion of AMP-activated protein kinase (α1AMPK) in murine oocytes alters junctional protein expression and mitochondrial physiology. PLoS ONE. 10(3):e0119680. 2015. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119680
40. *Rice S., Elia A., Jawad Z., Pellatt L., Mason H.D.* Metformin inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action in human granulosa cells: relevance to polycystic ovary syndrome. J. Clin. Endocrinol. Metab. 98(9): E1491–E500. 2013. https://doi.org/10.1210/jc.2013-1865
41. *Fuhrmeister I., Branchini G., Pimentel A., Ferreira G., Capp E., Brum I., von Eye Corleta H.* Human granulosa cells: insulin and insulin-like growth factor-1 receptors and aromatase expression modulation by metformin. Gynecol. Obs. Invest. 77: 156–162. 2014. https://doi.org/10.1159/000358829
42. *Catteau-Jonard S., Jamin S.P., Leclerc A., Gonzalès J., Dewailly D., di Clemente N.* Anti-Mullerian hormone, its receptor, FSH receptor, and androgen receptor genes are overexpressed by granulosa cells from stimulated follicles in women with polycystic ovary syndrome. J. Clin. Endocrinol. Metab. 93(11): 4456–4461. 2008. https://doi.org/10.1210/jc.2008-1231
43. *Willis D.S., Watson H., Mason H.D., Galea R., Brincat M., Franks S.* Premature response to luteinizing hormone of granulosa cells from anovulatory women with polycystic ovary syndrome: relevance to mechanism of anovulation. J. Clin. Endocrinol. Metab. 83(11): 3984–3991. 1998. https://doi.org/10.1210/jcem.83.11.5232
44. *Morin-Papunen L., Rantala A.S., Unkila-Kallio L., Tiitinen A., Hippeläinen M., Perheentupa A., Tinkanen H., Bloigu R., Puukka K., Ruokonen A., Tapanainen J.S.* Metformin improves pregnancy and live-birth rates in women with polycystic ovary syndrome (PCOS): a multicenter, double-blind, placebo-controlled randomized trial. J. Clin. Endocrinol. Metab. 97(5): 1492–1500. 2012. https://doi.org/10.1210/jc.2011-3061
45. *Dupont C., Faure C., Sermondade N., Boubaya M., Eustache F., Clément P., Briot P., Berthaut I., Levy V., Cedrin-Durnerin I., Benzacken B., Chavatte-Palmer P., Levy R.* Obesity leads to higher risk of sperm DNA damage in infertile patients. Asian J. Androl. 15(5): 622–625. 2013. https://doi.org/10.1038/aja.2013.65
46. *Morgante G., Tosti C., Orvieto R., Musacchio M.C., Piomboni P., De Leo V.* Metformin improves semen characteristics of oligo-terato-asthenozoospermic men with metabolic syndrome. Fertil Steril. 95: 2150–2152. 2011. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.12.009
47. *Derkach K., Zakharova I., Zorina I., Bakhtyukov A., Romanova I., Bayunova L., Shpakov A.* The evidence of metabolic-improving effect of metformin in Ay/a mice with genetically-induced melanocortin obesity and the contribution of hypothalamic mechanisms to this effect. PLoS ONE. 14(3): e0213779. 2019. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213779
48. *Mathew H., Castracane V.D., Mantzoros C.* Adipose tissue and reproductive health. Metabolism. 86: 18–32. 2018. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.11.006
49. *Shpakov A.O., Ryzhov J.R., Bakhtyukov A.A., Derkach K.V.* The regulation of the male hypothalamic-pituitary-gonadal axis and testosterone production by adipokines. In: Advances in Testosterone Action (Ed by M. Estrada). Intech Open Access Publisher, Rijeka, Croatia. 25–57. 2018. https://doi.org/10.5772/intechopen.76321
50. *Бахтюков А.А., Шпаков А.О.* Молекулярные механизмы действия лептина на гипоталамо-гипофизарно-гонадную ось. Цитология. 60(10): 755–767. 2018. [*Bakhtyukov A.A., Shpakov A.O.* Molecular mechanisms of leptin action on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. Tsitologiia. 60(10): 755–767. 2018.(In Russ)]. https://doi.org/10.7868/S0041377118100016
51. *Attia S.M., Helal G.K., Alhaider A.A.* Assessment of genomic instability in normal and diabetic rats treated with metformin. Chem. Biol. Interact. 180: 296-304. 2009. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.03.001
52. *Rabbani S.I., Devi K., Khanam S.* Role of pioglitazone with metformin or glimepiride on oxidative stress-induced nuclear damage and reproductive toxicity in diabetic rats. Malays J. Med. Sci. 17: 3–11. 2010.
53. *Yan W.J., Mu Y., Yu N., Yi T.L., Zhang Y., Pang X.L., Cheng D., Yang J.* Protective effects of metformin on reproductive function in obese male rats induced by high-fat diet. J. Assist. Reprod. Genet. 32(7): 1097–1104. 2015. https://doi.org/10.1007/s10815-015-0506-2
54. *Ghasemnejad-Berenji M., Ghazi-Khansari M., Yazdani I., Nobakht M., Abdollahi A., Ghasemnejad-Berenji H., Mohajer Ansari J., Pashapour S., Dehpour A.R.* Effect of metformin on germ cell-specific apoptosis, oxidative stress and epididymal sperm quality after testicular torsion/detor-

sion in rats. Andrologia. 50(2). 2018.
https://doi.org/10.1111/and.12846
55. *Nna V.U., Bakar A.B.A., Ahmad A., Mohamed M.* Diabetes-induced testicular oxidative stress, inflammation, and caspase-dependent apoptosis: the protective role of metformin. Arch. Physiol. Biochem. 4: 1–12. 2018.
https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1543329
56. *Nna V.U., Bakar A.B.A., Ahmad A., Mohamed M.* Down-regulation of steroidogenesis-related genes and its accompanying fertility decline in streptozotocin-induced diabetic male rats: ameliorative effect of metformin. Andrology. 7(1): 110–123. 2019.
https://doi.org/10.1111/andr.12567
57. *Hurtado de Llera A., Martin-Hidalgo D., Gil M.C., Garcia-Marin L.J., Bragado M.J.* AMP-activated kinase AMPK is expressed in boar spermatozoa and regulates motility. PLoS ONE. 7: e38840. 2012.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038840
58. *Tartarin P., Moison D., Guibert E., Dupont J., Habert R., Rouiller-Fabre V., Frydman N., Pozzi S., Frydman R., Lecureuil C., Froment P.* Metformin exposure affects human and mouse fetal testicular cells. Hum. Reprod. 27: 3304–3314. 2012.
https://doi.org/10.1093/humrep/des264
59. *Riera M.F., Regueira M., Galardo M.N., Pellizzari E.H., Meroni S.B., Cigorraga S.B.* Signal transduction pathways in FSH regulation of rat Sertoli cell proliferation. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 302(8): E914-E923. 2012.
https://doi.org/10.1152/ajpendo.00477.2011
60. *Bridgeman S.C., Ellison G.C., Melton P.E., Newsholme P., Mamotte C.D.S.* Epigenetic effects of metformin: from molecular mechanisms to clinical implications. Diabetes Obes Metab. 20(7): 1553–1562. 2018.
https://doi.org/10.1111/dom.13262

The Molecular Basis of Metformin Effect on the Reproductive System

A. O. Shpakov*

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

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

The action of metformin (MF), which is widely used to treat type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome, is based on the normalization of insulin sensitivity and the lipid and carbohydrate metabolism. In the recent years, the experimental and clinical data have appeared that MF normalizes the functions of all components of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis impaired in the metabolic disorders, enhancing the production of gonadoliberin, the hypothalamic regulator of this axis, and also restoring the steroidogenic activity of the gonads and normalizing the processes of spermatogenesis, folliculogenesis and oogenesis. The use of MF in polycystic ovary syndrome and other reproductive dysfunctions associated with metabolic disorders prevents fertility decline and increases the effectiveness of assisted reproductive technologies. The review is devoted to modern achievements in the study of the mechanisms of MF action of and its use to restore the functions of the female and male reproductive systems in the metabolic diseases and other pathology.

Keywords: metformin, AMP-activated protein kinase, mitochondrial complex I, reproductive system, diabetes mellitus, steroidogenesis, polycystic ovary syndrome

ЦИТИРОВАТЬ:

Шпаков А.О. Молекулярные основы влияния метформина на репродуктивную систему. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 106(5): 811–822.

DOI: 10.31857/S086981392005009X

TO CITE THIS ARTICLE:

Shpakov A.O. The Molecular Basis of Metformin Effect on the Reproductive System. Russian Journal of Physiology. 106(5): 811–822.

DOI: 10.31857/S086981392005009X

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 7, с. 823–842

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ВЛИЯНИЕ РАННЕГО ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА ТРЕВОЖНОЕ И ДЕПРЕССИВНО-ПОДОБНОЕ ПОВЕДЕНИЕ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

© 2020 г. Н. Д. Брошевицкая[1], И. В. Павлова[1, *], М. И. Зайченко[1], В. А. Груздева[1], Г. А. Григорьян[1]

[1]Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия
**E-mail: pavlovfml@mail.ru*

Поступила в редакцию 03.12.2019 г.
После доработки 23.01.2020 г.
Принята к публикации 17.03.2020 г.

Ранний провоспалительный стресс, создаваемый путем введения липополисахарида (ЛПС) (50 мкг/кг, п/к) на 3-и и 5-е постнатальные дни, приводил к снижению двигательной активности, уменьшению исследовательского поведения и увеличению тревожности у крыс в подростковом возрасте (1–1.5 мес.) в тестах открытого поля и приподнятого крестообразного лабиринта. Наибольшие изменения в тревожном поведении происходили у самцов по сравнению с самками. Введение ЛПС в раннем онтогенезе вызывало в подростковом возрасте появление признаков депрессивно-подобного поведения как у самцов, так и у самок, которое проявлялось в тесте на ангедонию в уменьшении предпочтения 1%-ного раствора сахарозы по сравнению с контрольными группами. Тест вынужденного плавания выявил признаки депрессивно-подобного поведения у самцов, но не у самок только при первом тестировании. У взрослых крыс (3–3.5 мес.) после усиленного хэндлинга и выработки пищедобывательных рефлексов указанные изменения в тревожном и депрессивно-подобном поведении практически исчезали. Введение ЛПС в раннем возрасте приводило у взрослых самцов к увеличению уровня IL-1β в сыворотке крови после повторных стрессовых воздействий, а у самок – к возрастанию содержания кортикостерона по сравнению с контрольными животными. Полученные результаты свидетельствуют об увеличении признаков тревожно-депрессивного поведения крыс под влиянием раннего провоспалительного стресса и наличие половых различий, а также возможности коррекции негативных последствий стресса в дальнейшей жизни.

Ключевые слова: ранний провоспалительный стресс, открытое поле, приподнятый крестообразный лабиринт, тест на ангедонию, тест вынужденного плавания, липополисахарид, кортикостерон, ИЛ-1β

DOI: 10.31857/S0869813920060035

Известно, что стрессирующие воздействия в раннем онтогенезе создают предрасположенность к развитию ряда соматических и психоневрологических заболеваний у человека, таких как депрессия, тревожные расстройства, посттравматические стрессовые расстройства и другие [1, 2]. Выявлены существенные половые различия в частоте проявления данных заболеваний, женщины страдают депрессией и тревожными расстройствами значительно чаще, чем мужчины [3–5]. В экспериментах на животных было показано, что временное отлучение от матери [6–8], провоспалительный стресс [9–12], болевые воздействия [13] и плохие условия содержания [14] в раннем возрасте оказывают негативное влияние на дальнейшее

развитие организма. В настоящее время в качестве раннего стрессирующего воздействия достаточно широко используют модель провоспалительного стресса, создаваемого путем введения бактериального липополисахарида (ЛПС) крысятам в разные дни постнатального развития [см. обзор 15]. Липополисахариды являются составными компонентами внешней части мембраны грамотрицательных бактерий. Первичными клетками-мишенями для ЛПС являются фагоциты, которые экспрессируют связанный с мембраной антиген CD14 (mCD14) и толл-4 рецепторы. Протеин, связывающий ЛПС, катализирует переход мономерного ЛПС из агрегатных комплексов к связывающему рецептору CD14 (mCD14) на поверхности фагоцитов, это приводит к высвобождению большого числа эндогенных провоспалительных медиаторов (цитокины, хемокины и др.) через TLR4*MD-2 комплекс [16].

Введение ЛПС вызывает болезненное состояние (sickness behavior), длящееся несколько дней и проявляющееся в изменении температуры тела, малой подвижности, снижении аппетита, скученности животных и т.д. [17]. В литературе имеется немало сведений о том, то введение ЛПС в раннем онтогенезе оказывает влияние на проявления тревожного и депрессивно-подобного поведения, а также изменения устойчивости к повторным стрессам у взрослых крыс [см. обзор 18]. Так, например, было показано, что введение ЛПС в раннем возрасте приводит к увеличению тревожности и уменьшению социальных взаимодействий у взрослых крыс, усилению депрессивно-подобного поведения [10, 11, 19]. Увеличение тревожности проявлялось после дополнительных стрессирующих воздействий на взрослое животное [12]. Вместе с тем имеются данные, что инфекции в раннем возрасте могут защищать от стрессов во взрослой жизни [20] и приводить к снижению уровня тревожности [21]. Влияние раннего введения ЛПС различалось у линий высоко- и низкотревожных животных [22]. Введение эндотоксина сальмонеллы на 3-й и 5-й постнатальные дни приводило к увеличению реактивности гипоталамо-гипофизарной надпочечниковой системы (ГГНС) на стресс и уменьшению негативной обратной связи на синтез АКТГ [23]. Хотя имеется много данных о том, что введение ЛПС в раннем возрасте приводит к тревожному и депрессивно-подобному поведению у взрослых животных, пока что мало известно о половых различиях во влияниях ЛПС на такое поведение [15]. На этот счет имеется всего лишь несколько работ [10, 12, 21, 24, 26], результаты которых оказались неоднозначными и даже противоречивыми. Например, в одних случаях реактивность на ранний провоспалительный стресс была больше выражена у самцов [10, 12], а в других – у самок [21, 26]. Более отчетливые половые различия в действии ЛПС наблюдались при введении препарата взрослым животным непосредственно за 24 ч перед тестированием, причем у самцов признаки депрессивно-подобного поведения проявлялись сильнее, чем у самок [25, 27, 28]. Существенные половые различия были обнаружены во влиянии раннего провоспалительного стресса на оборонительное поведение [9]. Введение ЛПС на 3-й и 5-й дни от рождения приводило у взрослых самцов к большему проявлению условно-рефлекторного страха и затруднениям в его угашении при пассивных оборонительных рефлексах, но затрудняло приобретение активных оборонительных рефлексов. В целом, по характеристикам оборонительного поведения взрослых животных самки были более устойчивы к раннему провоспалительному стрессу, чем самцы.

Целью настоящей работы было изучение влияния раннего провоспалительного стресса на проявления тревожного и депрессивно-подобного поведения у самцов и самок крыс линии Вистар в подростковом (1–1.5 мес.) и взрослом возрасте (3–3.5 мес.). Ранний провоспалительный стресс создавали путем введения крысятам бактериального ЛПС на 3-й и 5-й дни постнатальной жизни. В задачи работы входило изучение влияния раннего введения ЛПС на уровень тревожности у крыс обоих полов в тестах открытого поля и приподнятого крестообразного лабиринта, а также на

уровень депрессивно-подобного поведения в тестах на предпочтение сахарозы и вынужденного плавания. Кроме того, в задачи работы входила оценка влияния раннего стресса на состояние гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси и системы провоспалительных цитокинов. Для этого с помощью иммуноферментного анализа определяли уровень стресс-гормона кортикостерона и цитокина IL-1β в сыворотке крови взрослых крыс. Поскольку в литературе имеются данные о том, что хендлинг (приручение), обогащенная среда, двигательная активность оказывает антистрессовое влияние [36, 38, 39], также исследовали возможность коррекции последствий раннего провоспалительного стресса на будущее поведение с помощью усиленного хэндлинга и выработки пищедобывательных рефлексов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. В опытах участвовало 126 крыс линии Вистар в возрасте от 25 дней до 3.5 мес. (64 самца и 62 самки). Крысята (16 пометов) были выведены в виварии ИВНД и НФ от родителей, полученных из филиала "Столбовая" ФГБУН НЦБМТ ФМБА, Россия. На 3-й и 5-й дни жизни у 37 крысят (6 пометов) вызывали провоспалительный стресс путем введения ЛПС *Echerichia coli* (серотип O26:B6, Sigma) в дозе 50 мкг/кг в объеме 10 мкл/г (группа ЛПС). Во время этой процедуры крысята отлучались от матери на 15-20 мин. Животные взвешивались на электронных весах с точностью до 0.01 г и получали подкожную инъекцию ЛПС в холку с помощью инсулинового шприца. 49 крысятам (5 пометов) в этом же возрасте подкожно вводили физиологический раствор в объеме 10 мкл/г (группа ФИЗ, контроль 1). 40 крысят (5 пометов) оставались интактными, но на 3-й и 5-й дни жизни их также забирали от матери на 15–20 мин и взвешивали (группа ИНТ, контроль 2). В возрасте 25-ти дней крысят отлучали от матери и разделяли на подгруппы в зависимости от пола. В дальнейшем животных содержали в виварии при обычном 12-часовом световом режиме в свободном доступе к воде и стандартному корму в клетках по 3–5 крыс, в одной клетке находились крысы одного пола и, как правило, из одного помета. Дополнительное взвешивание крыс проводилось в 1 и 3 мес. перед тестами на тревожность. С 1.5 до 3 мес. крысы участвовали в экспериментах с выработкой пищевых условных рефлексов, во время которых они подвергались многодневному хэндлингу. Стадия эстрального цикла у самок не контролировалась.

В экспериментах соблюдали принципы гуманности, изложенные в директивах Европейского Сообщества (2010/63/EU) и положения ИВНД и НФ РАН о работе с экспериментальными животными.

Тестирование уровня тревожности. В работе изучали поведение 51 крысы в двух тестах на тревожность: в открытом поле (ОП) и в приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ). Перед первым тестированием для снижения стрессирующей нагрузки на животных проводился 15-ти минутный хэндлинг (приручение) в течение 4–5 дней, при этом животных брали в руки, пересаживали из домашней клетки в переноску и обратно. Первый раз крыс тестировали в возрасте 30–35 дней (подростковый возраст), второй раз – в возрасте 90–95 дней (взрослые). Использовали общепринятые размеры и конфигурации лабиринта и ОП, которые были подробно описаны ранее [29]. Время наблюдения в каждом тесте составляло 5 мин. Для фиксирования траектории движения крыс и элементов поведения использовали программу Etho Vision, а также видеорегистрацию. Анализировали показатели, отражающие тревожность/смелость крыс (время нахождения на периферии ОП, число и длительность выходов в центр ОП, в открытые рукава ПКЛ), двигательную активность крыс (пройденную дистанцию, скорость движения, время движения, число переходов между рукавами в ПКЛ), исследовательское поведение (стойки, выглядывания в открытые рукава в ПКЛ), поведение по оценке риска (свешивания

в ПКЛ, вытягивания), элементы замещающего поведения (число и длительность груминга), а также ряд показателей, отражающих вегетативные реакции (число дефекаций и мочеиспусканий). Всегда вначале тестировали крысу в ОП, через 2–3 дня в ПКЛ. Перед помещением в камеру животного другого пола кроме обычной влажной и сухой уборки лабиринт протирали 20%-ным раствором этилового спирта. Для переноски самцов и самок из вивария в экспериментальную комнату и для ожидания своей очереди использовали разные клетки.

Тест на предпочтение сахарозы. Для оценки депрессивно-подобного поведения проводили тест на предпочтение сахарозы у 72 крыс в возрасте 35–40 дней и 95–100 дней. Тест проводили в течение одних или двух суток. В клетку помещали 2 бутылки, одну – с 1%-ным раствором сахарозы, другую с водой. Два раза в сутки (утром и вечером) бутылки взвешивали и меняли местами. Определяли объем выпитого раствора сахарозы и воды за сутки каждой крысой, а также процент выпитой сахарозы от общего объема потребленной жидкости.

Тест вынужденного плавания проводили в цилиндрах из оргстекла диаметром 20 и высотой 50 см, которые заполняли водой температурой 25–26°C до уровня 30 см. В возрасте 40–45 дней в первый день крыс помещали в воду на 15 мин (обучение, выработка поведенческого отчаяния), во второй день животные находились в воде 5 мин (тест). Время тестирования в 100–105 дней составляло 5 мин. При зависании (неподвижности) крысы осуществляли лишь слабые движения лапами и хвостом для коррекции положения тела около поверхности воды. Во время опыта проводили видеорегистрацию. При обработке данных подсчитывали время зависания крыс поминутно и суммарно за весь опыт, латентность первого зависания, число эпизодов зависания и среднюю длительность таких эпизодов за опыт.

Иммуноферментный анализ крови. Перед забором крови в возрасте 6 мес. проводили дополнительное стрессирование крыс в тесте вынужденного плавания. Крысы находились в воде 5 мин. Через 20–30 мин после окончания теста крыс умерщвляли декапитацией и собирали периферическую кровь, которую центрифугировали 15 мин при 4°C и 1500 *g* для получения сыворотки. Аликвоты сыворотки хранили при –80°C до проведения иммуноферментного анализа.

Для определения уровня кортикостерона в сыворотке крови использовали наборы для иммуноферментного анализа (DRG, Германия), с помощью которых детектировали как свободный, так и связанный с транспортными белками кортикостерон методом конкурентного иммуноферментного анализа. Содержание провоспалительного интерлейкина-1β в сыворотке крови определяли с помощью наборов производства R&D Systems (США) согласно инструкции производителя. Измерение проводили на спектрофотометре Hidex 425-301 (Финляндия).

Статистическая обработка результатов. Для обработки результатов использовали стандартную программу STATISTICA 8.0. Распределение исследованных параметров было проверено на нормальность по критерию Колмогорова–Смирнова (Basic Statistics, раздел Descriptive Statistics). Если анализируемый параметр удовлетворял данному критерию, то при сравнении групп крыс использовали дисперсионный анализ ANOVA, раздел factorial ANOVA. При post-hoc анализе применяли критерий Newman–Keuls. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$, отмечали наличие тенденции при $0.05 < p < 0.1$. Во всех экспериментах анализировали влияние факторов “ПОЛ”, “ГРУППА” и “ВОЗРАСТ” крыс. При отсутствии нормальности распределения поведенческих параметров для выявления межгрупповых различий использовали Kruskal–Wallis ANOVA, затем при попарном сравнении группы ЛПС с контрольными группами применяли Mann–Whitney U тест (Nonparametric Statistics) с поправкой Бонферрони на множественные сравнения (различия считали статистически значимыми при $p < 0.05 : 3 = 0.017$). Данные на рисунках и в таблицах представлены в виде средних значений ± ошибки средних.

Таблица 1. Масса крысят разных групп в возрасте 3 дня (до введения ЛПС), 5 дней (перед вторым введением), в 1 и 3 мес.
Table 1. The weight of rats of different groups at the age of 3 days (before LPS injection), 5 days (before the second injection), at the age of 1 and 3 month

Возраст Age	Группа крыс Group of rats	Масса самцов, г Male weight, g	Масса самок, г Female weight, g
3 дня 3 days	ИНТ NAIVE	7.3 ± 0.6	6.9 ± 0.4
	ФИЗ SALINE	7.8 ± 0.3	7.8 ± 0.3
	ЛПС LPS	7.8 ± 0.3	7.5 ± 0.3
5 дней 5 days	ИНТ NAIVE	11.8 ± 0.8	11.0 ± 0.7
	ФИЗ SALINE	10.7 ± 0.3	10.2 ± 0.3
	ЛПС LPS	10.4 ± 0.3	10.3 ± 0.4
1 мес 1 month	ИНТ NAIVE	79.5 ± 2.8*	76.6 ± 2.6
	ФИЗ SALINE	72.6 ± 2.2*	72.0 ± 2.5
	ЛПС LPS	80.0 ± 2.4	73.4 ± 2.3
3 мес 3 months	ИНТ NAIVE	302.2 ± 8.0$^{\$}$	227.1 ± 7.4$^{\$}$
	ФИЗ SALINE	323.6 ± 6.0$^{\$}$	230.5 ± 7.1$^{\$}$
	ЛПС LPS	317.6 ± 6.7$^{\$}$	220.0 ± 6.7$^{\$}$

* – статистически значимые различия между группами крыс в одном возрасте ($p < 0.017$, Mann–Whitney U Test). $^{\$}$ – различия между самцами и самками внутри группы.
* – the significant differences between the rat's groups at the same age ($p < 0.017$, Mann–Whitney U Test). $^{\$}$ – the differences between males and females within the group.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние раннего провоспалительного стресса на массу крыс. Масса тела крыс в группе ЛПС не отличалася от групп ИНТ или ФИЗ в возрасте 3 дней (до первого введения ЛПС), 5 дней (перед вторым введением), в 1 и 3 мес. перед началом тестирования на тревожность (табл. 1). Введение ЛПС или физиологического раствора вызывало небольшое замедление прироста массы. Прибавка массы тела у крысят группы ЛПС в 5 дней по сравнению с 3-м днем составляла 2.6–2.8 г, группы ФИЗ – 2.4–2.9 г, в то время как в группе ИНТ 4.1–4.5 г. Однако из-за большого разброса массы крысят в 3 дня влияние болевого воздействия и воспаления не сказалось на средних значения массы тела в группах. В возрасте 3 месяцев проявились половые различия в массе тела животных, самцы весили значительно больше самок.

Влияние раннего провоспалительного стресса на поведение крыс в приподнятом крестообразном лабиринте. Необходимо отметить, что только некоторые из анализируемых показателей поведения имели нормальное распределение, результаты их анализа с помощью Factorial ANOVA представлены в табл. 2. Видно, что факторы ГРУППА крыс и ВОЗРАСТ оказывали влияние на показатели двигательной активности (пройденную дистанцию, скорость и время движения, число переходов через центр) и исследовательской активности (выглядывания в открытые рукава), а также наблюдалось взаимодействие этих факторов. Post-hoc анализ показал, что межгрупповые различия наблюдались только в подростковом возрасте, но не у взрослых крыс. В возрасте 1 мес. у всех крыс группы ЛПС по сравнению с группами ФИЗ и ИНТ была меньше ($p < 0.05$) пройденная дистанция, скорость, время движения (рис. 1*C*), число переходов через центр (рис. 1*B*), процент времени выходов в открытые рукава ПКЛ (рис. 1*A*), выглядываний в открытые рукава (рис. 1*D*). Сопоставление самцов и самок показало, что у самцов изменения были более выраженные, только у самцов наблюдались значимые межгрупповые различия по времени движения, числу переходов через центр, числу выглядываний (рис. 1*B–D*).

Таблица 2. Значения F и *p* при анализе с помощью Factorial ANOVA некоторых показателей поведения крыс в ПКЛ и ОП
Table 2. The F and *p* values at the analysis by Factorial ANOVA of some parameters of rat's behavior in the elevated plus maze (EPM) and open field (OF)

Тест Test	Показатель поведения Behavioral parameter	Фактор Factor				
		ВОЗРАСТ AGE	ГРУППА GROUP	ВОЗРАСТ/ ГРУППА AGE/GROUP	ПОЛ SEX	ВОЗРАСТ/ ПОЛ/ ГРУППА AGE/SEX/ GROUP
ПКЛ EPM	% *t* выхода в ОР %*t* in open arms	–*	–	–	–	–
	Дистанция Distance	$F_{1,87} = 4.94$ $p = 0.029$	$F_{2,87} = 7.65$ $p = 0.001$	$F_{2,87} = 4.17$ $p = 0.019$	–	–
	Скорость Velocity	$F_{1,87} = 5.3$ $p = 0.024$	$F_{2,87} = 7.59$ $p = 0.001$	$F_{2,87} = 4.13$ $p = 0.019$	–	–
	t движения, % Movement time, %	$F_{1,87} = 12.74$ $p = 0.001$	$F_{2,87} = 8.42$ $p = 0.000$	$F_{2,87} = 3.94$ $p = 0.023$	–	–
	Число переходов через центр Transitions hrough the center	$F_{1,87} = 3.82$ $p = 0.054$	$F_{2,87} = 10.41$ $p = 0.000$	–	–	–
	Свешивания Head dipping	–	–	$F_{2,87} = 3.88$ $p = 0.024$	$F_{1,87} = 4.43$ $p = 0.038$	–
	Выглядывания Looking out	$F_{1,87} = 10.44$ $p = 0.002$	F2,87 = 5.92 $p = 0.004$	F2,87 = 3.07 $p = 0.051$	–	–
ОП OF	Дистанция Distance	$F_{1,87} = 41.5$ $p = 0.000$	$F_{2,88} = 5.47$ $p = 0.006$	$F_{2,88} = 3.05$ $p = 0.052$	–	–
	Скорость Velocity	$F_{1,87} = 41.18$ $p = 0.000$	$F_{2,88} = 5.03$ $p = 0.009$	$F_{2,88} = 3.00$ $p = 0.055$	–	–
	t движения, % Movement time, %	$F_{1,87} = 30.65$ $p = 0.000$	$F_{2,88} = 3.99$ $p = 0.022$	$F_{2,88} = 2.71$ $p = 0.072$	–	–
	Стойки Rearing	$F_{1,87} = 20.51$ $p = 0.000$	–	–	–	–

* – прочерк свидетельствует о статистически незначимом влиянии фактора.
* – a dash means the non-significant influence of Factor.

Рис. 1. Влияние раннего провоспалительного стресса на поведение крыс в приподнятом крестообразном лабиринте в подростковом и взрослом возрасте. По горизонтали – пол крыс, по вертикали – значения различных показателей поведения. Naive – группа интактных крыс, Saline – группа с введением физиологического раствора в раннем онтогенезе, LPS – группа с введением LPS. *n* – число крыс в группе (самцы/самки). ОР – открытые рукава лабиринта, *t* – время. @ – статистически значимые различия между группой LPS и группой ИНТ, $ – между группой LPS и Saline ($p < 0.05$, post-hoc анализ Factorial ANOVA). Group – значимое влияние фактора Group на крыс в подростковом возрасте.

Fig. 1. The influence of an early proinflammatory stress on rat's behavior in an elevated plus maze at the adolescent and adult age. On horizontal line – the sex of rats, on vertical line – the values of different parameters of behavior. Naive – naive rats, Saline – a group of rats that received an injection of saline in early ontogenesis, LPS – a group of rats that received and injection of LPS. *n* – a number of rats in each group (males/females). OP – the open arms of a maze, *t* – time. $ – the significant difference between LPS and Saline groups, @ – between LPS and Saline groups ($p < 0.05$, post-hoc analysis Factorial ANOVA). Group – significant influence of factor group on adolescent rats.

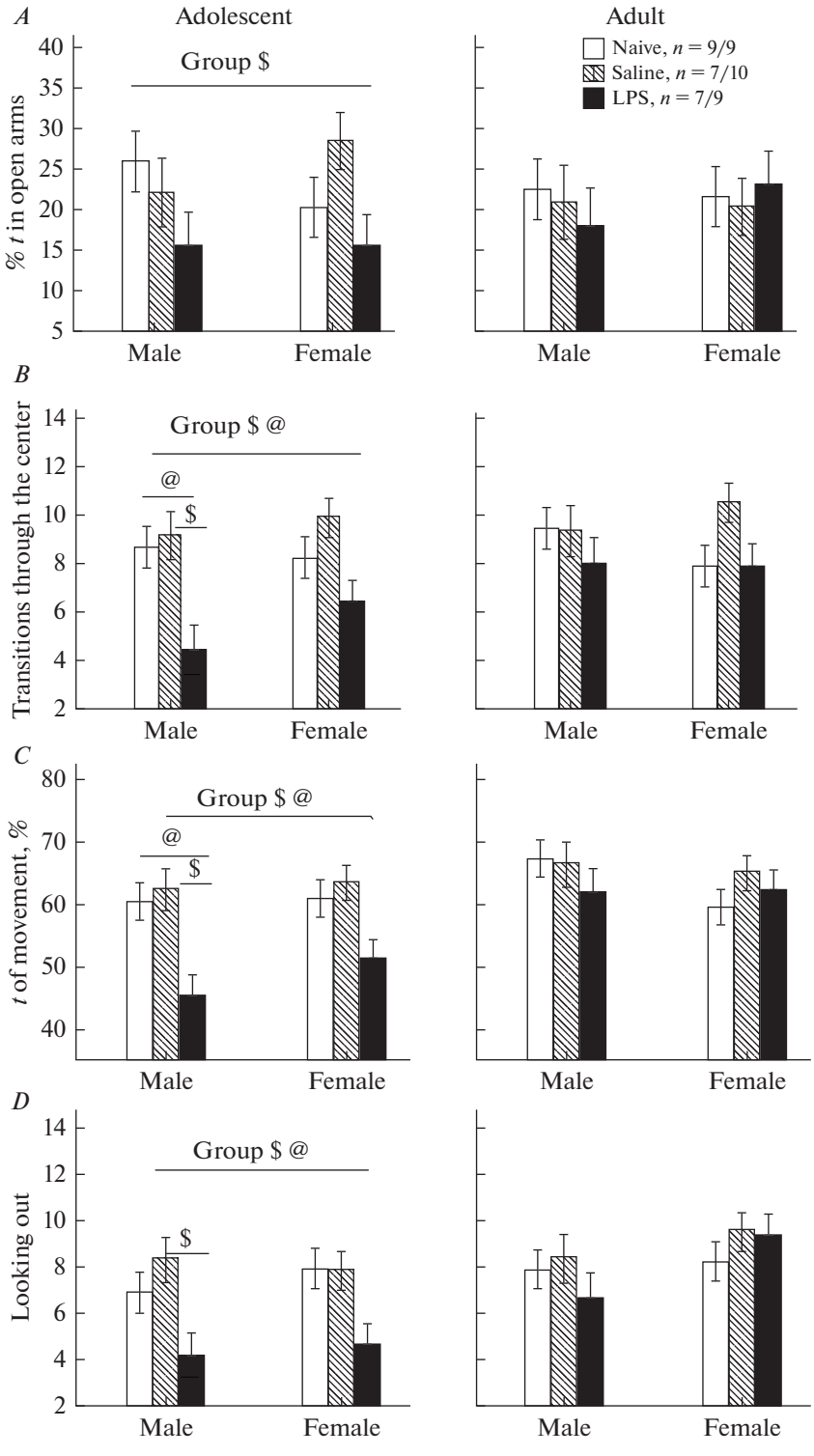

A
Adolescent
Adult
Naive, n = 9/9
Saline, n = 7/10
LPS, n = 7/9
Group $
% t in open arms
40
35
30
25
20
15
10
5
Male
Female
B
Transitions through the center
Group $ @
@
$
14
12
10
8
6
4
2
C
t of movement, %
80
70
60
50
40
D
Looking out

Таблица 3. Значения F и p при анализе с помощью Factorial ANOVA некоторых показателей поведения крыс в тесте вынужденного плавания
Table 3. The values of F and p at the analysis by factorial ANOVA of some parameters of rat's behavior in the forced swimming test

Возраст и день тестирования Age and day of testing	Фактор Factor				
	ВРЕМЯ TIME	ПОЛ SEX	ПОЛ/ВРЕМЯ SEX/TIME	ГРУППА/ ПОЛ GROUP/ SEX	ГРУППА/ ПОЛ/ ВРЕМЯ GROUP/ SEX/TIME
1 мес., 1 день 1 month, day 1	$F_{4,646} = 365.4$ $p = 0.000$	$F_1 = 3.3$ $p = 0.071$	$F_{4,646} = 2.5$ $p = 0.041$	$F_{2,646} = 9.9$ $p = 0.000$	–*
1 мес., 2 день 1 month, day 2	$F_{4,647} = 109.8$ $p = 0.000$	$F_{1,647} = 6.4$ $p = 0.012$	–	–	–
3 мес. 3 months	$F_{4,570} = 234.3$ $p = 0.000$	$F_{1,570} = 22.4$ $p = 0.000$	$F_{4,570} = 4.4$ $p = 0.002$	–	–

* – прочерк свидетельствует о статистически незначимом влиянии фактора.
*– a dash means the non-significant influence of Factor.

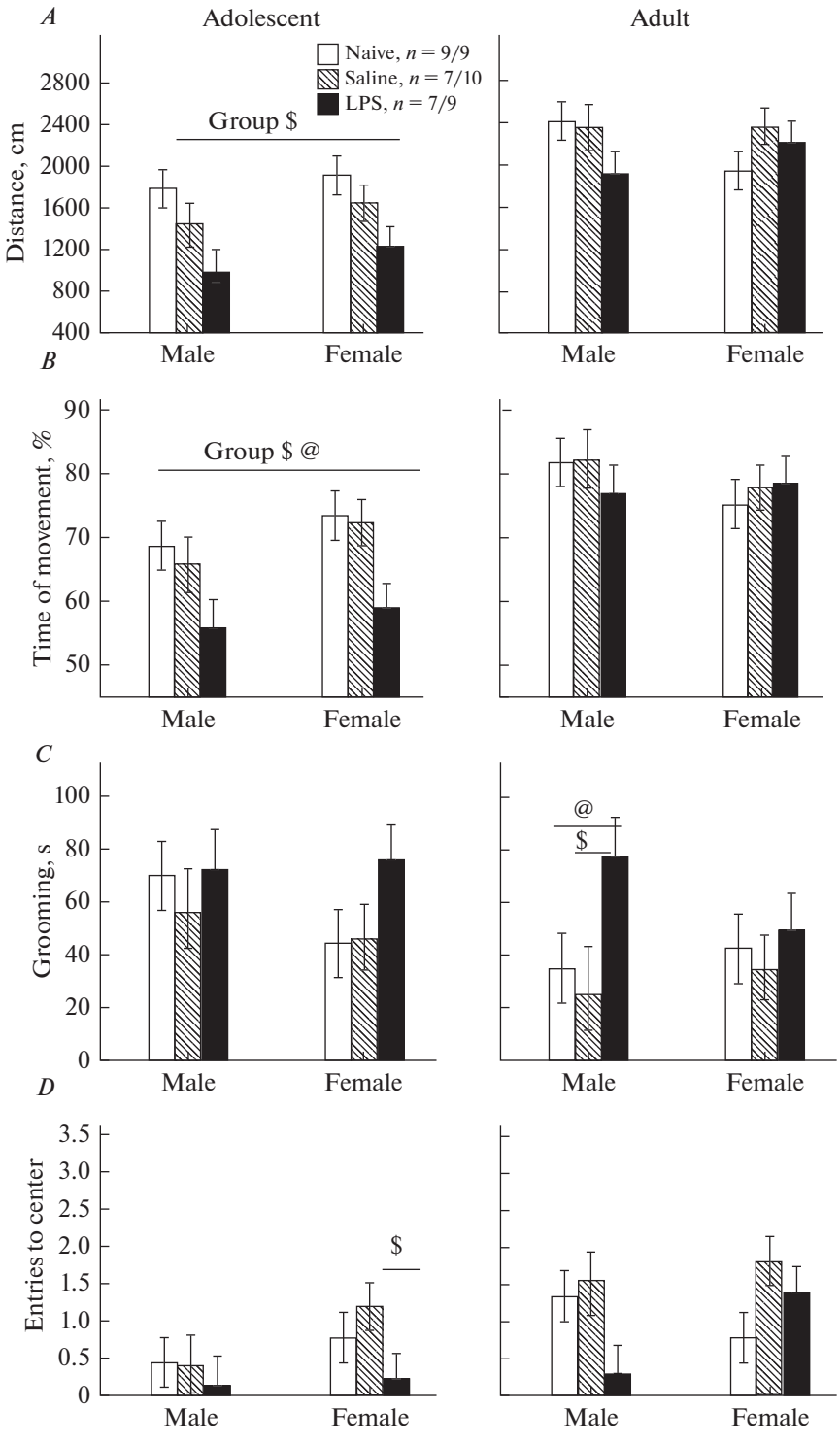
У самцов в возрасте 1 мес. также наблюдались межгрупповые различия по числу стоек (Kruskal–Wallis test: H (2, $n = 23$) = 6.1, $p = 0.048$), наблюдалась тенденция снижения числа стоек у группы ЛПС по сравнению с группой ФИЗ ($p = 0.020$, Mann–Whitney U Test) и группой ИНТ ($p = 0.052$, Mann–Whitney U Test).

Таким образом, судя по полученным результатам, ранний провоспалительный стресс приводил в подростковом возрасте к снижению двигательной и исследовательской активности, а также к увеличению уровня тревожности, причем изменения проявились сильнее у самцов, чем у самок. Во взрослом возрасте различий между группами ЛПС и контрольными группами крыс уже не наблюдалось, что свидетельствует об исчезновении влияния раннего провоспалительного стресса на поведение крыс в ПКЛ в этом возрасте.

Влияние раннего провоспалительного стресса на поведение крыс в открытом поле. При анализе с помощью Factorial ANOVA показателей поведения, имеющих нормальное распределение (табл. 3), было выявлено влияние факторов ГРУППА и ВОЗРАСТ крыс, а также их взаимодействия на показатели двигательной активности крыс (дистанция, скорость и время движения). Post-hoc анализ показал, что межгрупповые различия наблюдались только в подростковом возрасте, но не у взрослых крыс. В возрасте 1 мес. у всех крыс группы ЛПС была меньше пройденная дистанция (рис. 2*A*), время (рис. 2*B*) и скорость движения, чем у животных одной или обеих контрольных групп, половых различий по этим показателям не было выявлено. Анализ остальных показателей поведения, не имеющих нормального распределения, показал, что у самок в подростковом возрасте имелись межгруппо-

Рис. 2. Влияние раннего провоспалительного стресса на поведение крыс в открытом поле в подростковом и взрослом возрасте. По горизонтали – пол крыс, по вертикали – значения различных показателей поведения. @ – статистически значимые различия между группой LPS и группой Naive, $ – между группой LPS и Saline ($p < 0.05$, на *A*, *B* – post-hoc анализ Factorial ANOVA, на *C*, *D* – Mann–Whitney U Test). Group – значимое влияние фактора Group на крыс в подростковом возрасте. Остальные обозначения как на рис. 1.

Fig. 2. The influence of an early proinflammatory stress on behavior of rats in the open field at the adolescent and adult age. On horizontal line – the sex of rats, on vertical line – the values of different parameters of behavior. $ – the significant difference between LPS and Saline groups, @ – between LPS and Naive groups ($p < 0.05$, on *C*, *V* – Mann–Whitney U Test, on *A*, *B* – post-hoc-analysis Factorial ANOVA). Group – significant influence of factor group on adolescent rats. The rest designations are the same as in the Fig. 1.


A
Adolescent
Adult
Naive, n = 9/9
Saline, n = 7/10
LPS, n = 7/9
Group $
Distance, cm
2800
2400
2000
1600
1200
800
400
Male
Female
B
Time of movement, %
90
80
70
60
50
Group $ @
C
Grooming, s
100
80
60
40
20
0
@
$
D
Entries to center
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0

вые различия по числу выходов в центр поля (Kruskal–Wallis test: H (2, $n = 28$) = 6.9, $p = 0.031$), по времени нахождения в центре (Kruskal–Wallis test: H (2, $n = 28$) = 8.65, $p = 0.013$), при этом показатели самок группы ЛПС были меньше ($p < 0.017$, Mann-Whitney U Test) (рис. 2*D*), чем у группы ФИЗ. Во взрослом возрасте межгрупповые различия по указанным выше показателям исчезали. По числу стоек межгрупповые различия не были обнаружены ни в 1, ни в 3 мес. По длительности груминга межгрупповые различия не наблюдались в 1-м мес., но появлялись у самцов в 3 мес. (рис. 2*C*, Kruskal–Wallis test: H (2, $n = 28$) = 6.92, $p = 0.031$), при этом у самцов группы ЛПС время груминга было больше, чем у группы ФИЗ ($p < 0.017$, Mann–Whitney U Test). Таким образом, ранний провоспалительный стресс приводил в подростковом возрасте к снижению двигательной активности в ОП у всех крыс и к увеличению тревожности у самок. Во взрослом возрасте влияние провоспалительного стресса исчезало, только у самцов наблюдалось увеличение замещающей активности.

Влияние раннего провоспалительного стресса на предпочтение сахарозы в тесте на ангедонию. Результаты теста на потребление раствора сахарозы у крыс в разном возрасте представлены на рис. 3*A*, *B*. На процент потребления сахарозы оказывали влияние факторы ВОЗРАСТ ($F_{1,131} = 34.4$, $p < 0.001$) и ГРУППА крыс ($F_{2,131} = 13.9$, $p < 0.001$). Было также обнаружено значимое взаимодействие этих факторов ($F_{2,131} = 53.4$, $p < 0.001$). На объем выпитой жидкости за сутки оказывали влияние факторы ВОЗРАСТ ($F_{1,131} = 211.1$, $p < 0.001$) и ГРУППА ($F_{2,131} = 9.7$, $p < 0.001$), наблюдалось также взаимодействие факторов ВОЗРАСТ × ПОЛ ($F_{1,131} = 18.1$, $p < 0.001$) и ГРУППА × × ПОЛ ($F_{2,131} = 3.2$, $p = 0.046$). Post-hoc анализ показал, что в подростковом возрасте животные группы ЛПС потребляли существенно меньше ($p < 0.05$) раствора сахарозы, чем животные ФИЗ и ИНТ групп (рис. 3*A*), разницы между самцами и самками не наблюдалось. У самцов группы ЛПС в один месяц общий объем выпитой жидкости за сутки был больше, чем у крыс ФИЗ и ИНТ групп (рис. 3*B*) ($p < 0.05$). Во взрослом возрасте крысы группы ЛПС, наоборот, потребляли больше ($p < 0.05$) раствора сахарозы, чем животные группы ФИЗ или ИНТ (рис. 2*A*), статистически значимые различия наблюдались у самок. По объему выпитой жидкости за сутки животные разных групп не отличались в три месяца (рис. 3*B*).

Таким образом, судя по результатам теста на сахарозу, крысы группы ЛПС в подростковом возрасте демонстрировали признаки депрессивно-подобного поведения, но у взрослых животных эти признаки исчезали.

Влияние раннего провоспалительного стресса на время зависания в тесте вынужденного плавания. Результаты анализа времени зависания у крысят в подростковом возрасте (1-й и 2-й день), а также у взрослых крыс представлены на рис. 4 и в табл. 3. В первый день тестирования в подростковом возрасте наибольшие различия времени зависания в зависимости от группы крыс и от времени пребывания в воде наблюдались только в начале опыта, в дальнейшем время зависания оставалось постоянным, незначительно колеблясь около 50 с, поэтому на рисунке представлен только первый 5-минутный отрезок из 15-минутного опыта. Видно, что фактор ВРЕМЯ и ПОЛ оказывали влияние во всех опытах (табл. 3). Влияние фактора ПОЛ увеличивалось у взрослых крыс, post-hoc анализ показал, что наибольшие различия между самцами и самками наблюдались на первой минуте тестирования, самцы зависали на большее ($p < 0.05$) время, чем самки (рис. 4*C*). Влияние фактора ВРЕМЯ было максимальным в первый день тестирования у подростков. На первой минуте время зависания не превышало 5 с, к 5-й минуте – возрастало до 50–60 с (рис. 4*A*). В последующие дни уже на первой минуте тестирования время зависания было значительным (рис. 4*B*, *C*). Кроме того, только у подростков в 1-й день было обнаружено взаимодействие факторов ГРУППА/ПОЛ. Оно проявилось в большем времени зависания у самцов группы ЛПС по сравнению с контрольными группами, и,

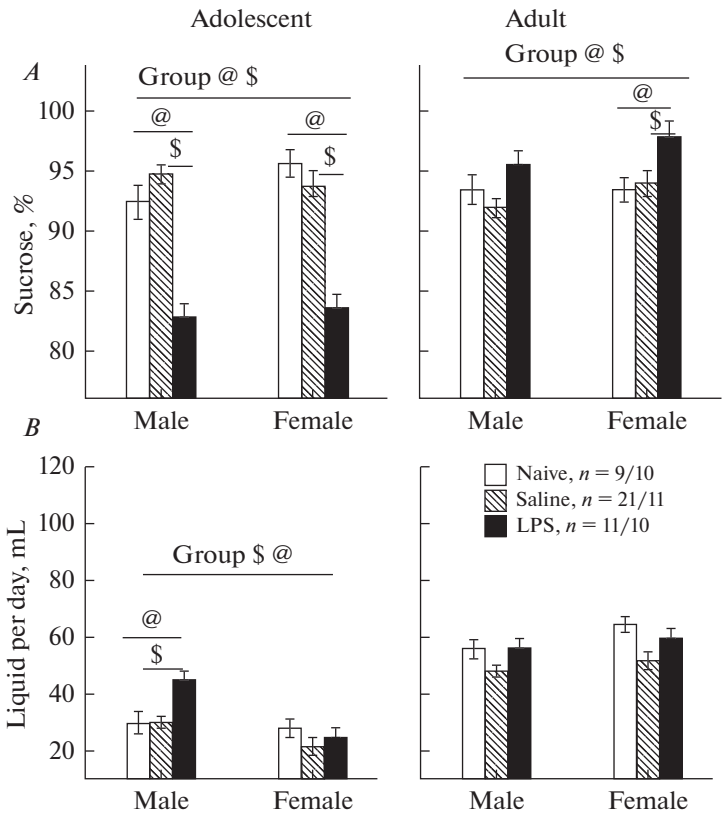


Рис. 3. Влияние раннего провоспалительного стресса на потребление сахарозы (*A*) и общее потребление жидкости (*B*) в тесте на предпочтение сахарозы в подростковом и взрослом возрасте. По горизонтали – пол крыс, по вертикали на *A* – процент выпитого раствора сахарозы от общего объема потребленной жидкости в сутки, на *B* – общий объем выпитой жидкости в сутки (мл). @ – статистически значимые различия между группой LPS и группой Naive, $ – между группой LPS и Saline (post-hoc анализ Factorial ANOVA). Group – значимое влияние фактора Group на крыс в данном возрасте. Остальные обозначения как на рис. 1.

Fig. 3. The influence of an early proinflammatory stress on consumption of sucrose (*A*) and total liquid consumption (*B*) in the sucrose preference test at the adolescent and adult age. On horizontal line – the sex of rats, on vertical lines on *A* – a percentage of the consumed sucrose solution from a total amount of the consumed liquid for 24 hours, *B* – the total amount of the consumed liquid for 24 hours. $ – the significant difference between LPS and Saline groups, @ – between LPS and Naive groups ($p < 0.05$, post-hoc analysis Factorial ANOVA). Group – significant influence of factor group. The rest designations are the same as in the Fig. 1.

наоборот, в меньшем времени зависания у самок группы ЛПС по сравнению с контролем. Post-hoc анализ показал, что в 1-й день у самцов-подростков группы ЛПС время зависания на 2-й и 4-й минутах было статистически значимо больше, чем у самцов группы ИНТ и ФИЗ. У самок-подростков ЛПС группы в первый день на 4-й минуте время зависания было, наоборот, меньше, чем у самок ИНТ и ФИЗ групп. При последующих тестированиях межгрупповых различий не было обнаружено. Таким образом, тест вынужденного плавания показал, что только в первый день в подростковом возрасте самцы ЛПС группы проявляли признаки депрессивно-подобного поведения, при последующих тестированиях указанные раз-

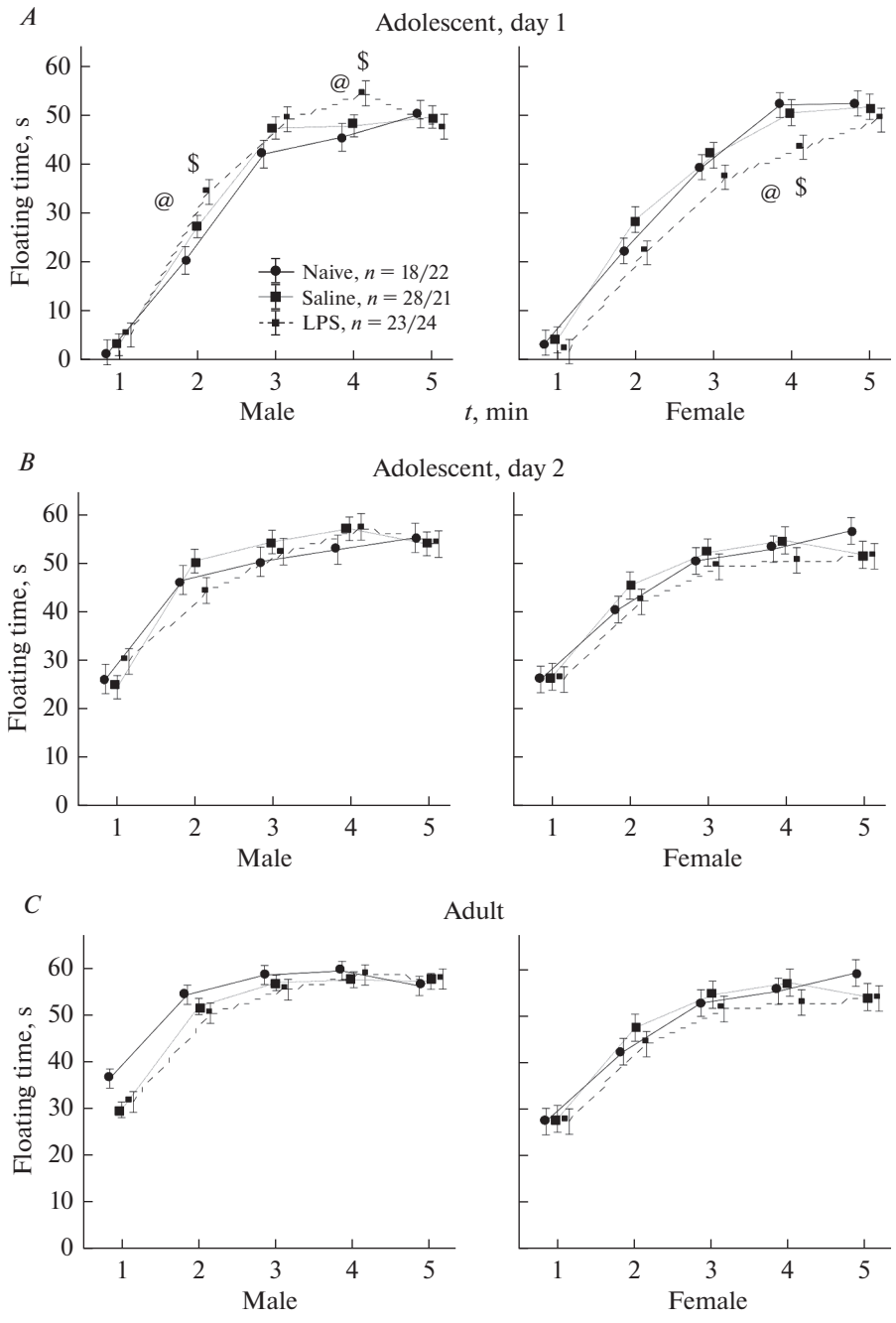

A
Adolescent, day 1
Floating time, s
Naive, n = 18/22
Saline, n = 28/21
LPS, n = 23/24
Male
Female
t, min
B
Adolescent, day 2
Floating time, s
Male
Female
C
Adult
Floating time, s
Male
Female

Рис. 4. Влияние раннего провоспалительного стресса на время зависания в тесте вынужденного плавания. *A* – время зависания по минутам в 1-й день в подростковом возрасте, *B* – во 2-й день в подростковом возрасте, *C* – во взрослом возрасте. *n* – число крыс в группе (самцы/самки). @ – статистически значимые различия между группой LPS и группой Naive, $ – между группой LPS и Saline ($p < 0.05$, post-hoc анализ, Factorial ANOVA). Остальные обозначения как на рис. 1.

Fig. 4. The influence of an early proinflammatory stress on immobility time in the forced swimming test. *A* – a time of immobility by minutes on the 1st day at the adolescent age, *B* – on the 2d day at the adolescent age, *C* – at the adult age. *n* – a number of rats in a group (males/females). $ –the significant difference between LPS and Saline groups, @ – between LPS and Naive groups (post-hoc analysis Factorial ANOVA). The rest designations are the same as in the Fig. 1.

личия в поведении исчезали. У самок группы ЛПС депрессивно-подобное поведение не проявлялось ни в подростковом, ни во взрослом возрасте.

Влияние ЛПС на уровень кортикостерона и IL-1β. Проведенный иммуноферментный анализ сыворотки крови, взятой через 20–30 мин после стрессового воздействия (тест вынужденного плавания) у крыс в возрасте 6 мес. показал (рис. 5*A*), что на уровень кортикостерона существенное влияние оказывал фактор ПОЛ ($F_{1,42} = 55.78$, $p < 0.001$). У самок всех групп уровень кортикостерона был выше, чем у самцов ($p < 0.05$, post-hoc анализ). Фактор ГРУППА крыс оказывал слабое влияние на уровень кортикостерона в виде тенденции ($F_{2,42} = 2.71$, $p = 0.078$). Только у самок группы ЛПС уровень кортикостерона был выше, чем у интактной группы (post-hoc анализ).

На уровень IL-1β влияние оказывал фактор ГРУППА крыс ($F_{2,38} = 3.81$, $p = 0.031$). Post-hoc анализ показал, что у самцов группы ЛПС уровень IL-1β был выше, чем у самцов контрольных групп (рис. 5*B*). У самок значимых различий в уровне IL-1β у разных групп крыс не было обнаружено.

Таким образом, ранний провоспалительный стресс оказывал разное влияние на биохимические показатели сыворотки крови у самцов и самок: у самцов в возрасте 6 мес. оставался повышенным уровень провоспалительного цитокина IL-1β, а у самок – уровень кортикостерона.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящих опытах провоспалительный стресс, вызванный введением ЛПС на 3-й и 5-й дни жизни, приводил к уменьшению двигательной и исследовательской активности, усилению тревожности и к признакам депрессивно-подобного поведения у крыс в подростковом возрасте. Усиление тревожности в тесте ПКЛ проявилось в большей степени у самцов, тогда как в тесте ОП – только у самок. Усиление депрессивно-подобного поведения у крыс с ранним провоспалительным стрессом было выявлено в тесте предпочтения сахарозы в равной степени у самцов и самок, в то время как в тесте вынужденного плавания – только у самцов в первый день экспериментов. Во взрослом возрасте после выработки пищедобывательных рефлексов все перечисленные выше различия в поведении крыс, получавших провоспалительный стресс, и контрольных животных исчезали, за исключением результатов теста предпочтения сахарозы, в котором самки, получавшие ранний ЛПС стресс, показали даже большее предпочтение сахарозы, чем контрольные животные.

В литературе традиционно для оценки депрессивно-подобного поведения у грызунов применяют тесты вынужденного плавания и предпочтения сахарозы. Однако эти тесты отражают разные аспекты данного вида поведения и с этим, по-видимому, могут быть связаны некоторые различия в полученных нами результатах по этим двум тестам. Тест предпочтения сахарозы оценивает степень ангедонии жи-

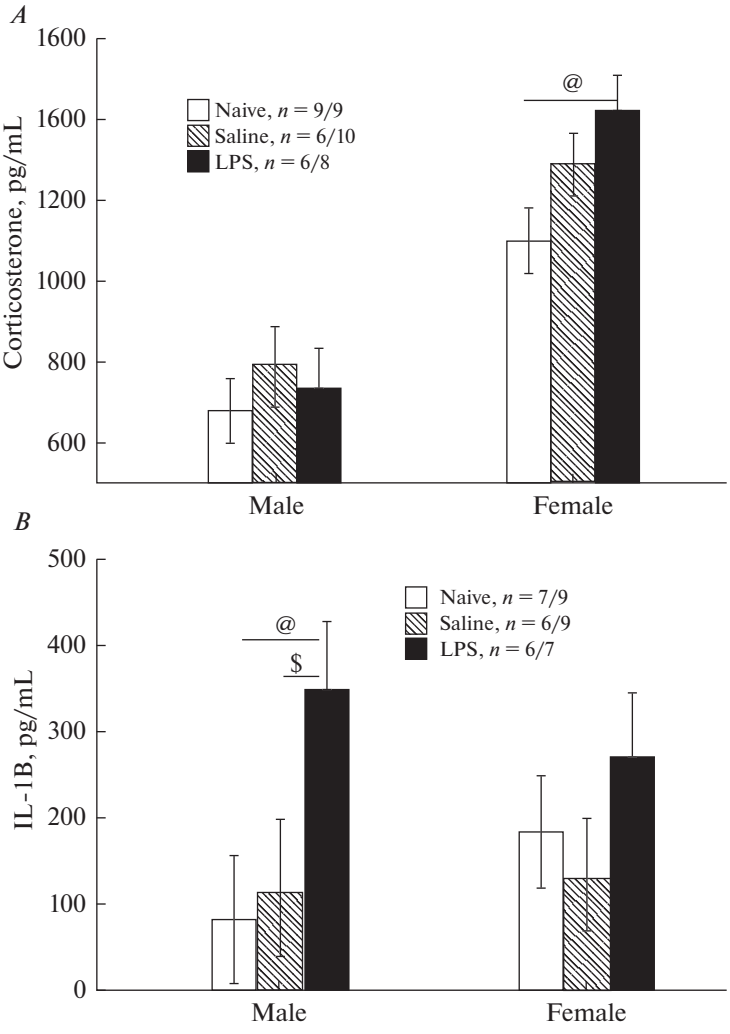


Рис. 5. Влияние раннего провоспалительного стресса на уровни кортикостерона (*A*) и ИЛ-1β (*B*) в сыворотке крови у взрослых самцов и самок после теста вынужденного плавания. По горизонтали – пол крыс. @ – статистически значимые различия между группой LPS и группой Naive, $ – между группой LPS и Saline ($p < 0.05$, post-hoc анализ Factorial ANOVA). Остальные обозначения как на рис. 1.

Fig. 5. The influence of an early proinflammatory stress on the levels of corticosterone (*A*) and IL-1β (*B*) in the blood serum of the adult males and females after the forced swimming test. On horizontal line – the sex of rats. $ – the significant difference between LPS and Saline groups, @ – between LPS and Naive groups ($p < 0.05$, post-hoc analysis Factorial ANOVA). The rest designations are the same as in the Fig. 1.

вотных, т.е. уменьшение удовольствия от потребления сладкого раствора. Тест вынужденного плавания, являющийся умеренным стрессогенным воздействием [19, 30, 31], оценивает степень иммобильности, пассивного зависания, склонность животных к “поведенческому отчаянию” [30]. Кроме того, некоторые различия в результатах наших опытов в тестах вынужденного плавания и предпочтения сахарозы могут быть связаны с разной чувствительностью этих двух тестов. Ранее отмеча-

лось, что ангедония является наиболее чувствительным индикатором депрессивного поведения после хронического стресса [31]. В тесте вынужденного плавания в подростковом возрасте увеличение времени иммобильности у самцов группы ЛПС наблюдали только в первый день пребывания в воде. У самок при этом, наоборот, время зависания в ЛПС группе было меньше, чем в контрольных группах. Во второй день тестирования межгрупповые различия среди самцов и самок исчезали, все животные, начиная с первой минуты, зависали на значительное время, что свидетельствовало, по-видимому, о том, что животные обучились экономить силы. Таким образом, наиболее показателен был первый день пребывания крыс в воде, только в этот день можно было оценить copy-style, т.е. способ, как животные справляются со стрессом, предпочтение активных или пассивных реакций на неизбегаемый стресс.

В литературе имеется ряд работ, в которых исследовали влияние провоспалительного стресса в раннем возрасте на тревожное и депрессивно-подобное поведение у взрослых животных, при этом имеются существенные различия в дозе вводимого препарата (от 50 до 250 мкг/кг) и возрасте воздействия. В одних работах введение ЛПС проводилось в возрасте 3-х и 5-ти дней [12, 19, 21, 22], в других – 14-ти дней [11, 24, 32]. Возраст до 9-ти дней рассматривается в литературе как особый “сенситивный” период постнатального развития, когда из-за низкого уровня кортикостерона еще не проявляется амигдало-зависимое обучение. Возраст с 10-го по 15-й день рассматривается как окончание сенситивного периода, когда начинает проявляться амигдало-зависимое обучение через влияние на миндалину гормонов стресса [33]. При введении ЛПС на 3-й и 5-й день, так же как в нашей работе, наблюдалось увеличение тревожности у самцов в ОП (у подростков) и в ПКЛ (у взрослых) и депрессивно-подобного поведения в тесте вынужденного плавания [19]. Увеличение тревожности и депрессивно-подобного поведения у мышей самцов, но не самок, в 35 и 70 дней наблюдали после введения ЛПС на 5-й и 7-й дни жизни [10]. Эффект от введения ЛПС мог зависеть от линии крыс [22], у высокотревожных крыс введение ЛПС приводило к снижению тревожности, а у низкотревожных, наоборот, к ее увеличению. Имеются данные, что ранний провоспалительный стресс мог не менять уровень тревожности в ПКЛ и ОП у взрослых крыс, только дополнительный хронический стресс (изоляция и ограничение движения) у взрослых животных, рассматриваемый в качестве “второго удара”, вызывал увеличение тревожности [12]. Введение ЛПС взрослым животным за 24 ч до тестирования дало более однородные результаты, было показано увеличение депрессивноподобного поведения [28], причем самцы демонстрировали большую чувствительность, чем самки. В литературе при рассмотрении молекулярно-клеточных механизмов генеза депрессии большую роль отводят глюкокортикоидам и цитокинам [34]. Совсем недавно в работе [35] было получено транскриптомное доказательство того, что ранний стресс повышает чувствительность организма к будущим стрессам. Авторы использовали методику секвенирования РНК (RNA-sequencing) в вентральной тегментальной зоне, прилежащем ядре и префронтальной коре самцов и самок мышей, и показали, что стресс у взрослых животных, отчетливо представленный в транскриптомах мозга, зависит от истории ранних влияний. Они обнаружили транскрипционные регуляторы эффектов раннего стресса на стрессирующие воздействия в зрелом возрасте [35].

При анализе наших данных особый интерес вызывает исчезновение изменений в тревожном и депрессивно-подобном поведении крыс во взрослом возрасте при сохранении измененных биохимических показателей сыворотки крови. По данным литературы [10, 19], влияние провоспалительного стресса проявляется в поведении крыс не только в подростковом, но и во взрослом возрасте, причем по отдельным показателям поведения влияние стресса у взрослых даже усиливается [19]. По-

лученные нами данные о возможности коррекции негативных последствий провоспалительного стресса на поведение крыс представляют определенный практический интерес. Согласно данным литературы существует ряд факторов, которые могут уменьшать влияние раннего провоспалительного стресса на проявления тревожного и депрессивно-подобного поведения у взрослых животных. К ним относятся хэндлинг [36], предсказуемый умеренный хронический стресс [37], обогащенная среда [38], физические упражнения и усиленная двигательная активность [38, 39]. Эти факторы ослабляют нейровоспалительный процесс путем уменьшения продукции провоспалительных цитокинов и торможения активации микроглии. В нашем исследовании между первым (в 1–1.5 мес.) и повторным (в 3–3.5 мес.) тестированием животные были использованы в опытах с выработкой пищедобывательных условных рефлексов, во время которых они подвергались комбинированному воздействию – многодневному хендлингу, пребыванию в обогащенной среде и двигательной нагрузке, что могло уменьшить признаки тревожного и депрессивно-подобного поведения у группы ЛПС. Во всяком случае, для более полного ответа на поставленный вопрос, какое воздействие из вышеперечисленных оказало такое положительное влияние, необходимо провести специальное исследование.

Судя по полученным в настоящей работе данным, у самцов, получавших провоспалительный стресс в раннем возрасте, по некоторым показателям проявление тревожного и депрессивно-подобного поведения наблюдалось в большей степени, чем у самок. В литературе есть точка зрения [40], что провоспалительный стресс в раннем возрасте активирует микроглию (эффект прайминга, priming), которая становится более чувствительной к последующим стрессам. Это явление проходит неодинаково у самцов и самок. В то время как у самцов стресс и последующее введение ЛПС ведут к повышению реактивности микроглии, которая увеличивает экспрессию цитокина ИЛ-1β, у самок реактивность микроглии не меняется [41]. В опытах на мышах с ишемическим провоспалительным стрессом, вызванным на 9-й день жизни, у самцов в отличие от самок наблюдалось увеличение активности микроглии и макрофагов, появление амебоидной морфологии и увеличение экспрессии генов белков TNFα и ptgs2 (Cox-2) [42]. Показано, что депрессивно-подобное поведение у самцов и самок реализуется через разные молекулярные механизмы в гипоталамусе [43]. У самок оно больше связано с увеличение высвобождения кортикотропина в гипоталамусе, снижением BDNF, ростом активности ядерных глюкокортикоидных рецепторов и увеличением NFkB и 20 kDa C/EBPβ. У самцов, в отличие от самок, вместе с ростом кортиколиберина происходит увеличение уровня COX-2, глюкокортикоидных рецепторов в цитоплазме, ядерного 38 kDa C/EBPβ и NFkB [43]. При нейровоспалении, вызванном ишемическим инсультом, у самок по сравнению с самцами повышается продукция противовоспалительного цитокина IL-4, а также увеличивается экспрессия рецепторов к IL-4 и IL-10 на глиальных клетках [44]. В настоящих опытах мы обнаружили в группе ЛПС повышенный уровень провоспалительного цитокина IL-1β у самцов (но не самок) по сравнению с контрольными животными, что свидетельствует о сенситизации воспалительного процесса у самцов.

Особое место в реакциях на стресс и проявлениях тревожного и депрессивно-подобного поведения принадлежит эстрогенам. Эстрогены обладают выраженным противовоспалительным действием, что было показано *in vitro* на культуре микроглиальных клеток с введением 17β-эстрадиола, которое предохраняло от морфофункциональных изменений, вызываемых ЛПС, и сопутствующего синтеза провоспалительных цитокинов [45]. Эффекты эстрадиола связаны с модуляцией воспалительных реакций через глиальные клетки и регуляцией высвобождения провоспалительных цитокинов и хемокинов [46], при этом считается, что эстрогенные рецепторы альфа играют более существенную роль в уменьшении воспали-

тельных эффектов микроглии, чем эстрогенные рецепторы бета. Овариоэктомия у грызунов приводила к большему вовлечению микроглии в нейровоспалительный процесс и усилению регуляции большего числа маркеров реактивности микроглии, включая рецепторы для провоспалительных сигналов и фагоцитоза [47]. Введение эстрадиола перед овариоэктомией блокировало активацию микроглии, это свидетельствует о том, что именно отсутствие эстрогенов при овариоэктомии связано с усилением нейровоспалительных процессов. Эстрогены усиливают также серотонинергическую активность через большое число эстрогенных рецепторов бета, расположенных на нейронах ядер шва [48]. По-видимому, благодаря противовоспалительному действию эстрогенов у самок ЛПС группы в нашей работе не наблюдалось повышения уровня ИЛ-1β по сравнению с контрольными группами после дополнительного стрессирования.

ВЫВОДЫ

1. Ранний провоспалительный стресс, создаваемый путем введения ЛПС на 3-й и 5-й постнатальные дни, приводил к снижению двигательной активности, уменьшению исследовательского поведения и увеличению тревожности у крысят в подростковом возрасте в тестах приподнятого крестообразного лабиринта и открытого поля. Наибольшие изменения в поведении происходили у самцов по сравнению с самками. Во взрослом возрасте после выработки пищедобывательных рефлексов указанные изменения практически исчезали.

2. Ранний провоспалительный стресс вызывал депрессивно-подобное поведение у самцов и самок в подростковом возрасте, которое проявлялось в уменьшении предпочтения 1%-ного раствора сахарозы по сравнению с контрольными группами. Во взрослом возрасте признаки ангедонии исчезали.

3. В тесте вынужденного плавания признаки депрессивно-подобного поведения в ответ на ранний провоспалительный стресс у самцов проявились только в 1-й день тестирования в подростковом возрасте; при повторных тестированиях во 2-й день и у взрослых крыс они исчезали. У самок группы ЛПС время зависания было, наоборот, меньше, чем у контрольных групп в подростковом возрасте, у взрослых различия исчезали.

4. Введение ЛПС в раннем возрасте приводило у взрослых самцов, но не самок, к увеличению уровня IL-1β в крови после повторных стрессовых воздействий по сравнению с самцами контрольных групп. У самок, но не у самцов, после введения ЛПС возрастало содержание в крови кортикостерона.

5. У самцов по сравнению с самками ранний провоспалительный стресс оказывал большее влияние на тревожно-депрессивное поведение и вызывал большую активацию провоспалительного сигналинга.

Авторы выражают благодарность Онуфриеву М.В и Моисеевой Ю.В., сотрудникам лаборатории функциональной биохимии нервной системы ИВНД и НФ РАН, за помощь в проведении иммуноферментного анализа.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания ИВНД и НФ РАН по теме “Фундаментальные нейробиологические механизмы поведения, памяти и обучения в норме и при патологии” (номер государственной регистрации АААА-А17-117-92040002-6) и при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 19-015-00129А и №19-34-90022).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kessler R.C., Petukhova M., Sampson N.A., Zaslavsky A.M., Wittchen H.-U.* Twelve-month and lifetime prevalence and lifetime morbid risk of anxiety and mood disorders in the United States. Int. J. Methods Psychiatr. Res. 21(3): 169–184. 2012.
2. *Parker G., Brotchie H.* Gender differences in depression. Int. Rev. Psychiatry. 22: 429–436. 2010.
3. *Solomon M.B., Herman J.P.* Sex differences in psychopathology: of gonads, adrenals and mental illness. Physiol. Behav. 97: 250–258. 2009.
4. *Bangasser D.A., Valentino R.J.* Sex differences in stress-related psychiatric disorders:neurobiological perspectives. Front. Neuroendocrinol. 35: 303–319. 2014.
5. *Shansky R.M.* Sex differences in PTSD resilience and susceptibility: challenges for animal models of fear learning. Neurobiol. Stress. 1: 60–65. 2015.
6. *Benmhammed H., El Hayek S., Nassiri A., Bousalham R., Mesfioui A.,Ouichou A., El Hessni A.* Effects of lipopolysaccharide administration and maternal deprivation on anxiety and depressive symptoms in male and female Wistar rats: Neurobehavioral and biochemical assessments. Behav. Brain Res. 362: 46–55. 2019.
7. *Miragaia A.S., de Oliveira Wertheimer G.S., Consoli A.C., Cabbia R., Longo B.M., Girardi C.E.N., Suchecki D.* Maternal deprivation increases anxiety- and depressive-like behaviors in an age-dependent fashion and reduces neuropeptide Y expression in the amygdala and hippocampus of male and female young adult Rats. Front. Behav. Neurosci. 7(12): 159. 2018.
8. *Wei Y., Wang G., Wang H., He J., Zhang N., Wu Z., Xiao L., Yang C.* Sex-dependent impact of different degrees of maternal separation experience on OFT behavioral performances after adult chronic unpredictable mild stress exposure in rats. Physiol. Behav. 194: 153–161. 2018.
9. *Брошевицкая Н.Д., Павлова И.В., Зайченко М.И., Онуфриев М.В., Моисеева Ю.В., Григорьян Г.А.* Половые различия в оборонительном поведении взрослых крыс в ответ на ранний провоспалительный стресс. Журн. высш. нервн. деят. 70. (в печати) 2020. [Broshevitskaya N.D., Pavlova I.V., Zaichenko M.I., Onufriev M.V., Moiseeva Yu.V., Grigoryan G.A. The Sex Differences in Defensive Behavior of Adult Rats in Response to Early Neuroinflammatory Stress. Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. im. I.P. Pavlova. 70. 2020. (In Russ)].
10. *Custódio C.S., Mello B.S.F., Filho A.J.M.C., de Carvalho Lima C.N., Cordeiro R.C., Miyajima F., Réus G.Z., Vasconcelos S.M.M., Barichello T., Quevedo J., de Oliveira A.C., de Lucena D.F., Macedo D.S.* Neonatal immune challenge with lipopolysaccharide triggers long-lasting sex- and age related behavioral and immune/neurotrophic alterations in mice: relevance to autism spectrum disorders. Mol. Neurobiol. 55(5): 3775–3788. 2018.
11. *Dinel A.L., Joffre C., Trifilieff P., Aubert A., Foury A., Le R.P., Laye S.* Inflammation early in life is a vulnerability factor for emotional behavior at adolescence and for lipopolysaccharide-induced spatial memory and neurogenesis alteration at adulthood. J. Neuroinflam. 11: 155. 2014.
12. *Walker A.K., Nakamura T., Byrne R.J., Naicker S., Tynan R.J., Hunter M., Hodgson D.M.* Neonatal lipopolysaccharide and adult stress exposure predisposes rats to anxiety-like behaviour and blunted corticosterone responses: implications for the double-hit hypothesis. Psychoneuroendocrinology. 34(10): 1515–1525. 2009.
13. *Victoria N.C., Murphy A.Z.* Exposure to early life pain: long term consequences and contributing mechanisms. Curr. Opin. Behav. Sci. 7: 61–68. 2016.
14. *Walker C.D., Bath K.G., Joels M., Korosi A.Larauche M., Lucassen P.J., Morris M.J., Raineki C., Roth T.L., Sullivan R.M., Taché Y., Baram T.Z.* Chronic early life stress induced by limited bedding and nesting (LBN) material in rodents: critical considerations of methodology, outcomes and translational potential. Stress. 20(5): 421–448. 2017.
15. *Григорьян Г.А.* Половые различия в поведении и биохимических маркерах у животных в ответ на нейровоспалительный стресс. Успехи физиол. наук. 51(1): 1–15. 2020. [Grigoryan G.A. Sex differences in behaviour and biochemical markers in animals in response to neuroinflamatory stress. Usp. Physiol. Nauk. 51(1): 1–15. 2020. (In Russ)].
16. *Alexander C., Rietschel E.T.* Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. J. Endotoxin Res. 7(3): 167–202. 2001.
17. *Dantzer R., O'Connor J.C., Freund G.G., Johnson R.W., Kelley K.W.* From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. Nature Rev. Neurosci. 9: 46–56. 2008.
18. *Dudek K.A., Dion-Albert L., Kaufmann F.N., Tuck E., Lebel M., Menard C.* Neurobiology of resilience in depression: immune and vascular insights from human and animal studies. Eur. J. Neurosci. 2019
https://doi.org/10.1111/ejn.14547
19. *Tishkina A., Stepanichev M., Kudryashova I., Freiman S., Onufriev M., Lazareva N., Gulyaeva N.* Neonatal proinflammatory challenge in male Wistar rats: Effects on behavior, synaptic plasticity, and adrenocortical stress response. Behav. Brain Res. 304: 1–10. 2016.
20. *Bilbo S.D., Yirmiya R., Amat J., Paul E.D., Watkins L.R., Maier S.F.* Bacterial infection early in life protects against stressor-induced depressive-like symptoms in adult rats. Psychoneuroendocrinology. 33: 261–269. 2008.

21. *Tenk C.M., Kavaliers M., Ossenkopp K.P.* Neonatal treatment with lipopolysaccharide differentially affects adult anxiety responses in the light-dark test and taste neophobia test in male and female rats. Int. J. Dev. Neurosci. 31(3): 171–180. 2013.
22. *Claypoole L.D., Zimmerberg B., Williamson L.L.* Neonatal lipopolysaccharide treatment alters hippocampal neuroinflammation, microglia morphology and anxiety-like behavior in rats selectively brad for an infantile trait. Brain Behav. Immun. 59: 135–146. 2017.
23. *Shanks N., Larocque S., Meaney M.J.* Neonatal endotoxin exposure alters the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: early illness and later responsivity to stress. J. Neurosci. 15(1 Pt 1): 376–384. 1995.
24. *Berkiks I., Garcia-Segura L.M., Nassiri A., Mesfioui A., Ouichou A., Boulbaroud S., Bahbiti Y., Lopez-Rodriguez A.B., Hasnaoui E., El Hessni A.* The sex differences of the behavior response to early Life immune stimulation: Microglia and astrocytes involvement. Physiol. Behav. 199: 386–394. 2019.
25. *Mello B.S.F., Chaves Filho A.J.M., Custódio C.S., Cordeiro R.C., Miyajima F., de Sousa F.C.F., Vasconcelos S.M.M., de Lucena D.F., Macedo D.* Sex influences in behavior and brain inflammatory and oxidative alterations in mice submitted to lipopolysaccharide-induced inflammatory model of depression. J. Neuroimmunol. 320: 133–142. 2018.
26. *Bernardi M.M., Teixeira L.P., Ligeiro-de-Oliveira A.P., Tavares-de-Lima W., Palermo-Neto J., Kirsten T.B.* Neonatal lipopolysaccharide exposure induces sexually dimorphic sickness behavior in adult rats. Psychol. Neurosci. 7(2): 113–123. 2014.
27. *Pitychoutis P.M., Nakamura K., Tsonis P.A., Papadopoulou-Daifoti Z.* Neurochemical and behavioral alterations in aninflammatory model of depression: sex differences exposed. Neuroscience. 159(4): 1216–1232. 2009.
28. *Millett C.E., Phillips B.E., Saunders E.F.H.* The Sex-specific effects of LPS on depressive-like behavior and oxidative stress in the hippocampus of the mouse. Neuroscience. 399: 77–88. 2019.
29. *Павлова И.В., Рысакова М.П.* Проявление тревожности крыс Вистар при выработке условнорефлекторного страха. Журн. высш. нерв. деят. им. И.П. Павлова. 65(6): 719–735. 2015. [Pavlova I.V., Rysakova M.P. The manifestation of the anxiety during fear conditioning in wistar rats. Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. im. I.P. Pavlova. 65(6): 719–735. 2015. (In Russ)].
30. *Porsolt R.D., Anton G., Blavet N., Jalfre M.* Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. Eur. J. Pharmacol. 47: 379–391. 1978.
31. *Stepanichev M.Y., Tishkina A.O., Novikova M.R., Levshina I.P., Freiman S.V., Onufriev M.V., Levchenko O.A., Lazareva N.A., Gulyaeva N.V.* Anhedonia but not passive floating is an indicator of depressive-like behavior in two chronic stress paradigms. Acta Neurobiol. Exp. 76(4): 324–333. 2016.
32. *Doenni V.M., Gray J.M., Song C.M., Patel S., Hill M.N., Pittman Q.J.* Deficient adolescent social behavior following early-life inflammation is ameliorated by augmentation of anandamide signaling. Brain Behav. Immun. 58: 237–247. 2016.
33. *Opendak M., Gould E., Sullivan R.* Early life adversity during the infant sensitive period for attachment: Programming of behavioral neurobiology of threat processing and social behavior. Dev. Cogn. Neurosci. 25:145–159. 2017.
34. *Григорьян Г.А., Дыгало Н.Н., Гехт А.Б., Степаничев М.Ю., Гуляева Н.В.* Молекулярно-клеточные механизмы депрессии. Роль глюкокортикоидов, цитокинов, и нейротрофических факторов в генезе депрессивных расстройств. Успехи физиол. наук. 44(2): 3–20. 2014. [*Grigoryan G.A., Dygalo N.N., Geht A.B., Stepanichev M.Yu., Gulyaeva N.V.* Molecular cellular mechanisms of depression. The role of glucocorticoids, cytokines, and neurotrophic factors in the genesis of depressive disorders. Usp. Physiol. Nauk. 44(2): 3–20. 2014. (In Russ)].
35. *Peña C.J., Smith M., Ramakrishnan A., Cates H.M., Bagot R.C., Kronman H.G., Patel B., Chang A.B., Purushothaman I., Dudley J., Morishita H., Shen L., Nestler E.J.* Early life stress alters transcriptomic patterning across reward circuitry in male and female mice. Nat. Commun. 10(1): 5098. 2019.
36. *Bilbo S.D., Newsum N.J., Sprunger D.B., Watkins L.R., Rudy J.W., Maier SF.* Differential effects of neonatal handling on early life infection-induced alterations in cognition in adulthood. Brain Behav. Immun.21(3): 332–342. 2007.
37. *Dang R., Guo Y.Y., Zhang K., Jiang P., Zhao M.G.* Predictable chronic mild stress promotes recovery from LPS-induced depression. Mol. Brain. 12(1): 42. 2019.
38. *Harrison E.L., Baune B.T.* Modulation of early stress-induced neurobiological changes: a review of behavioural and pharmacological interventions in animal models. Transl. Psychiatry. 4: 390. 2014.
39. *Huang T.Y., Lin C.H.* A comparison between chronic exercise training and desipramine as treatments for the depression-like behavior of early-life maternal deprivation rats. Neurosci. Lett. 480: 201–205. 2010.
40. *Bilbo S.D., Schwarz J.M.:* The immune system and developmental programming of brain and behavior. Front. Neuroendocrinol. 33: 267–286. 2012.
41. *Fonken L.K., Frank M.G., Gaudet A.D., D'Angelo H.M., Daut R.A., Hampson E.C., Ayala M.T., Watkins L.R., Maier SF.* Neuroinflammatory priming to stress is differentially regulated in male and female rats. Brain Behav. Immun. 70: 257–267. 2018.

42. *Villapol S., Faivre V., Joshi P., Moretti R., Besson V.C., Charriaut-Marlangue C.* Early Sex Differences in the Immune-Inflammatory Responses to Neonatal Ischemic Stroke. Int. J. Mol. Sci. 20(15).2019. pii: E3809. https://doi.org/10.3390/ijms20153809
43. *Adzic M., Djordjevic J., Mitic M., Brkic Z., Lukic I., Radojcic M.* The contribution of hypothalamic neuroendocrine, neuroplastic and neuroinflammatory processes to lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviour in female and male rats: Involvement of glucocorticoid receptor and C/EBP-β. Behav. Brain Res. 291: 130–139. 2015.
44. *Bodhankar S., Lapato A., Chen Y., Vandenbark A.A., Saugstad J.A., Offner H.* Role for microglia in sex differences after ischemic stroke: importance of M2. Metab. Brain Dis. (30): 1515–1529. 2015.
45. *Vegeto E., Bonincontro C., Pollio G., Sala A., Viappiani S., Nardi F., Brusadelli A., Viviani B., Ciana P., Maggi A.* Estrogen prevents the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in microglia. J. Neurosci. 21(6): 1809–1818. 2001.
46. *Villa A., Vegeto E., Poletti A., Maggi A.* Estrogens, neuroinflammation, and neurodegeneration. Endocr. Rev. 37(4): 372–402. 2016.
47. *Sárvári M., Kalló I., Hrabovszky E., Solymosi N., Liposits Z.* Ovariectomy and subsequent treatment with estrogen receptor agonists tune the innate immune system of the hippocampus in middle-aged female rats. PLoS One. 9(2): e88540. 2014.
48. *Barth C., Villringer A., Sacher J.* Sex hormones affect neurotransmitters and shape the adult female brain during hormonal transition periods. Front. Neurosci. 9: 37. 2015. https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00037

The Influence of Early Proinflammatory Stress on Anxious and Depressive-Like Behavior in Rats of Different Age

N. D. Broshevitskaya[a], I. V. Pavlova[a, *], M. I. Zaichenko[a], V. A. Gruzdeva[a], and G. A. Grigoryan[a]

[a] *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, RAS, Moscow, Russia*
**e-mail: pavlovfml@mail.ru*

An early proinflammatory stress produced by administration of LPS (50 mcg/kg, sc) on 3rd and 5th postnatal days led to decrease of locomotor and search activity and increase of anxiety in rats at the age of 1 month in the tests of an open field and elevated plus maze. The males showed more anxious behavior than females. Administration of LPS in early ontogenesis produced the signs of depressive-like behavior in males and females in the test of anhedonia by decrease of preference of 1% sucrose solution in comparison with control groups. The forced swimming test showed the signs of depressive-like behavior in males, but not in females at the first day of testing at the age of 1 month. At the age of 3 months the all mentioned changes in anxious and depressive-like behavior were practically disappeared. The data obtained point out to the sex differences in the effects of early proinflammatory stress on anxious and depressive-like behavior in rats.

Keywords: an early proinflammatory stress, an open field, an elevated plus maze, a forced swimming test, lipopolysaccharide, corticosterone, IL-1β

ЦИТИРОВАТЬ:

Брошевицкая Н.Д., Павлова И.В., Зайченко М.И., Груздева В.А., Григорьян Г.А. Влияние раннего провоспалительного стресса на тревожное и депрессивно-подобное поведение крыс разного возраста. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(6): 823—842.

DOI: 10.31857/S0869813920060035

TO CITE THIS ARTICLE:

Broshevitskaya N.D., Pavlova I.V., Zaichenko M.I., Gruzdeva V.A., Grigoryan G.A. The Influence of Early Proinflammatory Stress on Anxious and Depressive-like Behavior in Rats of Different Age. Russian Journal of Physiology. 106(6): 823—842.

DOI: 10.31857/S0869813920060035

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 7, с. 843–852

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ВЛИЯНИЕ ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКИ И ПИЩЕВОЙ БЕЛКОВОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ НА НАКОПЛЕНИЕ КОЛЛАГЕНА И МИНЕРАЛОВ В КОСТНОМ МАТРИКСЕ ПОСЛЕ ПЕРЕЛОМА ГОЛЕНИ

© 2020 г. М. В. Стогов[1], *, Е. А. Киреева[1]

[1]Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. акад. Г.А. Илизарова Минздрава России, Курган, Россия

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

Поступила в редакцию 25.02.2020 г.
После доработки 06.03.2020 г.
Принята к публикации 04.05.2020 г.

Цель исследования – оценить влияние гравитационной разгрузки поврежденной конечности и пищевой белковой недостаточности на накопление коллагена и минералов в костном матриксе после перелома голени у мышей. Исследование выполнено на 132 самцах мышей линии СВА, разделенных на две серии экспериментов. В первой серии (n = 66) в течение эксперимента мыши находились на сбалансированном по белку и углеводам рационе. Во второй серии (n = 66) мыши с месячного возраста находились на углеводном, обедненном белком изокалорийном рационе, в котором источником белка служил пшеничный глиадин. Внутри каждой серии животные были рандомизированы на 4 группы: интактные животные; животные, которым моделировали перелом костей голени; животные с гравитационной разгрузкой (ГР) задних конечностей; животные, которым после моделирования перелома выполняли ГР. В костях определяли уровень кальция, фосфата и коллагена, в сыворотке крови – активность щелочной фосфатазы. Обнаружено, что у мышей всех групп серии 2 в костях достоверно снижался уровень минералов и особенно коллагена. Наибольшее снижение уровня коллагена отмечено у животных, которым моделировали перелом костей голени на фоне ГР и неполноценного белкового питания. Репарация кости после перелома на фоне ГР при сбалансированном рационе питания не сопровождалась статистически достоверными изменениями уровня минералов и коллагена в костях изученного сегмента. Заключается, что у мышей заживление перелома костей голени на фоне ГР неполноценное белковое питание является системным фактором, способствующим существенному снижению интенсивности накопления органической компоненты костного матрикса.

Ключевые слова: коллаген, костный минерал, перелом, гравитационная разгрузка, белковая недостаточность

DOI: 10.31857/S0869813920070080

В настоящее время ряд исследований показывает, что после переломов в костях поврежденного сегмента происходит общее суммарное снижение уровня минеральных (прежде всего кальция и фосфата) и органических компонентов костного матрикса [1–3]. При этом восстановление содержания этих компонентов в костях сегмента несколько отстает от скорости накопления этих веществ в зоне перелома [4–6]. В клинической практике такое отставание может лежать в основе патогенеза

повторных переломов, формирования посттравматических дефектов костей, замедления сращения [7–9].

Дополнительными факторами, которые могут замедлять посттравматическое восстановление уровня минеральных и органических компонентов в костях поврежденного сегмента, по нашему мнению, являются снижение нагрузки на травмированную конечность и неполноценность пищевого рациона. Однако влияние данных факторов на обмен кости после травм изучены в неполной мере. Так, наиболее изучены последствия снижения нагрузки на конечность в посттравматическом периоде в основном по отношению к скелетным мышцам [10–12]. Неполноценность же пищевого рациона обычно оценивается в основном по недостатку кальция и фосфора в пище [13–16]. Однако по нашим наблюдениям посттравматическая гипопротеинемия – наиболее частый встречаемый признак, нежели посттравматическая гипокальциемия [17], соответственно, восстановление белкового обмена после травм – актуальная задача.

В целом же имеющиеся работы на вопрос, является ли снижение нагрузки на травмированную конечность и неполноценность пищевого рациона по белку, в совокупности или отдельно взятые, препятствием для полноценного восстановления минерального и органического компонента костного матрикса после перелома, не дают ответа [18].

Цель работы – оценить влияние гравитационной разгрузки поврежденной конечности и пищевой белковой недостаточности на накопление коллагена и минералов в костном матриксе после перелома голени у мышей.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на 132 самцах мышей линии СВА в возрасте двух месяцев и массой 25–30 г. Было поставлено две серии экспериментов.

Животные первой серии (n = 66) в течение всего эксперимента находились на сбалансированном по белку (3.3 г/сутки перевариваемого протеина) и углеводам рационе вивария. Животные второй серии (n = 66) с месячного возраста находились на углеводном, обедненным белком (0.88 г/сутки перевариваемого протеина) изокалорийном рационе, в котором источником белка служил пшеничный глиадин. Таким образом, в серии 2 животные были включены в эксперимент после месяца пищевой белковой недостаточности. Животные обеих серий получали воду в свободном доступе.

Внутри каждой серии животные были рандомизированы на 4 группы в зависимости от экспериментальной модели. Всего было получено 8 групп:

Группа 1 (И, n = 12) – интактные животные, которые находились на сбалансированном рационе. Часть животных данной группы (n = 6) эвтаназировали в возрасте 2 мес., часть (n = 6) – в возрасте 3 месяца.

Группа 2 (ИО, n =12) – интактные животные, которые находились с месячного возраста на углеводном, обедненным белком изокалорийном рационе. Часть животных данной группы (n = 6) эвтаназировали в возрасте 2 мес., часть (n = 6) – в возрасте 3 месяца.

Группа 3 (ПГ, n = 18) – моделировали перелом костей левой голени (ПГ) (согласно патента РФ № 2456927). Животные находились на сбалансированном рационе.

Группа 4 (ПГ + О, n = 18) – моделировали перелом костей левой голени. Животные с месячного возраста и до момента эвтаназии находились на углеводном, обедненным белком изокалорийном рационе.

Группа 5 (ГР, n = 18) – моделировали гипокинезию сегментов задней конечности лишением их опоры в модели гравитационной разгрузки (ГР) [19]. Животные находились на сбалансированном рационе.

Группа 6 (ГР + О, $n = 18$) – моделировали гипокинезию сегментов задней конечности лишением их опоры в модели гравитационной разгрузки. Животные с месячного возраста и до момента эвтаназии находились на углеводном, обедненным белком изокалорийном рационе.

Группа 7 (ПГ + ГР, $n = 18$) – после моделирования перелома костей левой голени животных лишали опоры в модели гравитационной разгрузки. Животные находились на сбалансированном рационе.

Группа 8 (ПГ + ГР + О, $n = 18$) – после моделирования перелома костей левой голени животных лишали опоры в модели гравитационной разгрузки. Животные с месячного возраста и до момента эвтаназии находились на углеводном, обедненным белком изокалорийном рационе.

Все вмешательства проводили под ингаляционным эфирным наркозом. Из эксперимента животных выводили декапитацией после предварительного наркотизирования диэтиловым эфиром. Эвтаназию в группах 3–8 проводили на 3-и, 7-е и 28-е сутки после моделирования острого эксперимента (по 6 животных на срок). Эвтаназия двухмесячных животных групп 1 и 2 соответствовала третьим и седьмым суткам эксперимента в группах 3–8. Эвтаназия трехмесячных животных групп 1 и 2 соответствовала 28-м суткам эксперимента в группах 3–8.

После эвтаназии кости левой голени очищали от остатков соединительной и мышечной ткани, лиофильно высушивали в течение суток. Высушенную костную ткань измельчали в фарфоровой ступке и делили на две навески. В первой – определяли содержание кальция и фосфата. Для этого навеску озоляли в муфельной печи при температуре 800°С в течение 4 ч, затем золу растворяли в 1 мл концентрированной HCl, количественно переносили в мерные пробирки, нейтрализовали раствором щелочи и доводили объем до 10 мл. В полученном растворе определяли концентрацию фосфата по реакции с молибдатом аммония и кальция с о-крезолфталеином, для чего использовали наборы реагентов фирмы Vital Diagnostics (Россия). В другой навеске определяли оксипролин, по концентрации которого, используя формулу Зайдеса, рассчитывали количество коллагена. Оксипролин в навеске определяли после гидролиза с 8н HCl по реакции с реактивом Эрлиха. В сыворотке крови определяли активность маркера остеогенеза – щелочной фосфатазы (ЩФ) с помощью наборов реагентов (Vital Diagnostics, СПб) на фотометре лабораторном StatFax 1904+ (Awareness Technology, Inc., США).

Исследование проведено при соблюдении принципов гуманного обращения с лабораторными животными в соответствии с принципами Базельской декларации, рекомендациями и после одобрения Комитета по этике при ФГБУ “РНЦ “ВТО” им. акад. Г.А. Илизарова” Минздрава России.

На рисунках результаты представлены в виде средней арифметической и стандартного отклонения. Достоверность межгрупповых различий изученных показателей определяли с помощью непараметрического критерия Крускала–Уоллиса, с последующим множественным сравнением с использованием критерия Данна. Различия считали достоверными при минимальном уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изменения изученных показателей у животных экспериментальных групп серии 1 представлены на рис. 1 и 2. Обнаружено, что суммарное содержание кальция и фосфата в костях голени у животных групп 3, 5, 7 на третьи и седьмые сутки эксперимента статистически значимо относительно значений интактных животных не отличалось (рис. 1*А*). У животных группы 3 на 28-е сутки эксперимента суммарный уровень кальция и фосфата в костях голени травмированного сегмента был по критерию множественного сравнения достоверно выше относительно значений животных групп 1, 5, 7 ($p < 0.05$).

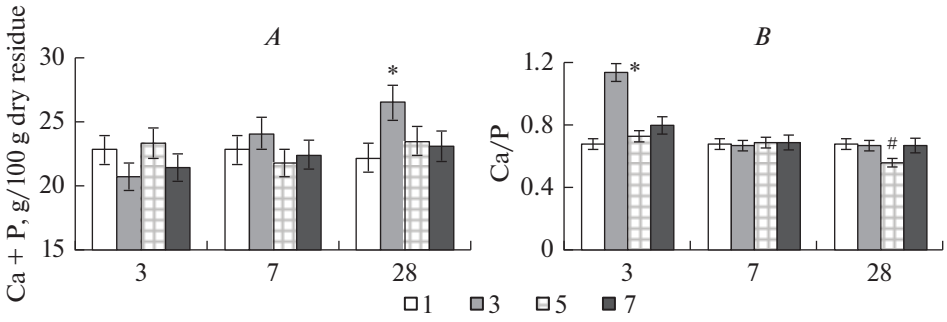


Рис. 1. Суммарное содержание кальция и фосфата (*A*), а также соотношение Ca/P (*B*) в костях голени экспериментальных животных серии 1 (группы 1, 3, 5, 7).

По оси абсцисс: 3, 7, 28 – сутки эксперимента. * – достоверные отличия значений в группе 3 относительно значений в других группах при $p < 0.05$. # – достоверные отличия значений в группе 5 относительно значений в других группах при $p < 0.05$.

Fig. 1. The total level of calcium and phosphate (A), and the Ca/P ratio (B) in the tibia bone of experimental animal series 1 (groups 1, 3, 5, 7).

On the x-axis: 3, 7, 28 – day of the experiment. * – significant differences in the values in group 3 relative to the values in other groups at $p < 0.05$. # significant differences in the values in group 5 relative to the values in other groups at $p < 0.05$.

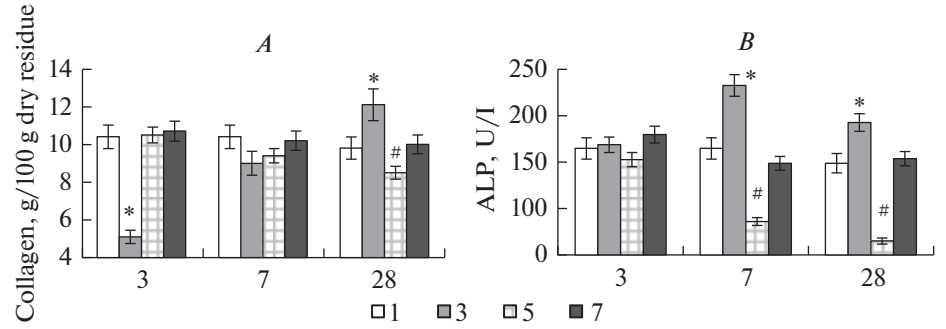


Рис. 2. Содержание коллагена в костях голени (*A*) и активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови (*B*) экспериментальных животных серии 1 (группы 1, 3, 5, 7).

По оси абсцисс: 3, 7, 28 – сутки эксперимента. * – достоверные отличия значений в группе 3 относительно значений в других группах при $p < 0{,}05$. # – достоверные отличия значений в группе 5 относительно значений в других группах при $p < 0.05$.

Fig. 2. The level of collagen (*A*) and the activity of alkaline phosphatase in the blood serum (*B*) in the tibia bone of experimental animals of series 1 (groups 1, 3, 5, 7).

On the x-axis: 3, 7, 28 – day of the experiment. * – significant differences in the values in group 3 relative to the values in other groups at $p < 0.05$. # – significant differences in the values in group 5 relative to the values in other groups at $p < 0.05$.

Соотношение Ca/P у животных группы 3 на третьи сутки после травмы было значимо ($p < 0.05$) выше относительно значений других групп (рис. 1*B*). На 28-е сутки эксперимента соотношение Ca/P было достоверно ниже у животных группы 5 относительно показателей трех других групп ($p < 0.05$).

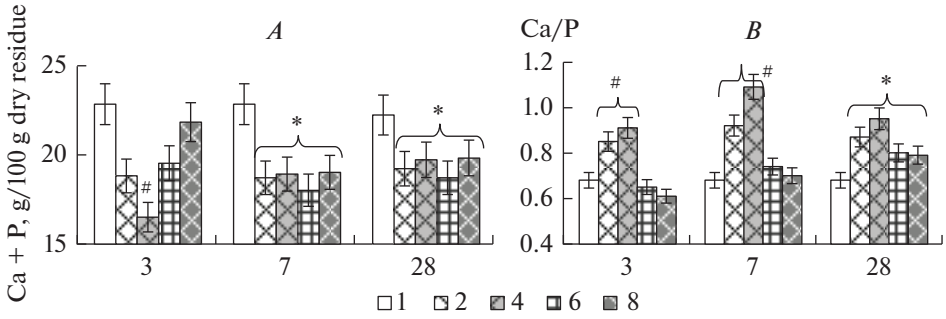


Рис. 3. Суммарное содержание кальция и фосфата (*A*), а также соотношение Ca/P (*B*) в костях голени экспериментальных животных серии 2 (группы 1, 2, 4, 6, 8).

По оси абсцисс: 3, 7, 28 – сутки эксперимента. * – достоверные отличия значений в группах 2, 4, 6, 8 относительно значений в группе 1 при $p < 0{,}05$. # – достоверные отличия значений в группе 4 (а) и группах 2, 4 (*B*) относительно значений в других группах при $p < 0.05$.

Fig. 3. The total level of calcium and phosphate (*A*), and the Ca/P ratio (*B*) in the tibia bone of experimental animal series 2 (groups 1, 2, 4, 6, 8).

On the x-axis: 3, 7, 28 – day of the experiment. * – significant differences in the values in groups 2, 4, 6, 8 relative to the values in group 1 at $p < 0.05$. # – significant differences between the values in group 4 (a) and groups 2, 4 (b) relative to the values in other groups at $p < 0.05$.

Содержание коллагена в костях поврежденного сегмента у животных группы 3 на третьи сутки после травмы было значимо ($p < 0.05$) ниже относительно значений других групп (рис. 2*A*). На 28-е сутки эксперимента уровень коллагена в костях голени у животных группы 3 по критерию множественного сравнения был выше, а у животных группы 5 ниже, относительно показателей трех других групп ($p < 0.05$).

Активность ЩФ в сыворотке крови у животных группы 3 на 7-е и 28-е сутки эксперимента была значимо выше относительно значений других групп ($p < 0.05$), а у животных группы 5 в эти же сроки, наоборот, была значимо ниже относительно значений других групп ($p < 0.05$) (рис. 2*B*).

Изменения изученных показателей у животных экспериментальных групп серии 2 представлены на рис. 3 и 4. Обнаружено, что на третьи сутки эксперимента суммарное содержание кальция и фосфата в костях голени у животных группы 4 было значимо ниже значений животных других групп ($p < 0.05$) (рис. 3*A*). На 7-е и 28-е сутки эксперимента уровень минералов в костях голени мышей групп 2, 4, 6, 8 был статистически значимо ($p < 0.05$) ниже относительно значений интактных животных (группа 1).

Соотношение Ca/P у животных групп 2 и 4 на третьи и седьмые сутки эксперимента было значимо ($p < 0.05$) выше относительно значений других групп (рис. 3*B*). На 28-е сутки эксперимента соотношение Ca/P было достоверно выше у мышей групп 2, 4, 6, 8 относительно значений интактных животных (группа 1) ($p < 0.05$).

Содержание коллагена в костях голени у животных групп 2, 4, 6, 8 на всех сроках эксперимента было значимо ($p < 0.05$) ниже относительно значений группы 1 (рис. 4*A*). При этом уровень коллагена достоверно ($p < 0.05$) отличался и между экспериментальными группами. Так, его уровень на третьи и седьмые сутки эксперимента снижался в ряду: группа 2 > группа 4, 6 > группа 8; на 28-е сутки в ряду: группа 2, 4 > > группа 6 > группа 8.

Активность ЩФ в сыворотке крови животных групп 4, 6, 8 на третьи сутки эксперимента была достоверно выше, а в группе 2 – ниже относительно значений других групп ($p < 0.05$) (рис. 4*B*). На седьмые сутки эксперимента активность ЩФ у

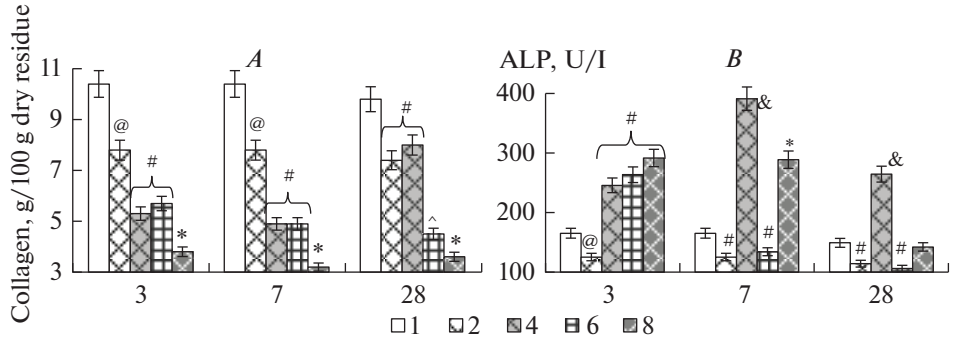


Рис. 4. Содержание коллагена в костях голени (*A*) и активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови (*B*) экспериментальных животных серии 2 (группы 1, 2, 4, 6, 8).

По оси абсцисс: 3, 7, 28 – сутки эксперимента. @ – достоверные отличия значений в группе 2 относительно значений в других группах при $p < 0.05$. & – достоверные отличия значений в группе 4 относительно значений в других группах при $p < 0.05$. ^ – достоверные отличия значений в группе 6 относительно значений в других группах при $p < 0.05$. * – достоверные отличия значений в группе 8 относительно значений в других группах при $p < 0.05$. # – достоверные отличия значений в отмеченных группах относительно значений в других группах при $p < 0.05$.

Fig. 4. The level of collagen (*A*) and the activity of alkaline phosphatase in the blood serum (*B*) in the tibia bone of experimental animals of series 1 (groups 1, 2, 4, 6, 8).

On the x-axis: 3, 7, 28 – day of the experiment. @ – significant differences in the values in group 2 relative to the values in other groups at $p < 0.05$. & – significant differences in the values in group 4 relative to the values in other groups at $p < 0.05$. ^ – significant differences in the values in group 6 relative to the values in other groups at $p < 0.05$. * – significant differences in the values in group 8 relative to the values in other groups at $p < 0.05$. # – significant differences in the values of the marked groups relative to the values in other groups at $p < 0.05$.

животных групп 4, 8 была значимо выше, а в группах 2, 6 – ниже относительно активности фермента в других группах ($p < 0.05$). На 28-е сутки эксперимента активность ЩФ в группе 4 была выше, а у животных группы 2, 6 ниже относительно значений других групп ($p < 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные показали, что при сбалансированном рационе питания восстановление количественного состава компонентов матрикса костей поврежденного после перелома сегмента конечности проходило через последовательное снижение уровня минералов и коллагена в остром периоде (3-е сутки), с последующим их увеличением к 28-м суткам. Отмеченная нами динамика вполне согласуется с этапами репаративного остеогенеза [20].

При гравитационной разгрузке конечности в течение 28 суток мы также наблюдали, в целом ожидаемое, снижение содержания коллагена в кости [21]. Однако, нами обнаружено, что уровень минеральной компоненты при ГР значимо в этот период не снижался, однако достоверно изменялось соотношение минералов в пользу преобладания фосфата (снижение Ca/P соотношения).

Восстановление целостности кости после ее повреждения в условиях ГР при сбалансированном рационе питания не сопровождалось статистически достоверными изменениями уровня минералов и коллагена в костях изученного сегмента. Это свидетельствует о том, что ГР слабо влияла на интенсивность формирования костного матрикса в костях голени после перелома при сбалансированном рацио-

не. Такая картина, видимо, связана с тем, что системные и местные реакции, возникающие в организме животных в ответ на травматический стресс, практически полностью нивелировали физиологические эффекты, вызываемые ГР.

Изменения количественного содержания минералов и коллагена в кости после ее перелома в условиях неполноценного по белку рациона на фоне ГР имели большее число статистически значимых отличий, чем у животных, находившихся на сбалансированном рационе.

Прежде всего нужно отметить, что недостаточность белка в рационе сама по себе вызывала достоверное снижение уровня минералов в кости, при повышении Ca/P соотношения. При этом данные изменения минерального состава кости не усугублялись ни после перелома, ни при ГР, ни при сочетанном действии этих факторов.

В свою очередь у мышей, находившихся на неполноценном по белку рационе, уровень коллагена в костях снижался в зависимости от экспериментальной модели. Так, минимальное снижение накопления коллагена отмечено у интактных животных (группа 2). У животных с переломом костей голени (группа 4) уровень коллагена после заметного снижения в раннем посттравматическом периоде (3–7-е сутки) восстанавливался до значений интактных животных (группа 2) к 28-м суткам. При переломе костей голени на фоне ГР и неполноценного белкового питания содержание коллагена в кости было достоверно ниже значений всех других экспериментальных групп.

Эти наблюдения показывают, что: 1) неполноценное белковое питание способствует потере органического компонента кости, что вполне согласуется с данными других исследователей [22, 23]; 2) у животных после перелома голени на фоне ГР неполноценное белковое питание является фактором, способствующим существенному снижению интенсивности накопления органической компоненты костного матрикса.

Далее, если проанализировать изменения активности ЩФ сыворотки крови в динамике эксперимента, то можно выделить группы животных с моделью ГР (группа 5, 6), для которых отмечалось наибольшее падение активности данного фермента, что может являться следствием значительного снижения остеосинтетических процессов у животных указанных групп [24]. Это наблюдение свидетельствует о том, что снижение уровня коллагена у мышей при ГР (вне зависимости от полноценности пищевого рациона) происходило за счет снижения синтеза данного белка, а не за счет роста процессов его распада. Такое снижение уровня коллагена объясняет наблюдаемое нами изменение у всех животных с белковым ограничением баланса Ca/P в кости. Это происходит вследствие недостатка синтеза коллагена, что ведет к нарушению формирования полноценного костного минерала [25].

Механизмы нарушений формирования органического матрикса кости после ее перелома на фоне ГР и пищевой белковой недостаточности, по полученным нами данным, могут быть следующими. В условиях ГР при полноценном пищевом рационе, в связи со снижением функциональной активности кости, по механизмам мехонотрансдукции происходит снижение синтеза коллагена [26]. Учитывая, что костный матрикс постоянно самообновляющаяся система [27], это приводит к тому, что с увеличением длительности ГР уровень органического компонента костного матрикса начинает снижаться. В свою очередь перелом является достаточно мощным фактором, который на системном и местном уровне стимулирует процессы костеобразования [28–30]. Восстановление же целостности кости в условиях ГР конечности при полноценном белковом рационе, как показало наше исследование, происходило на фоне суммации двух противоположных эффектов (травматический стресс и ГР), что в целом не приводило к достоверному снижению синтеза коллагена в этих условиях.

Нами показано, что накопление коллагена в кости при ее репарации после перелома на фоне ГР и пищевой белковой недостаточности было достоверно снижено при всех экспериментальных моделях. Важно отметить, что такое снижение оказа-

лось критическим для репарации кости, так как даже системные и локальные механизмы, обеспечивающие остеогенез после перелома, оказались недостаточными для обеспечения синтеза коллагена в условиях неполноценного белкового рациона, особенно в условиях восстановления целостности кости на фоне ГР.

Таким образом, неполноценность пищевого рациона по содержанию белка является более важным, чем ГР фактором, замедляющим формирование органического компонента костного матрикса. При этом взаимодействие этих двух факторов в посттравматический период усугубляет этот процесс. В клиническом приложении наше исследование может быть применено для обоснования необходимости поддержания полноценного белкового рациона в восстановительном периоде после переломов костей конечностей как важного фактора, обеспечивающего формирование органического и минерального матрикса костного регенерата. Разработка таких пищевых рационов, обеспечивающих оптимальный рост и репарацию кости – достаточно перспективное направление [31, 32].

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках государственного задания на осуществление научных исследований и разработок ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. акад. Г.А. Илизарова” Минздрава России.

Авторы статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Christiansen B.A., Emami A.J., Fyhrie D.P., Satkunananthan P.B., Hardisty M.R.* Trabecular bone loss at a distant skeletal site following noninvasive knee injury in mice. J. Biomech. Eng. 137(1): 0110051–0110056. 2015. https://doi.org/10.1115/1.4028824
2. *Fischer V., Haffner-Luntzer M., Amling M., Ignatius A.* Calcium and vitamin D in bone fracture healing and post-traumatic bone turnover. Eur. Cell. Mater. 35: 365–385. 2018. https://doi.org/10.22203/eCM.v035a25
3. *Osipov B., Emami A.J., Christiansen B.A.* Systemic bone loss after fracture. Clin. Rev. Bone Miner. Metab. 16(4): 116–130. 2018. https://doi.org/10.1007/s12018-018-9253-0
4. *Грубер Н.М., Валеев Е.К., Шульман А.А., Яфарова Г.Г.* Патогенетические механизмы репаративного остеогенеза при сочетанной травме. Практическая медицина. (4–1): 79–81. 2016. [*Gruber N.M., Valeev E.K., Shulman A.A., Yafarova G.G.* Pathogenetic mechanisms of reparative osteogenesis after combined trauma. Pract. med. (4–1): 79–81. 2016. (In Russ)].
5. *Резник Л.Б., Рожков К.Ю., Дзюба Г.Г., Заводиленко К.В.* Особенности формирования костной мозоли на фоне контактного низкочастотного ультразвукового воздействия в клинике и эксперименте. Политравма. (2): 87–92. 2018. [*Reznik L.B., Rozhkov K.Yu., Dzyuba G.G., Zavodilenko K.V.* Features of formation of bone callus at the background of contact low-frequency ultrasound in the clinic and in the experiment. Polytrauma. (2): 87–92. 2018. (In Russ)].
6. *Stogov M.V., Luniova S.N., Tkachuk E.A.* Accumulation of calcium, phosphate, and collagen in bones and accumulation of creatine in muscles of mice with acute hepatic intoxication during shin fracture healing. Bull. Exp. Biol. Med. 149(5): 575–577. 2010.
7. *Косимов А.А., Ходжанов И.Ю., Горбач Е.Н., Силантьева Т.А., Дюрягина О.В., Борзунов Д.Ю.* Морфологические особенности регенерации костной ткани при экспериментальном моделировании рефрактуры длинных трубчатых костей в периоде их роста. Гений ортопедии. 25(4): 555–560. 2019. [*Kosimov A.A., Khodzhanov I.Iu., Gorbach E.N., Silanteva T.A., Diuriagina O.V., Borzunov D.Yu.* Morphological features of bone regeneration in simulated refracture of growing long bones. Genij Ortopedii. 25(4): 555–560. 2019. (In Russ)].
8. *Кутиков С.А., Борзунов Д.Ю., Осипова Е.В.* Особенности минерализации костной ткани в зоне дефекта у пациентов с врожденным ложным суставом костей голени. Забайкальск. мед. вестник. (3): 111–116. 2014. [*Kutikov S.A., Borzunov D.Yu., Osipova E.V.* Features bone mineral density in the deffect zone of patients with congenital pseudoarthrosis of the tibia. Transbaikalian Med. Bull. (3): 111–116. 2014. (In Russ)].
9. *van Geel T.A., Huntjens K.M., van den Bergh J.P., Dinant G.J., Geusens P.P.* Timing of subsequent fractures after an initial fracture. Curr. Osteopor. Rep. 8(3): 118–122. 2010. https://doi.org/10.1007/s11914-010-0023-2
10. *Киреева Е.А., Стогов М.В.* Динамика изменения энергетических субстратов в мышцах и печени мышей после скелетной травмы на фоне гравитационной разгрузки конечности. Рос.

физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 102(9): 1074–1081. 2016. [*Kireeva E.A., Stogov M.V.* The dynamics of energy substrate changes in mice muscles and liver after skeletal injury through limb gravitation unloading. Russ. J. Physiol. 102(9): 1074–1081. 2016. (In Russ)].

11. *Goodman C.A., Hornberger T.A., Robling A.G.* Bone and skeletal muscle: Key players in mechanotransduction and potential overlapping mechanisms. Bone. 80: 24–36. 2015. https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.04.014
12. *Hendy A.M., Spittle M., Kidgell D.J.* Cross education and immobilisation: mechanisms and implications for injury rehabilitation. J. Sci. Med. Sport. 15(2): 94–101. 2012. https://doi.org/10.1016/j.jsams.2011.07.007
13. *Кокорева И., Кореньков А., Соловьев И.* Влияние препарата остеомед форте на сроки консолидации переломов костей у детей и подростков. Врач. 31(1): 82–85. 2020. [*Kokoreva I., Korenkov A., Solovyev I.* Effect of osteomed forte on the terms of bone fracture consolidation in children and adolescents. The Doctor. 31(1): 82–85. 2020. (In Russ)].
14. *Корж Н.А., Дедух Н.В.* Использование оссеин-гидроксиапатитного комплекса в лечении остеопороза и переломов (обзор литературы). Ортопедия, травматол. и протезиров. (2): 120–129. 2016. [*Korzh M.O., Dedukh N.V.* Application of ossein-hydroxyapatite complex for osteoporosis and fracture treatment (literature review). Orthopaedics, Traumatol. and Prosthetics. (2): 120–129. 2016. (In Russ)].
15. *Fischer V., Haffner-Luntzer M., Prystaz K., Vom Scheidt A., Busse B., Schinke T., Amling M., Ignatius A.* Calcium and vitamin-D deficiency marginally impairs fracture healing but aggravates posttraumatic bone loss in osteoporotic mice. Sci. Rep. 7(1): 7223. 2017. https://doi.org/10.1038/s41598-017-07511-2
16. *Karpouzos A., Diamantis E., Farmaki P., Savvanis S., Troupis T.* Nutritional aspects of bone health and fracture healing. J. Osteoporos. 2017: 4218472. 2017. https://doi.org/10.1155/2017/4218472
17. *Киреева Е.А., Стогов М.В., Карасев А.Г.* Лабораторные биохимические маркеры тяжести травмы в остром периоде после множественных переломов костей конечностей. Клин. лабор. диагн. 61(6): 348–351. 2016. [*Kireyeva E.A., Stogov M.V., Karasev A.G.* The laboratory biochemical markers of severity of trauma in acute period after multiple fractures of bones of extremities. Klin. Lab. Diagn. 61(6): 348–351. 2016. (In Russ)].
18. *Аметов А.С., Смоленский А.В., Капустина Н.В., Доскина Е.В.* Особенности нутрицевтивной коррекции у пациентов с переломами костей. Вопр. питания. 87(S5): 69–70. 2018. [*Ametov A.S., Smolenskii A.V., Kapustina N.V., Doskina E.V.* Features of nutraceutical correction in patients with bone fractures. Probl. Nutrit. 87(S5): 69–70. 2018. (In Russ)].
19. *Немировская Т.Л., Шенкман Б.С., Мухина А.М., Володкович Я.Ю., Саяпина М.М., Братцева Е.В., Ларина О.М.* Влияние деафферентации на размеры и миозиновый фенотип мышечных волокон при растяжении m.soleus крысы на фоне гравитационной разгрузки. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 89(3): 259–270. 2003. [*Nemirovskaia T.L., Shenkman B.S., Mukhina A.M., Volodkovich I.I., Saiapina M.M., Brattseva E.V., Larina O.M.* Effect of deafferentation on the size and myosin phenotype of muscle fibers during stretching of rat m. soleus and gravitational unloading. Russ. J. Physiol. 89(3): 259–270. 2003. (In Russ)].
20. *Bahney C.S., Zondervan R.L., Allison P., Theologis A., Ashley J.W., Ahn J., Miclau T., Marcucio R.S., Hankenson K.D.* Cellular biology of fracture healing. J. Orthop. Res. 37(1): 35–50. 2019. https://doi.org/10.1002/jor.24170
21. *Liu J., Wang J., Guo Y.* Effect of collagen peptide, alone and in combination with calcium citrate, on bone loss in tail-suspended rats. Molecules. 25(4): 782. 2020. https://doi.org/10.3390/molecules25040782
22. *Veronese N., Reginster J.Y.* The effects of calorie restriction, intermittent fasting and vegetarian diets on bone health. Aging Clin. Exp. Res. 31(6): 753–758. 2019. https://doi.org/10.1007/s40520-019-01174-x
23. *Darling A.L., Manders R.J.F., Sahni S., Zhu K., Hewitt C.E., Prince R.L., Millward D.J., Lanham-New S.A.* Dietary protein and bone health across the life-course: an updated systematic review and meta-analysis over 40 years. Osteoporos. Int. 30(4): 741–761. 2019. https://doi.org/10.1007/s00198-019-04933-8
24. *Halling L.C., Englund U.H., Narisawa S., Millán J.L., Magnusson P.* Isozyme profile and tissue-origin of alkaline phosphatases in mouse serum. Bone. 53(2): 399–408. 2013. https://doi.org/10.1016/j.bone.2012.12.048
25. *Murshed M.* Mechanism of bone mineralization. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 8(12): a031229. 2018. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031229
26. *Rosa N., Simoes R., Magalhães F.D., Marques A.T.* From mechanical stimulus to bone formation: A review. Med. Eng. Phys. 37(8): 719–728. 2015. https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2015.05.015
27. *Crockett J.C., Rogers M.J., Coxon F.P., Hocking L.J., Helfrich M.H.* Bone remodelling at a glance. J. Cell. Sci. 124(Pt 7): 991–998. 2011. https://doi.org/10.1242/jcs.063032

28. *Очеретина Р.Ю., Мкртчан О.З., Стогов М.В.* Морфометрические параметры сосудов дольки печени у мышей в восстановительном периоде после травмы голени. Морфология. 141(2): 32–34. 2012. [*Ocheretina R.Iu., Mkrtchan O.Z., Stogov M.V.* Morphometric parameters of hepatic lobule vessels in mice during the restorative period after leg injury. Morphology. 141(2): 32–34. 2012. (In Russ)].
29. *Majidinia M., Sadeghpour A., Yousefi B.* The roles of signaling pathways in bone repair and regeneration. J. Cell. Physiol. 233(4): 2937–2948. 2018. https://doi.org/10.1002/jcp.26042
30. *Marsell R., Einhorn T.A.* The biology of fracture healing. Injury. 42(6): 551–555. 2011. https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.03.031
31. *Dolan E., Sale C.* Protein and bone health across the lifespan. Proc. Nutr. Soc. 78(1): 45–55. 2019. https://doi.org/10.1017/S0029665118001180
32. *Roberts J.L., Drissi H.* Advances and promises of nutritional influences on natural bone repair. J. Orthop. Res. 38(4): 695–707. 2020. https://doi.org/10.1002/jor.24527

Effect of Gravitational Unloading and Food Protein Deficiency on the Accumulation of Collagen and Minerals in the Bone Matrix after a Fracture of Tibia

M. V. Stogov[a], * and E. A. Kireeva[a]

[a] *National Ilizarov Medical Research Center for Traumatology and Ortopedics, Kurgan, Russia*
**e-mail: stogo_off@list.ru*

To evaluate the effect of gravitational unloading of a damaged limb and food protein deficiency on the accumulation of collagen and minerals in the bone matrix after a fracture of tibia in mice. The study was performed on 132 male CBA mice, divided into two series of experiments. In the first series ($n = 66$) during the experiment, the mice were on a protein and carbohydrate-balanced diet. In the second series ($n = 66$), mice from a month old were on a carbohydrate, protein-depleted isocaloric diet, in which wheat gliadin served as a protein source. Within each series, animals were randomized into 4 groups: intact animals; animals that were modeled by a fracture of the tibia; animals with gravity unloading (GU) of the hind limbs; animals that underwent GU after fracture modeling. In the bones the levels of calcium, phosphate and collagen were determined. Alkaline phosphatase activity was determined in blood serum. It was found that in mice of all groups of series 2 in the bones the level of minerals and especially collagen significantly decreased. The greatest decrease in the level of collagen was observed in animals who modeled a bone fracture on the background of GU and protein nutrition deficiency. Bone repair after a fracture on the background of GU with a balanced diet was not accompanied by statistically significant changes in the level of minerals and collagen in the bones of the limb segment. *Conclusion* In mice, the healing of a shin bone fracture on the background of GU protein deficiency is a systemic factor contributing to a decrease in the rate of accumulation of the organic component of the bone matrix.

Keywords: collagen, bone mineral, fracture, gravitational unloading, protein deficiency

ЦИТИРОВАТЬ:

Стогов М.В., Киреева Е.А. Влияние гравитационной разгрузки и пищевой белковой недостаточности на накопление коллагена и минералов в костном матриксе после перелома голени. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(7): 843–852.

DOI: 10.31857/S0869813920070080

TO CITE THIS ARTICLE:

Stogov M.V., Kireeva E.A. Effect of Gravitational Unloading and Food Protein Deficiency on the Accumulation of Collagen and Minerals in the Bone Matrix after a Fracture of Tibia. Russian Journal of Physiology. 106(7): 843–852.

DOI: 10.31857/S0869813920070080

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 7, с. 853–865

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ИССЛЕДОВАНИЕ ИННЕРВАЦИИ ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ КРЫСЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕЙРАЛЬНЫХ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ

© 2020 г. Е. И. Чумасов[1, 2, *], Е. С. Петрова[1], Д. Э. Коржевский[1]

[1]Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
[2]Санкт-Петербургская государственная академии ветеринарной медицины, Санкт-Петербург, Россия
*****E-mail: iemmorphol@yandex.ru*

Поступила в редакцию 07.02.2020 г.
После доработки 21.03.2020 г.
Принята к публикации 04.05.2020 г.

Цель работы – исследовать топографию, морфологические особенности и медиаторный статус нервных аппаратов двенадцатиперстной кишки половозрелых крыс с помощью иммуногистохимических методов. Использование селективных для периферической нервной системы маркеров (PGP 9.5, синаптофизина (Syn), тирозингидроксилазы (ТН) и серотонина (5НТ)) позволило выявить в тканях стенки кишки, кроме двух основных (миентерального и подслизистого ганглиозных нервных сплетений), третье – слизистое эпителиально-ворсинчатое. С помощью сравнительного иммуногистохимического анализа установлено, что подавляющее число нервных структур (нейронов, нервных волокон, межнейронных и нейромышечных синапсов в ганглизных сплетениях) имеют PGP 9.5 иммуноположительную реакцию и холинергическую природу. Катехоламинергические и серотонинергические ($5HT^+$) нейроны в исследованных ганглиозных сплетениях отсутствуют. Предполагается, что постганглионарные симпатические волокна приходят в двенадцатиперстную кишку извне. Они участвуют в иннервации мышечных слоев кишечной стенки и артериальных сосудов, образуют перицеллюлярные синапсы на телах и дендритах парасимпатических нейронов. Внутри соединительной ткани ворсинок с помощью PGP 9.5 обнаружено большое количество терминальных холинергических варикозных аксонов, а в эпителии встречаются одиночные биполярные нейроноподобные клетки. Симпатические элементы в ворсинках не выявлены. С помощью реакции на серотонин обнаружено большое количество серотонин-синтезирующих клеток, морфологически сходных с энтерохромаффиноцитами.

Ключевые слова: двенадцатиперстная кишка крысы, иннервация, белок PGP 9.5, тирозингидроксилаза, синаптофизин, серотонин, иммуногистохимия

DOI: 10.31857/S086981392007002X

Энтеральная нервная система играет основную роль в создании координированных движений кишечника, обеспечении тканей и органов питательными веществами с целью поддержания жизнедеятельности организма. Энтеральная нервная система является частью метасимпатической нервной системы. Понятие о метасимпатической нервной системе как третьем отделе автономной нервной системы определил, а также экспериментально охарактеризовал ее главные элементы академик А.Д. Ноздрачев. Структурные элементы энтеральной нервной системы рас-

положены по всей длине стенки кишечника и представлены диффузными ганглиозными нервными сплетениями. По плотности иннервации в энтеральной нервной системе выделяют два взаимосвязанных нервных сплетения: межмышечное (Ауэрбаха) и подслизистое (Мейснера). Миентеральное сплетение Ауэрбаха локализуется между продольным и кольцевым мышечными слоями кишечника, а Мейснера – в подслизистой оболочке. Известно, что нейроны миентерального сплетения регулируют моторику желудка и кишечника, а нейроны подслизистого сплетения, по предположению ряда авторов, участвуют в поддержании водно-солевого баланса и циркуляции плазмы крови и лимфы в кровеносных и лимфатических сосудах слизистой оболочки [1–3]. Следует подчеркнуть, что в отличие от наиболее изученного в морфологическом отношении миентерального сплетения, многие вопросы о структуре и функции нейронов подслизистого сплетения, а также об их участии в иннервации тканей слизистой оболочки остаются недостаточно выясненными.

Использование в 60–70-е года прошлого столетия импрегнационных и гистохимических методов и электронной микроскопии внесли существенный вклад в изучение проблемы иннервации желудочно-кишечного тракта. Было уточнено распределение ганглиев вдоль различных отделов кишечной трубки, изучена морфология многих нейронов и нервных волокон на светооптическом и ультраструктурном уровне, описаны различные типы синапсов (аксосоматических, аксодендритических, аксошипиковых) [4–9]. На основании электрофизиологических, фармакологических, гистохимических, биохимических и ультраструктурных признаков выделено более десяти различных типов энтеральных нейронов. Установлено, что большинство нейронов и нервных волокон собственно ганглиозных сплетений, а также нервов, входящих извне, являются холинергическими. Они являются наиболее изученными и считаются основными внутренними структурами энтеральной нервной системы, обеспечивающими моторику стенки кишки.

С помощью иммуногистохимических исследований последних десятилетий в нейронах и нервных волокнах периферической нервной системы обнаружен ряд специфических регуляторных пептидов и разработан большой набор маркеров для их выявления [10]. Некоторые из них: холинацетилтрансфераза (ХАТ), тирозингидроксилаза (ТН), серотонин, вещество Р, нейропептид Y и другие были выявлены в тканях желудочно-кишечного тракта. В стенке двенадцатиперстной кишки как в нервных клетках, так и в межганглионарных нервах с помощью иммуногистохимических методов было обнаружено более пяти нейропептидов: вазоактивный интестинальный пептид, вещество Р, соматостатин, мет-энкефалин, бомбензин [11]. Использование иммуногистохимических методов для дальнейшего изучения морфологии и иннервации кишечной стенки весьма актуально. Они необходимы для выяснения нерешённых до конца вопросов о функциональных межнейронных взаимоотношениях и о нейромедиаторном статусе нервных элементов различных отделов желудочно-кишечного тракта позвоночных животных и человека.

Целью настоящей работы явилось исследование нервных аппаратов двенадцатиперстной кишки половозрелых крыс с помощью селективных нейроиммуногистохимических методов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена на половозрелых (3–4 мес., $n = 8$) крысах линии Вистар массой 200–250 г. При содержании и умерщвлении животных соблюдали международные правила Хельсинской декларации о гуманном обращении с животными и “Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных” (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.). Исследование было одоб-

рено Локальным этическим комитетом Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия (протокол № 3 от 30 ноября 2017 г.). Крыс умерщвляли передозировкой паров этилового эфира, выделяли фрагменты двенадцатиперстной кишки (ДПК) размером приблизительно 1.5 см из области, располагающейся вблизи поджелудочной железы, и фиксировали в растворе цинк-этанол-формальдегида [10]. После обезвоживания в спиртах возрастающей концентрации материал заливали в парафин и изготавливали срезы толщиной 5 мкм. Часть срезов окрашивали толуидиновым синим по Нисслю, эозином и астровым синим. Иммуногистохимические реакции на три нейральных маркера: белок PGP 9.5, синаптофизин (Syn) и тирозингидроксилазу (ТН) проводили на парафиновых срезах. Паннейрональный маркер периферической нервной системы – белок PGP 9.5 применяли для выявления всех нервных структур кишки: нервных стволов и пучков, нервных сплетений и клеток без учета их медиаторной специфики [12]. Для его выявления использовали поликлональные кроличьи антитела в разведении 1 : 200 (Spring Bioscience, США). Для выявления синаптофизин-положительных терминалей [13] применяли поликлональные кроличьи антитела к синаптофизину (MONOSAN, Нидерланды). Для идентификации катехоламинергических структур симпатической нервной системы применяли поликлональные кроличьи антитела к ТГ в разведении 1 : 1000 (Abcam, Великобритания). Для выявления серотонина использовали кроличьи поликлональные антитела к 5-гидроокситриптамину (5-НТ) (Leica-Novocastra, Великобритания). В качестве вторичных реагентов использовали реактивы из набора Super Sensitive Polymer-HRP Detection System (Bio Genex, США). Для иммуногистохимических реакций проводили отрицательный контроль с нанесением на срезы вместо первичных антител их разбавителя (Dako, Дания). Анализ гистологических препаратов осуществляли с помощью микроскопа Leica DM 750 (Leica, Германия) и цифровой камеры Leica ICC 50 (Leica, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С помощью иммуногистохимической реакции на PGP 9.5 (рис. 1) на поперечных срезах через кишку крысы хорошо выявляются следующие сплетения: два ганглиозных – межмышечное и подслизистое и третье – слизистое ворсинчатое сплетение. Наиболее выраженным и богатым нервными элементами является межмышечное нервное сплетение. Оно располагается между продольным и циркулярным гладкомышечными слоями стенки, в объеме имеет решетчатый многослойный вид, клеточные и волокнистые элементы четко окрашиваются при реакции на PGP 9.5 в черно-коричневый цвет. В сплетении выявляются крупные, средние и мелкие ганглии, располагающиеся по ходу нервных стволиков. Количество составляющих нейронов различно: от нескольких десятков до сотни. Обращает на себя внимание высокая плотность расположения тканевых структур внутри ганглиев и сплетений. Многочисленные PGP 9.5^{+} пучки нервных волокон, выходящие из ганглиев, участвуют не только в формировании межганглионарных связей, но и в иннервации мышечной стенки кишки. На поперечных срезах в глубине мышечных слоев хорошо прослеживаются фрагменты различной толщины стволиков и пучков нервных волокон, формирующих широкопетлистое миоэнтеральное сплетение (рис. 1).

Подслизистое нервное сплетение, в отличие от миентерального сплетения, представлено узкопетлистой сетью нервных пучков и микроганглиев, состоящих из мелких групп нервных клеток (рис. 2*B*), имеющих размеры от 25 до 35 мкм, округлую или грушевидную форму. Между микроганглиями изредка видны связи.

Небольшая часть тонких нервных пучков из микроганглиев подслизистого нервного сплетения вступает в вышележащие миоэтеральные слои. На рис. 2 видно, что ганглии межмышечного нервного сплетения находятся в тесном окруже-

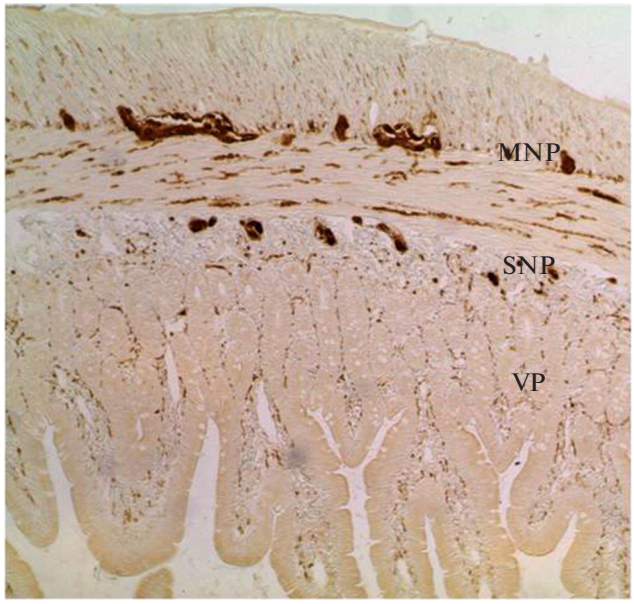


Рис. 1. Поперечный срез двенадцатиперстной кишки крысы. MNP – межмышечное нервные сплетения; SNP – подслизистое нервное сплетение; VP – слизистое ворсинчатое сплетение. Иммуногистохимическая реакция на PGP 9.5. Ув.: ×100.

Fig. 1. A transverse section of the rat duodenum. MNP – intramuscular nerve plexus; SNP – submucosal nerve plexus; VP – mucous villous plexus. Immunohistochemical reaction to PGP 9.5. ×100.

нии гладкомышечных клеток, в то время как микроганглии и отдельные нейроны подслизистого нервного сплетения располагаются в рыхлой соединительной ткани и находятся в плотном окружении пучков коллагеновых волокон.

Нередко можно проследить, как большинство тонких пучков безмиелиновых аксонов, отходящих от нервных клеток микроганглиев подслизистого нервного сплетения, разветвляясь на границе подслизистой и слизистой оболочек, в составе артериол и рыхлой соединительной ткани входят внутрь ворсинок и формируют в них внутреннее терминальное сплетение. Оно состоит из варикозных аксонов, которые прослеживаются внутри ворсинок на всем их протяжении вплоть до апикального конца. Они избирательно выявляются при реакции на PGP 9.5 и окрашиваются в черный цвет. Между ворсинками в слизистой оболочке они формируют густую ячеистую сеть. Внутри ворсинок многие из таких аксонов находятся в тесной связи с эндотелием обменных капилляров, включая синусоидные и лимфотические сосуды, а часть из них на большом протяжении прилежит непосредственно к базальной мембране эпителия ворсинок (рис. 3). На основании этих признаков можно заключить, что терминальные варикозные аксоны представляют собой дистантные нервные окончания типа en passant.

В настоящем исследовании в эпителии ворсинок слизистой оболочки ДПК обнаружены нейроноподобные клетки, содержащие белок PGP 9.5 (рис. 3). Это клетки небольших размеров (20–25 мкм) со светлыми круглыми ядрами и иммунореактивной цитоплазмой. Они имеют, как правило, клиновидную или веретеновидную форму. Тела этих клеток находятся в эпителиальном слое в тесном контакте с энтероцитами. От одного полюса клетки отходит относительно длинный отросток, который прослеживается вплоть до выхода в просвет кишки. На другом полюсе клетки наблюдается несколько коротких булавовидных выростов, окрашенных в черный цвет,

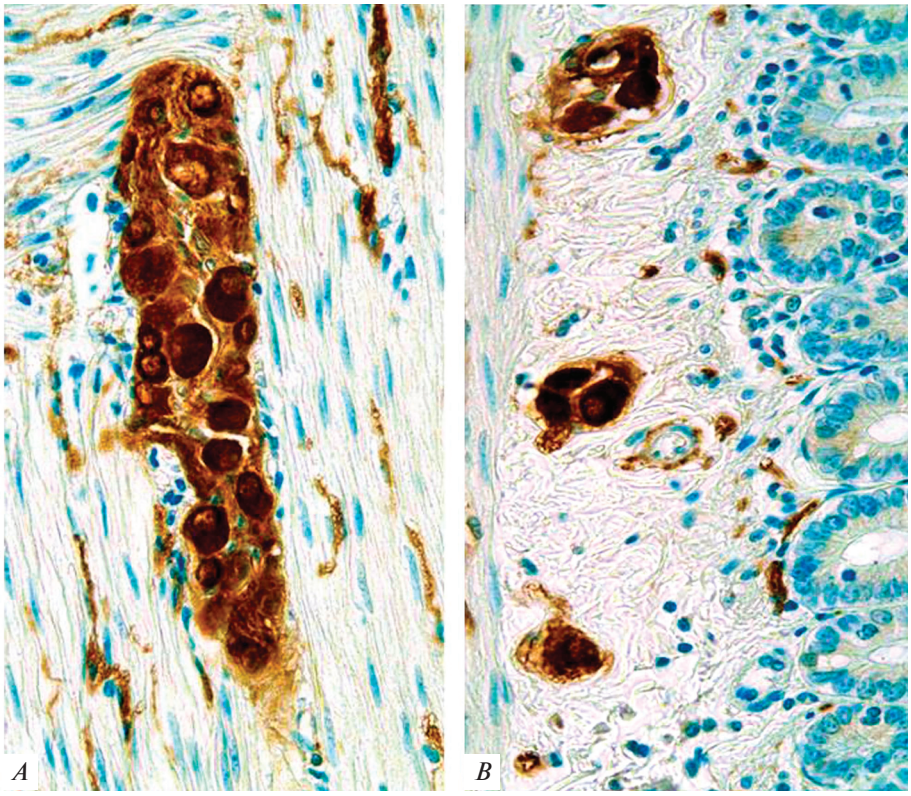


Рис. 2. Ганглии межмышечного (*A*) и подслизистого (*B*) нервного сплетения. Иммуногистохимическая реакция PGP 9.5, окраска толуидиновым синим. Ув.: ×200.
Fig. 2. Ganglia of intramuscular nerve plexus (*A*) and submucosal nerve plexus (*B*). Immunohistochemical reaction to PGP 9.5, toluidine blue staining. ×200.

которые тесно прилежат к стенке капилляра, заполненного эритроцитами. На основании морфологических особенностей можно предположить, что эти нейроноподобные клетки в эпителии ворсинок могут представлять собой хемосенсорные элементы внутренней рефлекторной дуги, вынесенные в стенку кишки.

С помощью иммуногистохимической реакции на синаптофизин (Syn) показано, что в межмышечном и подслизистом сплетениях выявляется плотная сеть перицеллюлярных синаптических аппаратов, вплотную окружающих перикарионы нейронов и их дендриты. Пресинаптические бутоны могут иметь вид пуговок, колечек, булавовидных структур. Густые тонкие терминальные сеточки их варикозных Syn^+ аксонов наблюдаются также вокруг пучков миоцитов и прилежащих к ним капилляров в мышечной стенки кишки, а также вокруг мелких артерий и артериол, находящихся в соединительной ткани подслизистой оболочки (рис. 4). На рис. 4 видно, что плотность перицеллюлярной сети синапсов вокруг нейронов ганглиев настолько высока, что на рисунке только в некоторых местах определяются окрашенные эозином перикарионы иммунонегативных нервных клеток. Типичные синаптические терминальные сети варикозных аксонов часто встречаются и вокруг атериальных кровеносных сосудов. Они представляют собой дистантные синапсы типа en passant и отвечают за иннервацию и регуляцию кровотока.

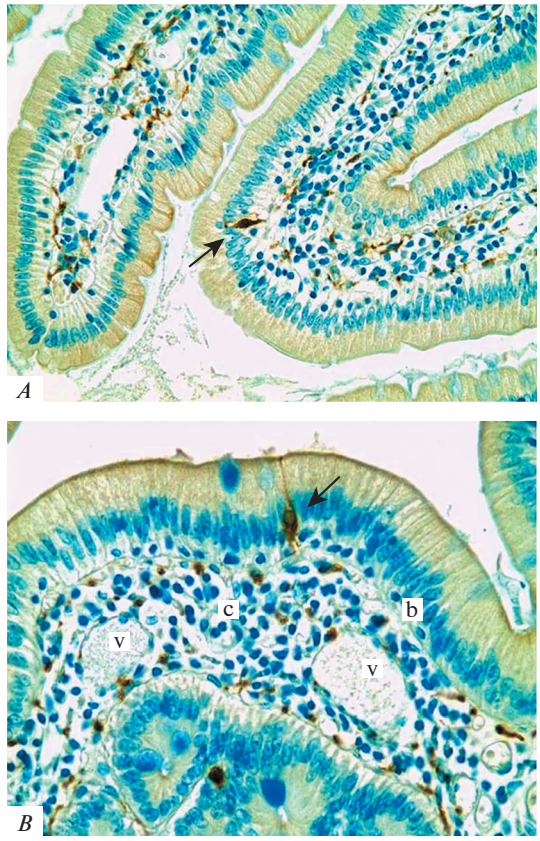


Рис. 3. Фрагменты терминальных варикозных аксонов в рыхлой соединительной ткани ворсинок, находящиеся в тесной связи с базальной мембраной (b), капиллярами (c), синусоидными и лимфатическими сосудами (v). Стрелки – нейроноподобные клетки внутри эпителия ворсинок кишки. Иммуногистохимическая реакция на PGP 9.5. Окраска толуидиновым синим. Ув.: × 100 (*A*); ×400 (*B*).

Fig. 3. Fragments of terminal varicose axons in the connective tissue of the villi associated with the basement membrane (b), capillaries (c), sinusoidal and lymphatic vessels (v). Arrows are neuron-like cells inside the intestinal villi epithelium. Immunohistochemical reaction to PGP 9.5. Toluidine blue staining. ×100 (*A*); ×400 (*B*).

PGP 9.5 – иммунопозитивные тонкие пучки нервных волокон, формирующих подслизистое нервное сплетение, тесно связаны с кровеносными сосудами и встречаются в области дуоденальных желез, располагающихся в подслизистой основе двенадцатиперстной кишки. Как правило, в области ацинусов дуоденальных желез варикозные терминали отсутствовали (рис. 5*A*), более иннервируемыми оказались выводные протоки этих желез.

Для определения медиаторного статуса нервных структур двенадцатиперстной кишки мы использовали сравнительное исследование – иммуногистохимическое выявление нескольких маркеров: PGP 9.5, TH и Syn. На представленных выше иллюстрациях видно, что большинство структур энтеральной нервной системы двенадцатиперстной кишки: многочисленные ганглии, нервные стволики, перицеллюлярные аппараты, терминальные сети вокруг сосудов, многочисленные терминали варикозных аксонов, иннервирующие мышечные слои стенки кишки, являются,

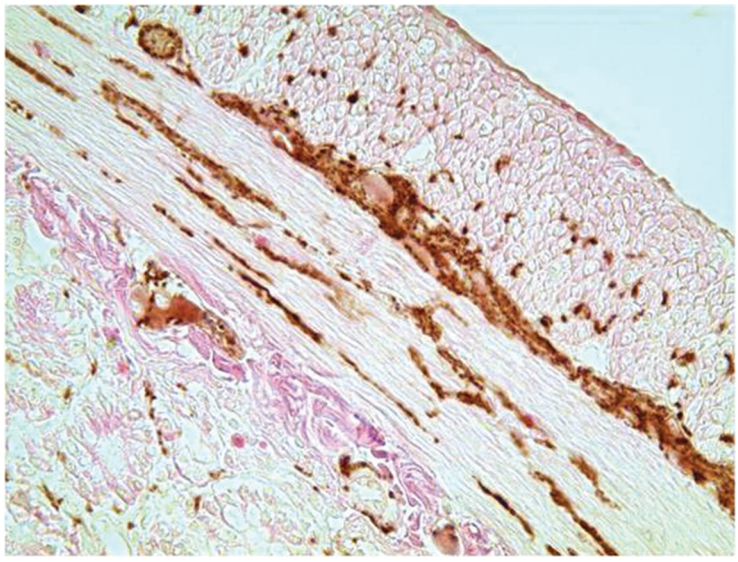


Рис. 4. Густая сеть синаптофизин-иммунореактивных перицеллюлярных аппаратов вокруг нейронов ганглиев ММНС и ПСНС. Иммуногистохимическая реакция на Syn. Окраска эозином. Ув.: ×400.
Fig. 4. A network of synaptophysin-immunoreactive pericellular apparatus around the neurons of the intramuscular nerve plexus and submucosal nerve plexus ganglia. Immunohistochemical reaction to synaptophysin. Eosin staining. ×400.

главным образом, PGP 9.5-иммунопозитивными, но не ТН-иммунопозитивными, что предположительно может свидетельствовать об их холинергической природе.

Чтобы отличить холинергические нервные аппараты от катехоламинергических был использован маркер ТН, селективно выявляющий только симпатические структуры. Оказалось, что в мышечных слоях двенадцатиперстной кишки катехоламинергические аппараты встречаются значительно реже PGP 9.5-содержащих (рис. 5). В мышечной стенке кишечника встречаются лишь редкие пучки $ТН^+$ нервных волокон ремаковского типа. Они представляют собой тончайшие симпатические варикозные аксоны, которые следуют вдоль пучков миоцитов и прилежащих к ним капилляров (рис. 5*B*).

Значительно чаще $ТН^+$ симпатические нервные волокна и их терминальные структуры встречаются внутри ганглиозных сплетений. Удалось проследить, как из межганглионарных нервных стволиков и пучков отходят тонкие претерминальные $ТН^+$ волоконца, проникают в ганглии и разветвляются на тончайшие варикозные терминали. Последние следуют между телами иммунонегативных холинергических нейронов и образуют вокруг их перикарионов нежную сеть из концевых и касательных (et passant) синаптических бутонов (рис. 6). Подобные $ТН^+$ синаптические аппараты найдены вокруг мелких артерий и артериол в межмышечном и подслизистом нервных сплетениях. Следует отметить, что в ворсинках слизистой оболочки $ТН^+$ симпатические структуры не обнаруживаются.

Все описанные выше катехоламинергические синаптические аппараты наряду с холинергическими выполняют множество функций. Они участвуют в сложных механизмах регуляции межнейронных и межтканевых взаимоотношений, в поддержании тканевого метаболизма, моторных и сосудисто-двигательных рефлексах стенки кишки.

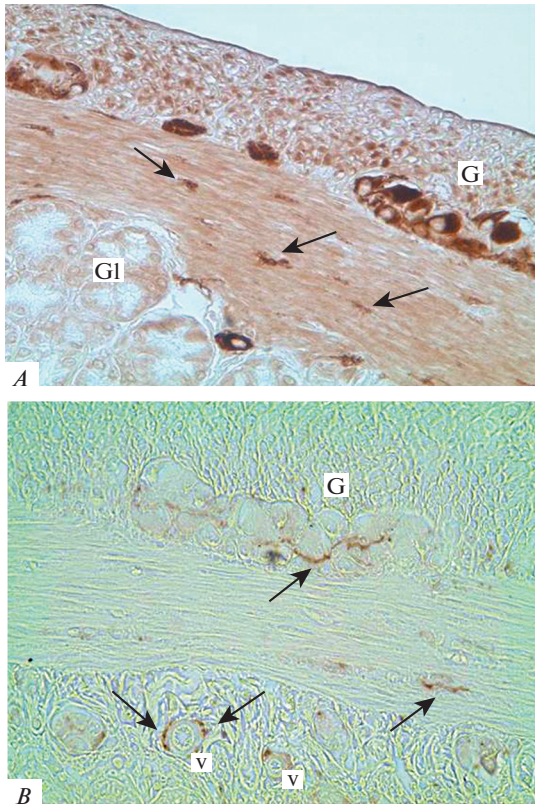


Рис. 5. Сравнительная оценка выявления холинергических (*A*) и катехоламинергических (*B*) нервных структур в стенке двенадцатиперстной кишки крысы. Иммуногистохимическая реакция на PGP 9.5 (*A*) и TH (*B*). G – ганглий; Gl – железы в подслизистой основе ДПК; v – сосуды, стрелки – синаптические терминали. Ув: ×400 (*A*); ×1000 (*B*).

Fig. 5. Comparison of cholinergic (*A*) and catecholaminergic (*B*) nerve structures detection in the wall of the rat duodenum. G – ganglion; Gl – submucosal glands of the duodenum; v – vessels, arrows – synaptic terminals. Immunohistochemical reaction to PGP 9.5 (*A*) and TH (*B*). ×400 (*A*); ×1000 (*B*).

С помощью иммуногистохимической реакции на 5-НТ в стенке двенадцатиперстной кишки были выявлены иммуноположительные к данному ферменту мелкие (от 9 до 15 мкм в диаметре) серотонин-содержащие клетки. Большинсто этих клеток локализуется в области крипт ворсинок слизистой оболочки (рис. 7), внутри их рыхлой соединительной ткани, вблизи базальной мембраны, а некоторые располагаются в самом эпителии.

Серотонин-содержащие клетки имеют различную форму: треугольную, округлую, веретеновидную, снабжены короткими и длинными отростками. Следует отметить, что серотонинергические нейроны ни в одном из сплетений не были выявлены.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на то, что проблемы физиологии и морфологии энтеральной нервной системы интенсивно изучаются уже более сотни лет, и результаты этих исследова-



Рис. 6. Симпатические перицеллюлярные нервные окончания вокруг иммунонегативных холинергических нейронов межмышечного и подслизистого ганглиозных сплетений. Иммуногистохимическая реакция на ТН. Ув: ×1000.
Fig. 6. Sympathetic pericellular nerve endings around immunonegative cholinergic neurons of the intramuscular and submucosal ganglion plexuses. Immunohistochemical reaction to TH. ×1000.

ний были обобщены в известных трудах нейрогистологов и физиологов российской школы [1–5, 14–16], многие вопросы остаются спорными и нерешенными. Например, в кишечной стенке млекопитающих принято выделять два ганглиозных нервных сплетения – Ауэрбахово и Мейснерово. Некоторые авторы отмечают еще и третье – подсерозное сплетение, которое наиболее выражено в области дна большой кривизны желудка [1], однако в изучаемом отделе желудочно-кишечного тракта у крысы оно отсутствует. Данные настоящей статьи, полученные с помощью иммуногистохимических методов исследования, подтверждают и дополняют литературные сведения. Они позволяют внести корректировку в известную классификацию. С помощью специальных нейроиммунгистохимических методов в двенадцатиперстной кишке крысы нами идентифицировано кроме ганглиозных (межмышечного и подслизистого) сплетений третье, локализующееся в собственно слизистой оболочке – “эпителиально-ворсинчатое”. Оно представлено узкопетлистой, концевой сетью варикозных аксонов.

Ранее в желудочно-кишечного тракте у животных и человека с помощью гистохимических, флуоресцентно микроскопических исследований и электронной микроскопии были обнаружены парасимпатические, симпатические, серотонинергические нервные клетки и волокна [17–19]. По мнению большинства авторов, в ганглиях желудочно-кишечного тракта преобладают холинергические нейроны [1, 3, 6, 16, 20]. На ультраструктурном уровне показано, что на одном и том же нейроне ганглиозного сплетения обнаруживаются различного типа синапсы: холинергические, катехоламинергические, серотонинергические, а также неопределенной природы контакты [6, 17]. В обзоре [8], посвященном изучению вегетативных ганглиев энтеральной нервной системы, по морфологическим, физиологическим, проекционным, медиаторным и иммуногистохимическим признакам идентифицировано более 10 типов нейронов. Эти данные свидетельствуют о высокой вовлеченности различных медиаторов, нейротрансмиттеров и регуляторных пептидов в

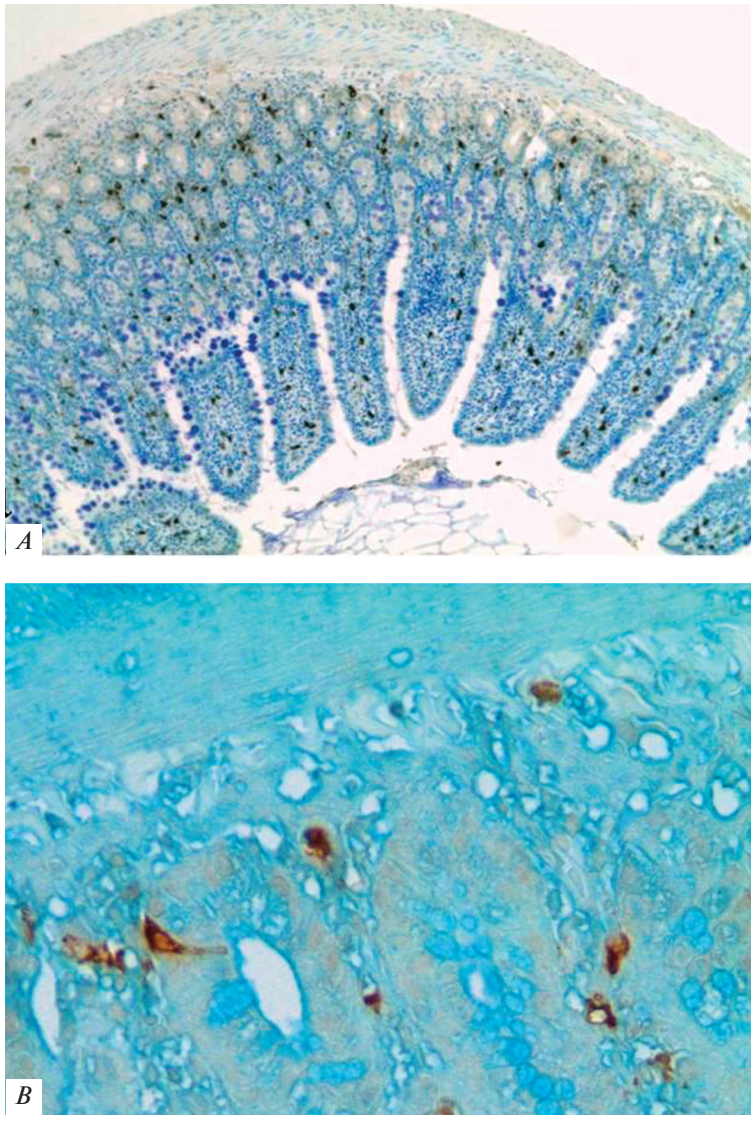


Рис. 7. Серотонин-содержщие клетки в стенке двенадцатиперстной кишки крысы (*A*) и в эпителии ворсинок (стрелка) (*B*). Иммуногистохимическая реакция на серотонин. Окраска толуидиновым синим (*A*), астровым синим (*B*). Ув.: ×100 (*A*); 400 (*B*).

Fig. 7. Serotonin-containing cells in the wall of the rat duodenum (a) and in the epithelium of the villi (arrow) (*B*). Immunohistochemical reaction to serotonin. Toluidine blue staining (*A*), astra blue staining (*B*). ×100 (*A*); 400 (*B*).

иннервации тканей кишечной стенки, обеспечении ее моторики и регуляции многих других важных функций.

Полученные нами данные согласуются с литературными, существенно дополняют и уточняют их. С помощью сравнительного иммуногистохимического анализа установлено, что в двенадцатиперстной кишке крысы подавляющее число нервных структур (нейронов, стволиков, пучков, нервных волокон, межнейронных и

нейромышечных синапсов) содержат белок PGP 9.5. Из PGP 9.5^+ нейроцитов и их отростков построены ганглиозные сплетения, сети претерминальных и терминальных варикозных аксонов. Они обнаруживаются вокруг тел и дендритов нейронов в виде перицеллюлярных аппаратов, вокруг артериальных и венозных сосудов, между мышечными слоями, в соединительной ткани подслизистой и слизистой оболочек.

Что касается симпатической иннервации, в тканях данного отдела кишки она значительно менее выражена. Источники постганглионарных симпатических нервных волокон находятся вне двенадцатиперстной кишки. Заметная часть симпатических ТН-иммунопозитивных нервные волокон и особенно их варикозных терминалей образует многочисленные перицеллюлярные синаптические аппараты на телах и дендритах парасимпатических нейронов. Часть симпатических аксонов принимает участие в иннервации гладкой мускулатуры стенки кишки, а также мелких артерий и артериол подслизистой оболочки. При этом симпатическая иннервация по своей интенсивности заметно уступает холинергической.

Анализ литературы, посвященной вопросам иннервации стенки кишки показывает, что наименее изученными являются нервные аппараты подслизистой и слизистой оболочек. Многие известные нейрогистологи прошлого века в своих трудах [4, 5] нередко упоминали о существующих трудностях выявления нервных структур в тканях этих двух отделов с помощью импрегнационных методов. Только использование специальных нейроиммуногистохимических методик позволило нам впервые выявить в слизистой оболочке крысы густую сеть из тончайших терминальных аксонов, изучить их строение, определить медиаторный статус и проследить их направление. По нашим данным ткани подслизистой и слизистой оболочек, включая ворсинки, получают иннервацию от нейронов Мейснерова сплетения. Тончайшие пучки аксонов, образованных его холинергическими нейронами, в составе артериол проходят через мышечную пластинку подслизистой основы, формируют густое ячеистое сплетение вокруг ацинусов интерстинальных желез и проникают внутрь каждой ворсинки слизистой оболочки. Внутри ворсинок терминальные варикозные аксоны находятся в тесных взаимоотношениях с клеточными элементами рыхлой соединительной ткани, со стенками обменных и лимфоидных капилляров, а также с эпителием слизистой. С помощью сравнительного иммуногистохимического анализа установлено, что симпатические нервные волокна в ворсинках отсутствуют.

По данным литературы [20] в стенке кишечного тракта животных кроме катехоламинергических структур (НА, ДОФА) обнаружены две разновидности серотонинергических клеток, различающихся по ферментному составу – триптофан гидроксилазы (ТРН 1 и ТРН2). Одни из них – многочисленные, мелких размеров клетки, локализующиеся, главным образом, в эпителии крипт ворсинок слизистой оболочки, по мнению авторов, являются энтерохромаффинными. Другие – серотонинергические нервные клетки, изредка встречающиеся в энтеральном ганглиозном сплетении. Наши наблюдения отчасти согласуются с данными литературы. В подслизистой и слизистой оболочках двенадцатиперстной кишки мы также выявили большое количество мелких серотонинсодержащих клеток. Судя по морфологии и топографии, их можно отнести к разновидности энтерохромаффинных элементов, содержащих индольные амины. Однако серотонинергические нервные клетки в ДПК кишке нами обнаружены не были.

Таким образом, в настоящей работе, выполненной с использованием современных нейроиммуногистохимических методов исследования, в двенадцатиперстной кишке крыс кроме двух основных ганглиозных сплетений (миентерального и подслизистого) было выявлено еще одно, ранее не привлекавшее внимание исследователей, эпителиально-ворсинчатое нервное сплетение. С помощью сравнительного анализа иммуногистохимического выявления селективных нейральных мар-

керов (PGP 9.5, Syn, TH, 5-HT) предполагается, что подавляющее большинство нервных структур, присутствующих во всех трех сплетениях, имеют холинергическую природу. Симпатические нервные аппараты в энтеральной нервной системе представлены в меньшей степени. Они выявляются в виде перицеллюлярных аппаратов холинергических нейронов, а также варикозных терминалей в мышечных слоях стенки кишки и вокруг мелких артерий и артериол. Показано, что в рыхлой соединительной ткани и в эпителии ворсинок двенадцатиперстной кишки постоянно выявляются многочисленные мелкие серотонинсодержащие клетки. В эпителии ворсинок обнаружены неописанные ранее нейроноподобные клетки, содержащие белок PGP 9.5 и синаптофизин. Результаты настоящего исследования подтверждают перспективность использования нейроиммуногистохимических методов для изучения морфологии и функции структур энтеральной нервной системы, выявленные особенности нервных аппаратов двенадцатиперстной кишки следует учитывать при изучении молекулярно-клеточных механизмов регуляции ее функций.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках темы государственного задания (шифр темы НИР: 0557- 2019-0007).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ноздрачев А.Д.* Физиология вегетативной нервной системы. Л. Медицина. 1983. [*Nozdrachev A.D.* Fiziologiya vegetativnoj nervnoj sistemy`[Physiology of the autonomic nervous system]. Leningrad. Medicine. 1983. (In Russ)].
2. *Wang X.Y., Wong W.C., Ling E.A.* Ultrastructural localisation of substance P, vasoactive intestinal peptide and somatostatin immunoreactivities in the submucous plexus of guinea pig ileum. J. Anat. 186(1): 187–196. 1995.
3. *Foong J.P., Tough I.R., Cox H.M., Bornstein J.C.* Properties of cholinergic and non-cholinergic submucosal neurons along the mouse colon. J. Physiol. 592(4): 777–793. 2014.
4. *Лаврентьев Б.И.* Теория строения вегетативной нервной системы. М. Медицина. 1983. [*Lavrentiev B.I.* Teoriya stroeniya vegetativnoj nervnoj sistemy [The theory of the structure of the autonomic nervous system]. Moscow. Medicine. 1983. (In Russ)].
5. *Колосов Н.Г., Хабарова А.Я.* Структурная организация вегетативных ганглиев. Л. Наука. 1978. [*Kolosov N.G., Khabarova A.Ya.* Strukturnaya organizaciya vegetativny`x gangliev [Structural organization of vegetative ganglia]. Leningrad. Nauka. 1978. (In Russ)].
6. *Gabella G.* Structure of the autonomic nervous system. London. Chapman and Hall. 1979.
7. *Fehér E., Burnstock G.* Ultrastructural localization of substance P, vasoactive intestinal polypeptide, somatostatin and neuropeptide Y immunoreactivity in perivascular nerve plexuses of the gut. Blood Vessels. 23(3): 125–126. 1986.
8. *Furness J.B.* Types of neurons in the enteric nervous system. J. Auton. Nerv. Syst. 81(1–3): 87–96. 2000.
9. *Wang X.Y., Wong W.C., Ling E.A.* Localization of NADPH-diaphorase activity in the submucous plexus of the guinea-pig intestine: light and electron microscopic studies. J. Neurocytol. 24(4): 271–81. 1995.
10. *Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Петрова Е.С.* Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии (руководство). СПб. СпецЛит. 2014. [Korzhevskii D.E., Kirik O.V., Petrova E.S. Teoreticheskie osnovy` i prakticheskoe primenenie metodov immunogistoximii (rukovodstvo) [Theoretical foundations and practical application of immunohistochemistry methods]. St. Petersburg. SpetsLit. 2014. (In Russ)].
11. *Cai W., Gu J., Huang W., McGregor G.P., Ghatei M.A., Bloom S.R., Polak J.M.* Peptide immunoreactive nerves and cells of the guinea pig gall bladder and biliary pathways. Gut. 24(12): 1186–1193. 1983.
12. *Коржевский Д.Э., Колос Е.А.* Белок PGP 9.5 и его использование в качестве функционального маркера в нейроморфологии. Мед. акад. журн. 13(4): 29–35. 2013. [*Korzhevskii D.E., Kolos E.A.* Protein PGP 9.5 and its use as a functional marker in neuromorphology. Med. Acad. J. 13 (4): 29–35. 2013. (In Russ)].
13. *Колос Е.А., Григорьев И.П., Коржевский Д.Э.* Маркер синаптических контактов – синаптофизин. Морфология. 147(1): 78–82. 2015. [*Kolos E.A., Grigoriev I.P., Korzhevskii D.E.* Synaptic contacts marker – synaptophysin. Morphologiia. 147(1): 78–82. 2015. (In Russ)].
14. *Dogiel A.S.* Ueber den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Säugethiere. Arch. Anat. Physiol. Anat. Abth.: 130–158. 1899.

15. *Кнорре А.Г., Суворова Л.В.* Развитие вегетативной нервной системы в эмбриогенезе. М. Медицина. 1984. [*Knorre A.G., Suvorova L.V.* Razvitie vegetativnoj nervnoj sistemy` v e`mbriogeneze [The development of the autonomic nervous system in embryogenesis]. Moscow. Medicine. 1984].
16. *Ноздрачев А.Д., Чумасов Е.И.* Периферическая нервная система. СПб. Наука. 1999. [*Nozdrachev A.D., Chumasov E.I.* Periphericheskaya nervnaya sistema [Peripheral nervous system]. St. Petersburg. Nauka. 1999].
17. *Cook R.D., Burnstock G.* The ultrastructure of Auerbach's plexus in the guinea-pig. II. Non-neuronal elements. J. Neurocytol. 5(2): 195–206. 1976.
18. *Ferri G.L.* Human gut neuroanatomy: methodology for a quantitative analysis of nerve elements and neurotransmitter diversity in the human "enteric nervous system". Basic Appl. Histochem. 32(1): 117–144. 1988.
19. *Baker D.M., Santer R.M.* A quantitative study of the effects of age on the noradrenergic innervation of Auerbach's plexus in the rat. Mech. Ageing Dev. 42(2): 147–158. 1988.
20. *Li Z., Chalazonitis A., Huang Y.Y., Mann J.J., Margolis K.G., Yang Q.M., Kim D.O., Côté F., Mallet J., Gershon M.D.* Essential roles of enteric neuronal serotonin in gastrointestinal motility and the development/survival of enteric dopaminergic neurons. J. Neurosci. 31(24): 8998–9009. 2011.

Study of the Rat Duodenal Innervation Using Neural Immunohistochemical Markers

E. I. Chumasov[a, b, *], E. S. Petrova[a], and D. E. Korzhevskii[a]

[a] *Federal State Budgetary Scientific Institution "Institute of Experimental Medicine", St.Petersburg, Russia*

[b] *St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, St.Petersburg, Russia*

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

The purpose of the work is to study the topography, morphology, and mediator status of the nerve apparatus of the rat duodenum using immunohistochemical methods. The use of markers selective for the peripheral nervous system (PGP 9.5, synaptophysin (Syn), serotonin (5HT) and tyrosine hydroxylase (TH)) made it possible to reveal in the tissues of the intestinal wall, (in addition to the two main submucosal and myienteral ganglionic nerve plexuses), the third plexus—the mucous epithelium villous one. Using comparative immunohistochemical analysis, it was found that most of the nerve structures (neurons, nerve fibers, interneuronal and neuromuscular synapses in the ganglion plexuses) are PGP 9.5-immunopositive and cholinergic. There are no catecholaminergic and serotonergic (5HT +) neurons in the studied ganglion plexuses. It is assumed that postganglionic sympathetic fibers enter the duodenum from the outside. They participate in the innervation of the muscle layers of the intestinal wall and arterial vessels, form pericellular synapses on the bodies and dendrites of parasympathetic neurons. A large number of terminal varicose axons were found in the connective tissue of the villi using PGP 9.5, and single bipolar neuron-like cells were found in the epithelium. Sympathetic elements in the villi were not identified. A reaction to serotonin revealed a large number of serotonin-containing cells that were morphologically similar to enterochromaffinocytes.

Keywords: rat duodenum, innervation, protein PGP 9.5, tyrosine hydroxylase, synaptophysin, serotonin, immunohistochemistry

ЦИТИРОВАТЬ:

Чумасов Е.И., Петрова Е.С., Коржевский Д.Э. Исследование иннервации двенадцатиперстной кишки крысы с использованием нейральных иммуногистохимических маркеров. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(7): 853–865.

DOI: 10.31857/S086981392007002

TO CITE THIS ARTICLE:

Chumasov E.I., Petrova E.S., Korzhevskii D.E. Study of the Rat Duodenal Innervation Using Neural Immunohistochemical Markers. Russian Journal of Physiology. 106(7): 853–865.

DOI: 10.31857/S086981392007002

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 7, с. 866–879

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ВЛИЯНИЕ МОЗЖЕЧКОВОЙ ДИСФУНКЦИИ, ПРИОБРЕТЕННОЙ В РЕЗУЛЬТАТЕ ЛЕЧЕНИЯ ОПУХОЛИ, НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ САККАДИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ У ДЕТЕЙ

© 2020 г. М. А. Шурупова[1, 2, 3, *], В. Н. Касаткин[1, 2], В. Н. Анисимов[3], А. В. Латанов[3]

[1]Лечебно-реабилитационный научный центр "Русское Поле" Национального медицинского исследовательского центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева МЗ РФ, Чехов, Россия

[2]Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА РФ, Москва, Россия

[3]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

**E-mail: shurupova.marina.msu@gmail.com*

Поступила в редакцию 30.01.2020 г.
После доработки 23.03.2020 г.
Принята к публикации 04.05.2020 г.

Мозжечок играет ключевую роль в управлении саккадическими движениями глаз и фиксациями взора. При поражении мозжечка возникают различные нарушения глазодвигательного поведения и связанных с ним психофизиологических процессов. Такие нарушения существенно влияют на эффективность реабилитационных мероприятий с пациентами, перенесшими лечение по поводу опухоли мозжечка. Цель проведенного исследования состояла в выявлении и объективной оценке влияния мозжечковой дисфункции, приобретенной в результате лечения опухоли, на характеристики глазодвигательной системы у пациентов детского возраста для последующей разработки диагностических критериев качественной и количественной оценки реабилитационного процесса. В исследовании приняли участие 66 детей (9–17 лет) с приобретенной вследствие лечения опухоли дисфункцией мозжечка, а также 54 здоровых ребенка того же возраста. При выполнении трех глазодвигательных тестов у испытуемых регистрировали движения глаз методом видеоокулографии. Мы выявили нарушения удержания взора на зрительном объекте, существенное увеличение доли гиперметричных саккад, а также затруднения зрительного сканирования у пациентов. Такие дисфункции глазодвигательной системы неизбежно приводят к нарушениям ряда когнитивных процессов – зрительного восприятия, внимания, памяти, чтения. Кроме того, феномен гиперметричных саккад следует рассматривать как частный случай проявления атактического синдрома при мозжечковых нарушениях у пациентов. Выявленные глазодвигательные нарушения необходимо учитывать для эффективности реабилитационных мероприятий с такими пациентами.

Ключевые слова: мозжечок, саккады, видеоокулография, реабилитация, опухоль мозжечка, когнитивные функции

DOI: 10.31857/S0869813920070079

Саккадическая система является неотъемлемой частью единой зрительно-глазодвигательной системы, обеспечивающей процессы внимания и восприятия [1]. Саккады перемещают фовеа на область интереса в зрительном поле, инициируя распознавание зрительной информации во время процесса фиксации. Характеристики саккад и фиксаций являются информативными показателями активности

структур мозга, вовлеченных как в работу афферентно-эфферентных звеньев зрительных процессов, так и в обработку зрительной информации, тесно связанной с когнитивной деятельностью [2, 3]. Саккадическая система имеет сложную иерархическую организацию и включает в себя целый комплекс структур в различных отделах мозга, в том числе и в мозжечке [4].

Области окуломоторного мозжечка (дорзальные дольки червя мозжечка и ядра шатра) вовлечены в управление саккадическими движениями глаз, а области вестибулярного (каудальные дольки червя мозжечка, флоккулюс и парафлоккулюс) участвуют в фиксации взора, прослеживающих движениях и вестибулоокулярном рефлексе [5, 6]. При поражениях этих центров и/или их проекций возникает мозжечковая дисфункция, выражающаяся в нарушениях, прежде всего, амплитудных характеристик саккад, а также нарушениях стабильности удержании взора [7, 8]. В немногих исследованиях, выполненных на приматах, а также пациентах с поражениями мозжечка различного генеза было показано, что саккады становятся преимущественно гиперметричными (удлиненными по амплитуде), в результате чего взор "перелетает" целевой объект [7, 9]. При этом, зачастую, гиперметричные саккады сопровождаются дополнительными саккадами малых амплитуд (корректировочными). Нестабильность удержания взора при мозжечковых повреждениях проявляется в интрузивных микро- и макросаккадах, а также в различных видах нистагма [10].

Вместе с тем, показано, что пациенты, имеющие мозжечковые дисфункции, страдают от нарушений процессов зрительно-пространственного восприятия и внимания [11, 12]. Роль мозжечка не только в двигательном поведении, но и в когнитивной деятельности была зафиксирована введением в медицину описания мозжечкового когнитивно-аффективного синдрома (синдрома Шмаманна) как комплекса нарушений когнитивных и эмоциональных процессов [13]. Данный синдром характерен прежде всего для детей, перенесших лечение опухолей задней черепной ямки (ЗЧЯ), включающих в себя мозжечок и его проекции [12, 14].

Опухоли ЗЧЯ (медуллобластома, астроцитома, эпендимома и некоторые другие) являются наиболее распространенными опухолями в детском возрасте (50–55% всех опухолей), которые благодаря современным высокотехнологичным методам оказания медицинской помощи оказываются излечимыми [15]. Новые подходы в методах реабилитации таких пациентов и повышение качества их жизни оказываются крайне актуальными в современной нейроонкологии [16]. Поскольку параметры саккад и фиксаций отражают состояние глазодвигательной системы и соответственно зрительно опосредованных когнитивных процессов [3, 17], они могут быть использованы в целях диагностики мозжечковых дисфункций у пациентов, а также для оценки эффективности реабилитационных мероприятий [18]. Такие исследования редко встречаются в научной периодике [9, 10] и все они проведены на взрослых пациентах. Подобные работы с участием пациентов детского и подросткового возрастов, имеющих повреждения единого генеза, практически отсутствуют и, несомненно, вызывают высокий интерес в фундаментальном и практическом аспектах в детской нейроонкологии. Современный цифровой метод видеоокулографии (англ., *eye tracking)*, широко используемый для регистрации движений глаз, является удобным неинвазивным средством для изучения глазодвигательной активности, что обеспечивает комфортные условия для обследования пациентов.

Цель проведенного исследования состояла в выявлении и объективной оценке влияния мозжечковой дисфункции, приобретенной в результате лечения опухоли, на характеристики глазодвигательной системы у пациентов детского возраста для последующей разработки диагностических критериев качественной и количественной оценки реабилитационного процесса.



Рис. 1. Установка для видеорегистрации движений глаз в ЛРНЦ “Русское Поле”.
Fig. 1. Eye tracking equipment for eye movement recording in Clinical Rehabilitation Research Center “Russkoe Pole”.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на 120 испытуемых в возрасте 9–17 лет, 66 из которых являлись пациентами с опухолями ЗЧЯ (средний возраст 12.8 ± 2.6 лет, 41 мальчик, 25 девочек, разброс представлен среднеквадратическим отклонением), а 54 – условно здоровыми (нормотипичными) детьми (средний возраст 13.0 ± 2.4 лет, 26 мальчиков, 28 девочек). Среди пациентов преобладали пациенты с медуллобластомой (40 детей), у 21 ребенка была диагностирована астроцитома и у 5 детей – эпендимома. Пациенты находились в состоянии ремиссии после завершения лечения в период от 3 до 122 мес. (в среднем 47 мес.) и не получали никакой терапии, в том числе и химиотерапии. Исследование проводили на базе ЛРНЦ “Русское Поле” (г. Чехов, Московская обл.), где пациенты проходили реабилитацию после перенесенного лечения.

Протокол исследования был одобрен этическим комитетом Национального медицинского исследовательского центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева (НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева) № 8э/15-17 от 27.10.2017 г. Исследование проводили в соответствии с принципами Хельсинкской декларации. Согласие на проведение комплексного исследования подписывали сами дети, если были старше 15 лет, если младше – их законные представители.

Движения глаз регистрировали монокулярно с использованием видеоокулографа Arrington 60 Hz (Arrington Research, Inc., США). Монитор для предъявления стимульного материала (Samsung с диагональю 23", разрешение 1920 × 1080 пикселей) располагали в 60 см от глаз участников исследования, занимая при этом около 45° по горизонтали и 26° по вертикали их зрительного поля. Для управления ходом эксперимента и предъявления изображений на мониторе использовали программное обеспечение ViewPoint EyeTracker® 2.9.2.5, водящее в комплект поставки видеоокулографа. Калибровку проводили по стандартному 9-ти точечному алгоритму. Во время проведения исследования голову испытуемых нежестко фиксировали с помощью лобно-подбородной опоры для минимизации лишних движений (рис. 1). До проведения исследования испытуемых инструктировали устно, предъявляя стимулы и объясняя содержание глазодвигательного теста, а затем повторно непосред-

ственно в эксперименте перед началом предъявления стимулов в каждом тесте. Испытуемых инструктировали соблюдать покой и тишину, не двигаться и не разговаривать. Исследование проводили в кабинете нейрофизиологических исследований в тихой обстановке в течение 20 мин.

В экспериментах использовали три глазодвигательных теста, для проведения которых был разработан оригинальный стимульный материал, а также материал, заимствованный из литературы для данной нозологии и адаптированный для условий экспериментов [19, 20].

1) Тест “Удержание взора”

Тест использовали для оценки стабильности процесса удержания взора на зрительном объекте. Участникам исследования на мониторе предъявляли зеленый круг (диаметр ~1°), который последовательно располагали на экране в четырех позициях – слева/справа на 15° от центра и вверху/внизу на 8° от центра в течение 20 с в каждой позиции, и инструктировали их удерживать на нем взор в течение всего периода его предъявления, а как только круг перемещался в другое положение, зрительно следовать за ним с последующим удержанием взора. Для обеспечения комфортных условий при выполнении теста участников не ограничивали в выполнении естественных морганий. Для оценки стабильности удержания взора на каждом круге полученные координаты положений взора аппроксимировали методом наименьших квадратов для определения наилучшего соответствия эллипсу с использованием функции fit_ellipse в программной среде Matlab 2013 [21].

Рассчитывали площади полученных эллипсов, отображающих разбросы координат положений взора для каждого из четырех положений круга у каждого испытуемого. Значения площадей рассчитывали в квадратных зрительных градусах (кв. град.). Исключали артефактные значения, полученные при некорректной детекции зрачка у некоторых испытуемых.

2) Тест “Квадрат”

В данном тесте участники исследования совершали зрительно вызванные саккады по горизонтали и вертикали. На мониторе предъявляли изображение квадрата с длиной стороны 10°, в углах которого последовательно в направлении по часовой стрелке появлялся красный круг (диаметр ~1°). Участников инструктировали как можно быстрее перемещать взор с одной вершины квадрата на другую, как только там появлялся круг, для чего было необходимо совершать саккады. Круг позиционировали по углам квадрата в течение 500 мс в каждом углу. Всего испытуемым было необходимо совершить 24 саккады (по 6 в разных направлениях) амплитудой (А) 10°. По результатам выполнения теста определяли общее число совершенных саккад, долю относительно точных (А в диапазоне 8.5°–11.5°), гипометричных (укороченных, $A < 8.5°$), гиперметричных (удлиненных, $A > 11.5°$) и корректирующих саккад (следующих только после дисметричных саккад, $1.5° < A < 5°$).

3) Тест “10 точек”

Тест предназначен для оценки функциональных глазодвигательных характеристик во время сканирования изображения участником при выполнении простого когнитивного задания по подсчету зрительных объектов. На мониторе предъявляли 10 черных кругов (диаметром ~1°), располагающихся по экрану псевдослучайным образом. Испытуемых инструктировали зрительно (про себя) подсчитать число точек и вслух назвать ответ. По результатам теста анализировали время выполнения задания, число фиксаций, их длительности, общую длину траектории сканирования и амплитуды саккад. За время выполнения задания принимали время ответа пациента о числе подсчитанных точек. Общую траекторию сканирования рассчитывали как суммарную амплитуду всех саккад. При анализе фиксаций исключали фиксации с длительностью менее 80 мс.

Таблица 1. Медианы и межквартильный размах (25-й процентиль и 75-й процентиль) величин площадей эллипсов, аппроксимирующих положения взора в тесте удержании взора на стимулах для пациентов и нормотипичных детей. Приведены результаты непараметрического дисперсионного факторного анализа
Table1. Median and interquartile range (25th and 75th percentiles) of ellipse areas approximating gaze positions in gaze fixation test for patients and healthy children. Results for nonparametric analysis of variance are presented

Медианы, кв град. Median, sq deg.		*H*	*N*	*df*	*p*
пациенты (patients)	норм. (healthy)	91.1	378	1	<0.001
2.2 [1.4; 6.0]	1.1 [0.7; 1.8]				

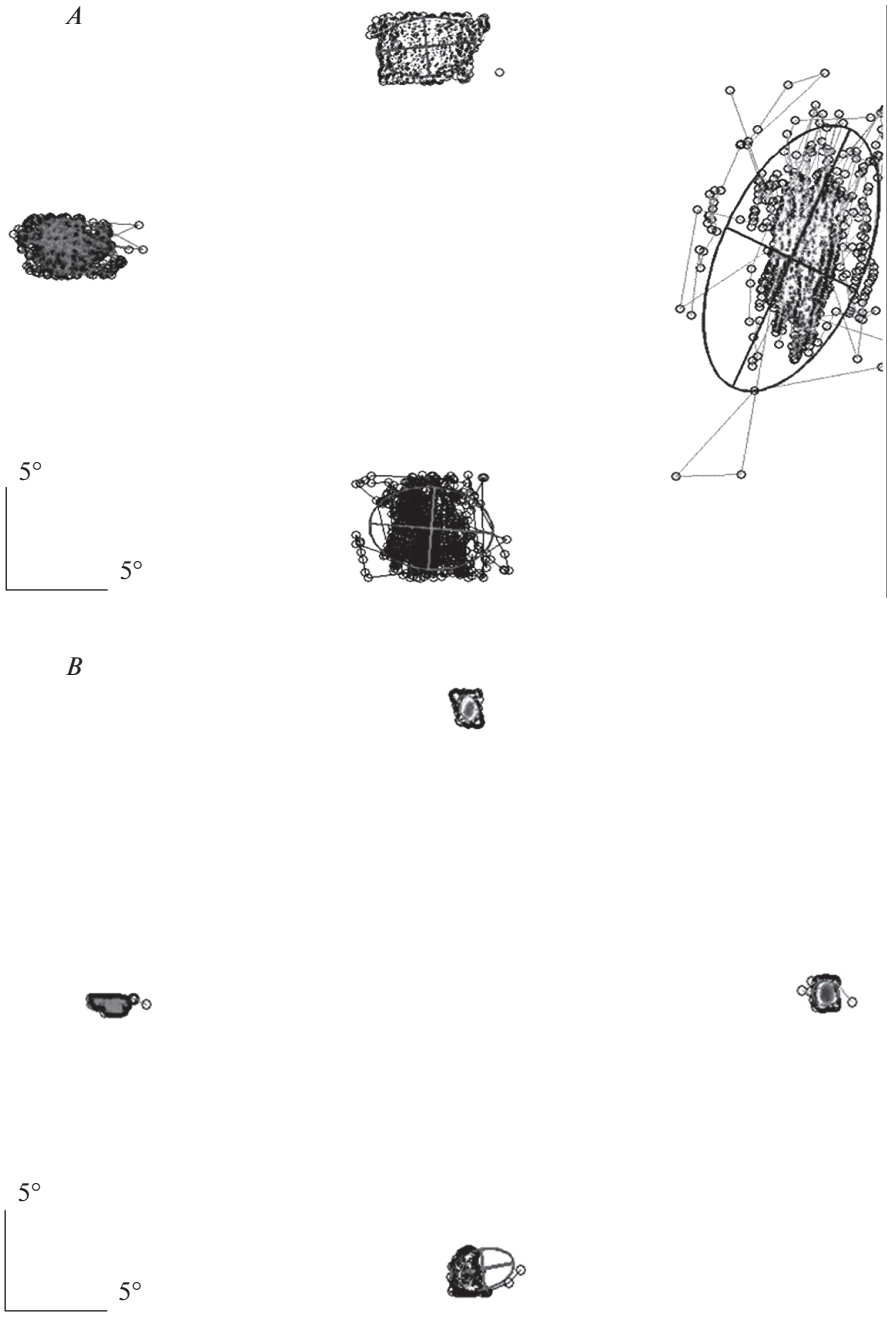
Для определения координат положений взора использовали программное обеспечение ViewPoint EyeTracker® 2.9.2.5 (Arrington Research, Inc.), для выделения событий (фиксаций и саккад) программное обеспечение DataAnalysis, входящее в состав программного пакета Arrington Research. Статистическую обработку площадей эллипсов, амплитуд саккад, длительностей фиксаций и их количества проводили с использованием программы Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc.). Для статистической оценки различий всех параметров в группах пациентов и нормотипичных детей использовали метод непараметрического дисперсионного факторного анализа (критерий Краскелла–Уоллиса), статистически значимыми принимали различия в распределениях определенных величин в двух и/или более выборках при вероятности (p) принятия нулевой гипотезы об отсутствии различий в распределениях величин в выборках менее 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристики выполнения теста на удержание взора

На рис. 2 представлены примеры результатов выполнения теста на удержание взора у пациента с медуллобластомой червя мозжечка и IV желудочка (*A*) и нормотипичного ребенка того же возраста (*B*) при поочередной фиксации взора на каждом стимуле. У пациента наблюдаются различные феноменологические причины нарушения стабильной фиксации: на левом и верхнем стимулах выражен горизонтальный нистагм, на правом – вертикальный нистагм и высокоамплитудные произвольные контекстно-неуместные саккады, отражающие отвлечение зрительного внимания испытуемого от стимула, на нижнем – вертикальный нистагм и низкоамплитудные интрузивные саккады, непроизвольно нарушающие фиксацию взора.

Рис. 2. Примеры разброса положений взора при выполнении теста на удержание взора на стимулах у пациента с медуллобластомой червя мозжечка и IV желудочка (*A*) и нормотипичного ребенка (*B*) того же возраста. Разброс положений взора на стимулах аппроксимирован эллипсами, полученными методом наименьших квадратов [21]. Калибровка по осям – угловые градусы. У пациента наблюдаются нарушения фиксации взора: горизонтальный и вертикальный нистагм, произвольные высокоамплитудные саккады, непроизвольные интрузивные саккады.
Fig. 2. The patterns of dispersion area of gaze positions in gaze fixation test for patient with medulloblastoma of cerebellar vermis and IV ventriculi (*A*) and healthy child of the same age (*B*). The dispersion of gaze positions is outlined by the ellipses obtained by least square method [21]. Angular degrees are laid down along the X- and Y-axes. The patient has violations of the gaze fixation: horizontal and vertical nystagmus, voluntary saccades of large amplitude, involuntary intrusive saccades.


A
5°
5°
B
5°
5°

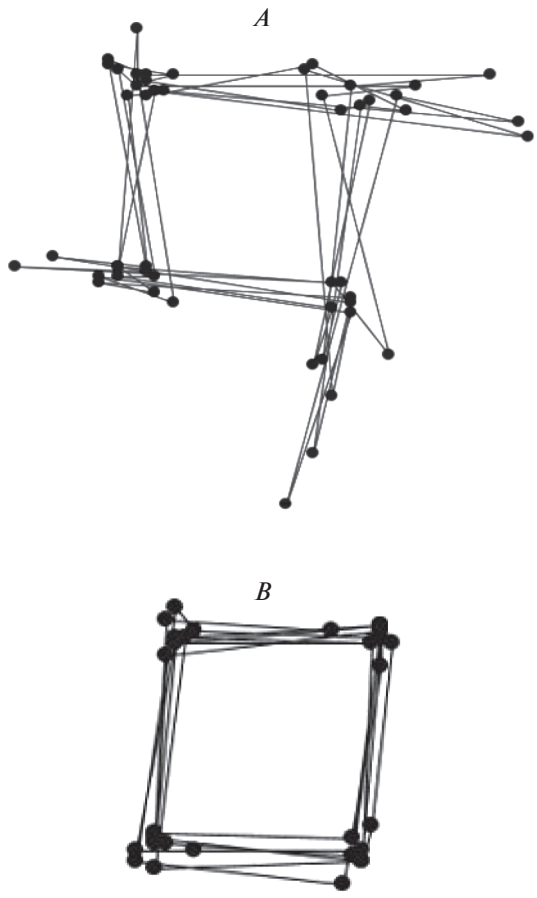


Рис. 3. Примеры траекторий саккад при выполнении задания на зрительно-вызванные саккады у пациента с медуллобластомой червя мозжечка и правой гемисферы (*A*) и нормотипичного ребенка (*B*) того же возраста. У пациента наблюдаются гиперметричные саккады.

Fig. 3. The patterns of visually guided saccades in patient with medulloblastoma of cerebellar vermis and right hemisphere (*A*) and healthy child of the same age (*B*). Hypermetric saccades are observed in patient.

При сравнении стабильности удержания взора у двух групп детей (пациентов с опухолями ЗЧЯ и нормотипичных детей) было показано, что величины площадей эллипсов при фиксации взора на стимуле статистически значимо выше у пациентов (табл. 1), что свидетельствует о нарушении процессов удержания взора у таких детей.

Характеристики выполнения теста на зрительно-вызванные саккады

На рис. 3 представлен пример выполнения задания на зрительно-вызванные саккады, совершаемые по контуру квадрата, у пациента с медуллобластомой червя мозжечка и правой гемисферы (*A*) и нормотипичного ребенка того же возраста (*B*). У пациента наблюдаются различные гиперметричные саккады в горизонтальном и вертикальном направлениях (преимущественно, вправо и вниз).

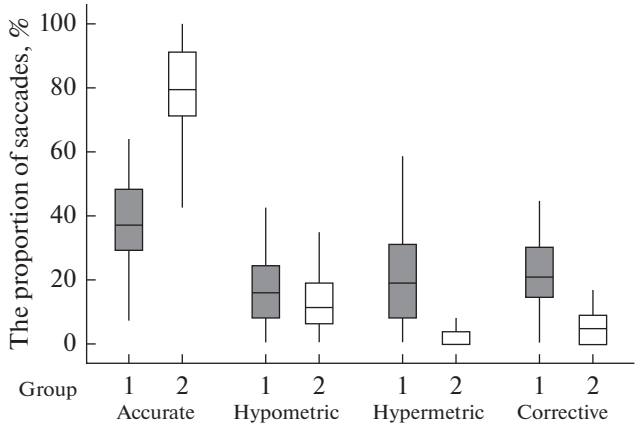


Рис. 4. Доли точных, гипометричных, гиперметричных и корректировочных саккад у пациентов с опухолью ЗЧЯ (1) и нормотипичных детей (2). Представлены медианы, минимаксные значения и межквартильный размах.

Fig. 4. The proportion of accurate, hypometric, hypermetric, and corrective saccades in patients with posterior fossa tumors (1) and healthy children (2). The medians, minimax values, and interquartile range are pointed.

При сравнении долей каждого типа саккад двух групп детей (пациентов с опухолями ЗЧЯ и нормотипичных детей) было показано, что они достоверно отличаются друг от друга, кроме гипометричных саккад (рис. 4). Доля точных саккад выше у здоровых детей ($H = 41.2$, $df = 1$, $N = 84$, $p < 0.001$), а у пациентов выше доля гиперметричных ($H = 45.2$, $df = 1$, $N = 84$, $p < 0.001$) и корректировочных саккад ($H = 41.2$, $df = 1$, $N = 84$, $p < 0.001$). При этом доли гипометричных саккад не различаются ($H = 1.73$, $df = 1$, $N = 84$, $p = 0.19$). Следовательно, гипометричные саккады характерны как в норме, так и в патологии.

Характеристики выполнения теста по подсчету зрительных объектов

На рис. 5 представлены примеры треков взора при выполнении теста по подсчету зрительных объектов у пациента с медуллобластомой червя мозжечка и правой гемисферы (*A*) и нормотипичного ребенка того же возраста (*B*). У пациента наблюдается большое число фиксаций и длинная траектория сканирования, отражающие возврат взора к уже посчитанным объектам. При сравнении характеристик выполнения задания у двух групп детей (пациентов с опухолями ЗЧЯ и нормотипичных детей) методом непараметрического дисперсионного анализа Краскелла-Уоллиса было показано, что достоверно различаются друг от друга время выполнения задания, число фиксаций и длина траектории сканирования, при этом средние длительности фиксаций и средние амплитуды саккад не различаются (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании мы продемонстрировали нарушения базовых характеристик функционирования глазодвигательной системы, возникающих при дисфункции мозжечка, приобретенной вследствие развития опухолевого процесса и его лечения. У пациентов с опухолями мозжечка наблюдается нестабильная фиксация взора, с одной стороны, из-за присутствия физиологических нарушений – нистагма, интрузивных саккад, которые являются непроизвольными глазодвигатель-

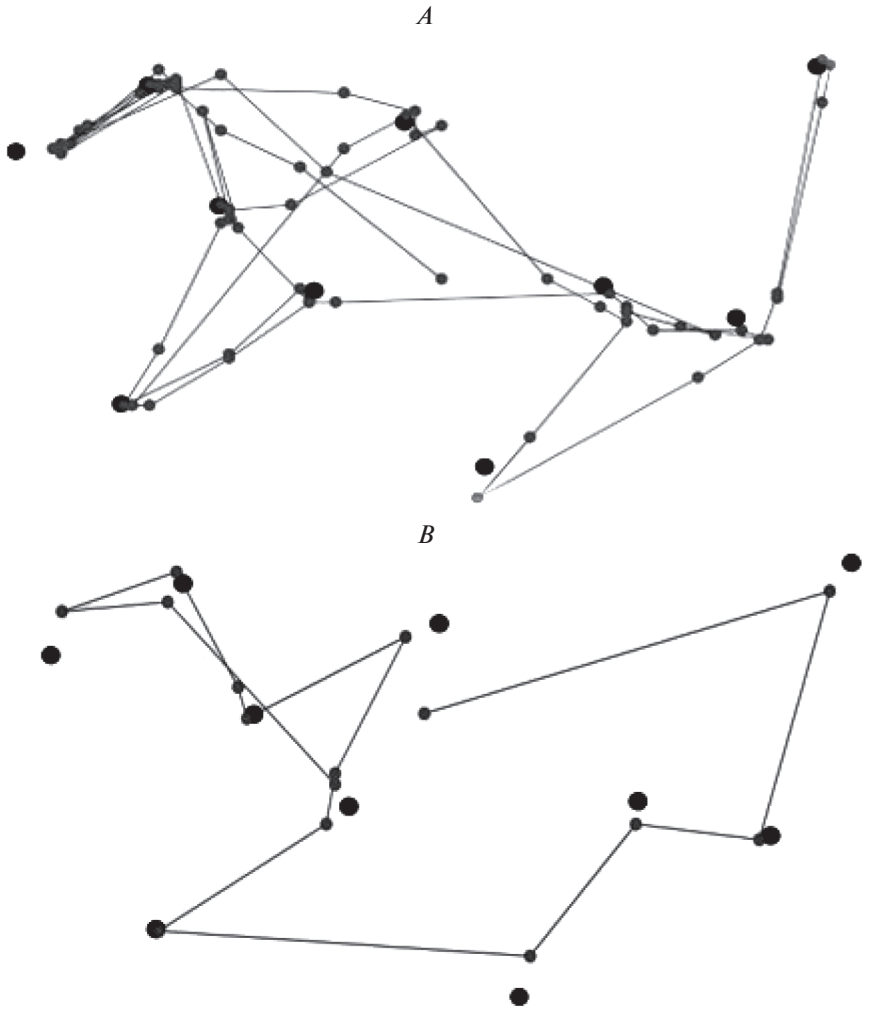


Рис. 5. Примеры треков взора при выполнении теста по подсчету зрительных объектов у пациента с медуллобластомой червя мозжечка и четвёртого желудочка (*A*) и нормотипичного ребенка (*B*) того же возраста. У пациента наблюдаются возвратные саккады и повторные фиксации на объектах.
Fig. 5. The patterns of scan path in counting visual objects task in patient with medulloblastoma of cerebellar vermis and IV ventriculi (*A*) and healthy child of the same age (*B*). Regressive saccades and repetitive fixations are observed in patient.

ными актами и описаны при других мозжечковых патологиях [10, 22]. Их происхождение связывают с повреждением работы вестибулярного мозжечка (флоккулюс и парафлоккулюс), который имеет проекции к стволовому генератору саккад [5, 8]. С другой стороны, у ряда пациентов присутствуют нарушения концентрации зрительного внимания в течение заданных 20 с, которые выражаются в произвольных высокоамплитудных саккадах, направленных от объекта (рис. 2*A*, правый объект). Нарушения концентрации зрительного внимания также характерны при мозжечковом когнитивно-аффективном синдроме [13].

Таблица 2. Медианы и межквартильный размах (25-й процентиль и 75-й процентиль) характеристик выполнения задания на подсчет объектов у пациентов и нормотипичных детей. Приведены результаты для непараметрического факторного анализа
Table 2. Median and interquartile range (25th and 75th percentiles) of performance characteristics of the visual search task for patients and healthy children. Results for nonparametric analysis of variance are presented.

Параметр (Parameter)	Медианы (Median)		*H*	*df*	*N*	*p*
	пациенты (patients)	нормотипичные дети (healthy children)				
Время выполнения задания (с) (time of performance)	6.7 [4.9; 8.9]	4.9 [4.3; 5.5]	25.1	1	110	<0.001
Число фиксаций (number of fixations)	18 [14, 25]	15 [13, 16]	15.0	1	108	<0.001
Общая траектория сканирования (°) (scanpath)	155.6 [115.6; 236.3]	119.6 [96.8; 135.2]	19.4	1	103	<0.001
Средняя длительность фиксаций (мс) (mean fixation duration)	272 [229.6; 307.9]	272 [234.4; 317.8]	0.01	1	103	0.93
Средняя амплитуда саккад (°) (mean saccadic amplitude)	7.9 [6.7; 8.9]	7.7 [7.2; 9.2]	0.47	1	103	0.49

Продемонстрированные нарушения амплитудных характеристик саккад, прежде всего наличие гиперметричных саккад (рис. 3*А*), вызывающих “перелет” взора относительно стимула, являются характерными при различных мозжечковых дисфункциях [5, 7, 8]. Возникновение “неточной” моторной команды, реализуемой глазодвигательными мышцами и приводящей к появлению удлиненной саккады, происходит при рассинхронизации работы ядер шатра, передающих “заглушающий” сигнал на тормозные пачечные нейроны в парамедианной ретикулярной формации моста [23]. Такая рассинхронизация появляется в результате повреждений самих ядер шатра или областей дорзального червя, которые имеют к ним проекции. В нашем исследовании у пациентов гиперметричные саккады часто (но не всегда) корректируются, в результате чего корректирующих саккад у них в несколько раз больше, чем в норме (рис. 4). При этом число других дисметричных саккад – гипометричных – не различается в норме и патологии (рис. 4). Наличие гипометричных саккад в норме можно связать с детским возрастом испытуемых, поскольку в младшем школьном возрасте в норме они присутствуют в значительном количестве, а затем к концу подросткового возраста их количество существенно снижается [24]. Значимое различие в количестве корректировочных саккад у пациентов и нормотипичных детей также указывает на то, что гипометричные саккады реже корректируются по сравнению с гиперметричными. Это позволяет рассматривать гипометричные саккады вариантом нормы, так как моторная ошибка оказывается не такой критичной, чтобы ее корректировать. Стоит отметить, что гипометричные саккады также могут быть маркером патологии (например, при паркинсонизме), если речь идет о дефиците функционирования базальных ганглиев, однако в таком случае их доля будет превалировать [25].

В результате анализа характеристик выполнения теста по подсчету объектов, в котором совершались не зрительно-вызванные, а произвольные саккады, показано ухудшение так называемых “когнитивных” параметров – времени выполнения задания, числа фиксаций и длины траектории сканирования, в то время как “физиологические” параметры – средние амплитуды саккад и средние длительности

фиксаций значимо не различаются друг от друга (табл. 2). “Когнитивные” параметры характеризуют зрительно-пространственную организацию зрительного сканирования испытуемых при выполнении теста на подсчет объектов. Выявленные у пациентов повышенные значения глазодвигательных характеристик отражают наличие возвратных глазодвигательных паттернов, когда взор испытуемого возвращается к уже посчитанным объектам, что свидетельствует о затруднениях в процессах восприятия, интеграции и зрительно-пространственной памяти [20]. Подобные глазодвигательные паттерны могут указывать на недостаточность пространственного “амбъентного” зрения, при котором затруднено быстрое сканирование зрительной сцены с целью выделения объектов [3]. Данные нарушения, связанные с ориентацией в пространстве, вниманием и рабочей памятью, характерны для мозжечкового когнитивно-аффективного синдрома, анатомическим субстратом которого является поражение мозжечково-корковых проекций, приводящих к ухудшению когнитивных процессов [13]. При этом отсутствие значимых различий в “физиологических” параметрах (в т.ч. гиперметричности саккад) позволяет предположить, что, поскольку в тесте по подсчету объектов совершаются саккады произвольного характера, а не рефлекторного (зрительно-вызванные саккады), в их реализации в большей степени вовлекаются корковые лобные глазодвигательные поля, компенсируя таким образом моторную ошибку, производимую мозжечком. Данное предположение нуждается в дальнейших исследованиях.

Приведенные различия в параметрах фиксаций и саккадических движений глаз как рефлекторных, так и произвольных в норме и патологии объясняются, прежде всего, наличием поврежденного анатомического субстрата (мозжечка и его проекций), полученного вследствие опухолевого процесса и хирургического вмешательства. Кроме того, во многих аналогичных исследованиях подавляющее число пациентов получало химиотерапию и лучевую терапию в ходе лечения, из-за чего они демонстрировали серьезные кратко- и долговременные токсические эффекты на все системы организма, в том числе и когнитивные функции [26, 27]. В нашем исследовании, по-видимому, мы наблюдаем проявление долговременных эффектов, поскольку пациенты не получали никакой формы терапии и на момент исследования находились в ремиссии. Необходимо отметить, что важными симптомами когнитивно-аффективного синдрома, развивающегося и продолжающегося в форме последствия перенесенного лечения, являются хроническая усталость, снижение мотивации к деятельности и другие аффективные проблемы эндогенного характера, которые, безусловно, влияют на восприятие инструкции и побуждение к выполнению задания, что, в свою очередь, может оказывать влияние на параметры саккадических движений глаз [28, 29].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе исследованы нарушения основных характеристик саккадической системы, вызываемые дисфункцией мозжечка у детей, перенесших лечение по поводу опухолей ЗЧЯ. Выявленные глазодвигательные эффекты, состоящие в нестабильной фиксации взора, совершении неточных гиперметричных саккад и дезорганизации сканирования зрительной сцены, являются следствием дисфункций мозжечка и его проекций к другим структурам головного мозга при функционировании зрительно-глазодвигательной системы. Данные нарушения охарактеризованы количественными переменными и имеют нормативные значения, которые могут являться диагностическими критериями качественной и количественной оценки реабилитационного процесса.

Вместе с тем, по-видимому, описанные нарушения глазодвигательного поведения могут приводить к нарушениям психофизиологических и когнитивных

процессов у таких пациентов (восприятия, внимания, чтения и т.д.). Кроме того, описанное явление гиперметрии саккад можно рассматривать как глазодвигательное проявление атактического синдрома, характеризующегося нарушением удержания равновесия, походки, дисметрии крупной моторики и т.д. Представленную феноменологию зрительно-глазодвигательного поведения у пациентов, перенесших опухоль ЗЧЯ, необходимо учитывать в проводимых реабилитационных мероприятиях.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность директору ЛРНЦ “Русское Поле” А.Ф. Карелину за помощь в организации и поддержке проводимого исследования.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРВАНИЯ

Работа выполнена за счет средств госбюджета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Rizzolatti G., Craighero L.* Spatial attention: Mechanisms and theories. Adv. Psychol. Sci. 2: 171–198. 1998.
2. *Rose S.A., Djukic A., Jankowski J.J., Feldman J.F., Fishman I., Valicenti-Mcdermott M.* Rett syndrome: an eye-tracking study of attention and recognition memory. Development. Med. Child Neurol. 55(4): 364–371. 2013
3. *Шурупова М.А., Анисимов В.Н., Терещенко Л.В., Латанов А.В.* Влияние когнитивной задачи на параметры движений глаз при просмотре статических и динамических сцен. Сенсорные системы. 30(1): 53–62. 2016. [*Shurupova M. A., Anisimov V.N., Tereshchenko L.V., Latanov A.V.* Eye movement parameters are influenced by cognitive task in viewing of static and dynamic scenes. Sensory Systems. 30(1): 53–62. 2016. (In Russ)].
4. *White B.J., Munoz D.P.* The superior colliculus. Oxford handbook of eye movements. 1: 195–213. 2011.
5. *Leigh R.J., Zee D.S.* The Neurology of Eye Movements. 5th edition. New York. Oxford Univer. Press. 2015.
6. *Шурупова М.А., Анисимов В.Н., Латанов А.В., Касаткин В.Н.* Особенности нарушений движений глаз при поражениях мозжечка различной локализации. Рос. медико-биол. вестник им. академика И.П. Павлова. 24(3): 154–163. 2016. [*Shurupova M.A., Anisimov V.N., Latanov A.V., Kasatkin V.N.* Features of eye movement disorders in patients with cerebellar lesions of different localization. I.P. Pavlov Russ. Med. Biol. Herald. 24(3): 154–163. 2016. (In Russ)].
7. *Quinet J., Goffart L.* Cerebellar control of saccade dynamics: contribution of the fastigial oculomotor region. J. Neurophysiol. 113(9): 3323–3336. 2015.
8. *Beh S.C., Frohman T.C., Frohman E.M., Biousse V., Galetta S.* Cerebellar control of eye movements. J. Neuro-Ophthalmol. 37(1): 87–98. 2017.
9. *Golla H., Tziridis K., Haarmeier T., Catz N., Barash S., Thier P.* Reduced saccadic resilience and impaired saccadic adaptation due to cerebellar disease. Eur. J. Neurosci. 27(1): 132–144. 2008.
10. *Shaikh A.G., Marti S., Tarnutzer A.A., Palla A., Crawford T.O., Straumann D., Zee D.S.* Gaze fixation deficits and their implication in ataxia–telangiectasia. J. Neurol. Neurosurg. & Psychiatry. 80(8): 858–864. 2009.
11. *Буклина С.Б., Яковлев С.Б., Бухарин Е.Ю., Хейреддин А.С., Бочаров А.В., Сазонов И.А., Окишев Д.Н.* Клинико-нейропсихологический анализ вторичного лобного синдрома у больных с артериовенозными мальформациями, каверномами и гематомами мозжечка. Вопр. нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко. (4): 18–23. 2009. [*Buklina S.B., Yakovlev S.B., Bukharin E.Yu., Heyreddin A.S., Bocharov A.V., Sazonov I.A., Okishev D.N.* Clinical and neuropsychological analysis of secondary frontal syndrome in patients with arteriovenous malformations, cavernomas, and cerebellar hematomas. Zhurnal Vopr. Neirokhirurgii im. N.N. Burdenko. (4): 18–23. 2009. (In Russ)].
12. *Starowicz-Filip A., Chrobak A.A., Milczarek O., Kwiatkowski S.* The visuospatial functions in children after cerebellar low-grade astrocytoma surgery: A contribution to the pediatric neuropsychology of the cerebellum. J. Neuropsychol. 11(2): 201–221. 2017.
13. *Schmahmann J.D., Sherman J.C.* The cerebellar cognitive affective syndrome. Brain: J. Neurol. 121(4): 561–579. 1998.

14. *Beebe D.W., Ris F.D., Armstrong D., Fontanesi J., Mulhern R., Holmes E.* Cognitive and adaptive outcome in low-grade pediatric cerebellar astrocytomas: evidence of diminished cognitive and adaptive functioning in National Collaborative Research Studies (CCG 9891/POG 9130). J. Clin. Oncol. 23(22): 5198–5204. 2005.
15. *Kornienko V.N., Pronin I.N.* Neuroimaging: selected articles (2000–2007). Moscow. Andreeva T.M. 2008.
16. *Chechelnitskaia S., Kasatkin V.N., Shurupova M.A., Borodina I.D., Sarajkin Y.V., Karelin A.F., Skvorcov D.V., Baerbakh A.V., Zhuk D.V., Nikulin V.A.* Sensory conflict as a possible reason for disturbed postural stability in the children treated for cancer. Cell. Therapy Transplant. 8(4): 68–76. 2019.
17. *Mosconi M.W., Kay M., D'cruz A.M., Seidenfeld A., Guter S., Stanford L.D., Sweeney J.A.* Impaired inhibitory control is associated with higher-order repetitive behaviors in autism spectrum disorders. Psychol. Med. 39(9): 1559–1566. 2009.
18. *Шурупова М.А., Анисимов В.Н., Касаткин В.Н.* Глазодвигательные корреляты динамики психофизиологических и когнитивных нарушений у пациентов с медуллобластомой. Детская и подростковая реабилитация. 27(2): 50–56. 2016. [*Shurupova M.A., Anisimov V.N., Kasatkin V.N.* Oculomotor correlates of dynamics of psychophysiological and cognitive impairments in patients with medulloblastoma. Child and Adolescent Rehabilitation. 27(2): 50–56. 2016. (In Russ)].
19. *Danilov Y., Kaczmarek K., Skinner K., Tyler M.* Cranial Nerve Noninvasive Neuromodulation. In: Brain neurotrauma: molecular, neuropsychological, and rehabilitation aspects. Taylor & Francis, Boca Raton (FL) Eds: CRC Press. Chapter 44. 2015.
20. *Zihl J.* Visual scanning behavior in patients with homonymous hemianopia. Neuropsychologia. 33(3): 287–303. 1995.
21. *Ohad Gal.* fit_ellipse (https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/3215-fit_ellipse). MATLAB Central File Exchange. 2020.
22. *Serra A., Liao K., Martinez-Conde S., Optican L.M., Leigh R.J.* Suppression of saccadic intrusions in hereditary ataxia by memantine. Suppression of saccadic intrusions in hereditary ataxia by memantine. Neurology. 70(10): 810–812. 2008.
23. *Kheradmand A., Zee D. S.* Cerebellum and ocular motor control. Front. Neurol. 2: 53–68. 2011.
24. *Aring E., Grönlund M. A., Hellström A., Ygge J.* Visual fixation development in children. Graefe's Archiv. Clin. Exp. Ophthalmol. 245(11): 1659–1665. 2007.
25. *Ратманова П.О., Напалков Д.А., Богданов Р.Р., Латанов А.В., Турбина Л.Г., Шульговский В.В.* Влияние дефицита дофамина на процесс подготовки зрительно-вызванных саккадических движений глаз. Журн. высш. нерв. деят. 56(5): 590–596. 2006. [Ratmanova P.O., Napalkov D.A., Bogdanov R.R., Latanov A.V., Turbina L.G., Shulgovsky V.V. The effect of dopamine deficiency on the preparation of visually guided saccadic eye movements. Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. I.P. Pavlova. 56(5): 590–596. 2006. (In Russ)].
26. *Moore H.* An overview of chemotherapy-related cognitive dysfunction, or 'chemobrain'. Oncology. 28(9): 1–3. 2014.
27. *Soussain C., Ricard D., Fike J.R., Mazeron J.J., Psimaras D., Delattre J.Y.* CNS complications of radiotherapy and chemotherapy. The Lancet. 374(9701): 1639–1651. 2009.
28. *Cazzoli D., Antoniades C.A., Kennard C., Nyffeler T., Bassetti C.L., Müri R. M.* Eye movements discriminate fatigue due to chronotypical factors and time spent on task–a double dissociation. PloS One. 9(1): e87146. 2014.
29. *Borji A., Itti L.* Defending Yarbus: Eye movements reveal observers' task. J. Vision. 14(3): 29. 1–22. 2014.

Influence of Surgery-Related Cerebellar Dysfunction on the Saccadic System Performance in Children

M. A. Shurupova[a, b, c, *], V. N. Kasatkin[a, b], V. N. Anisimov[c], and A. V. Latanov[c]

[a] *Medical Rehabilitation Research Center "Russkoe Pole", Dmitry Rogachev Research Medical Center for Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology, Chechov, Russia*

[b] *Federal center of brain and neurotechnologies of the Federal Medical and Biological Agency of the Russian Federation, Moscow, Russia*

[c] *Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

**e-mail: shurupova.marina.msu@gmail.com*

Cerebellum plays a crucial role in control of saccadic eye movements and gaze fixation. The cerebellar impairment leads to various disorders of oculomotor behavior and related psychophysiological processes, which, in turn, may affect the efficiency of rehabilitation

process of patients who underwent tumor resection surgery on cerebellum. The purpose of this work was to determine the ways and the extent of influence of surgery-related cerebellar dysfunction on visuomotor system of children. We also intended to develop criteria based on these findings to assess the patient's rehabilitation progress quantitatively as well as qualitatively. 66 children between 9 and 17 years old with surgery-related cerebellar dysfunction were enrolled in this study. The control group consisted of 54 healthy children of the same age. The subjects were to perform 3 oculomotor tasks while their eye movements were recorded using eye tracking technique. We found that children with cerebellar dysfunction had impaired gaze fixation ability, executed more hypermetric saccades and experienced difficulties with visual scanning. These oculomotor system deficiencies inevitably lead to disturbances of various cognitive processes such as visual perception, attention focusing, memory and reading. Also, hypermetric saccades can be treated as a special case of ataxia usually found in patients with cerebellar dysfunction. We conclude that assessment of oculomotor deficiencies should be used to increase the effectiveness of rehabilitation procedures for patients with cerebellar dysfunction.

Keywords: cerebellum, saccades, eye tracking, rehabilitation, cerebellar tumor, cognitive functions

ЦИТИРОВАТЬ:

Шурупова М.А., Касаткин В.Н., Анисимов В.Н., Латанов А.В. Влияние мозжечковой дисфункции, приобретенной в результате лечения опухоли, на функционирование саккадической системы у детей. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 106(7): 866–879.

DOI: 10.31857/S0869813920070079

TO CITE THIS ARTICLE:

Shurupova M.A., Kasatkin V.N., Anisimov V.N., Latanov A.V. Influence of Surgery-Related Cerebellar Dysfunction on the Saccadic System Performance in Children. Russian Journal of Physiology. 106(7): 866–879.

DOI: 10.31857/S0869813920070079

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 7, с. 880–889

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

EVENT-RELATED CHANGES IN EEG SPECTRAL POWER CORRESPONDING TO CREATIVE AND TRIVIAL DECISIONS

© 2020 N. V. Shemyakina[1], *, ** and Zh. V. Nagornova[1]

[1]*Sechenov institute of evolutionary physiology & biochemistry Russian academy of sciences, St. Petersburg, Russia*

**E-mail: natalia.shemyakina@iephb.ru*

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

Received November 5, 2019
Revised March 22, 2020
Accepted May 4, 2020

The study aimed to explore EEG correlates of a person's creative (non-trivial) and trivial decisions finding in conditions of associative search by means of event-related synchronization/event-related desynchronization (ERS/ERD) spectral power changes analysis. Sixty subjects had to fulfill RAT (Remote associative test) alike tasks while EEG registering. There were no differences in time responses while remote association and trivial decisions search (around 3 seconds in both case). An increase in ERS was observed for the central frequencies 4 Hz at F7 site (1500–1000 ms before note of decision), 3 Hz at the Fz site (500–1000 ms before note of decision), and 3.5 Hz at T3 site (in the last 500 ms before decision). Obtained findings stressing the role of low frequency bands (theta and delta) in wide associative field search leading for creative and original decisions.

Keywords: associative search, non-trivial and trivial decisions, ERS/ERD, theta, delta EEG frequency bands

DOI: 10.31857/S0869813920070067

Creative activity is a complex and multifactorial mental activity that combines memory, attention, decision-making, motivation, and different types or strategies of thinking. In the case of creative activity, the transformation of existing, or the appearance of new, original associations, knowledge, and products occurs.

Creative thinking has long been investigated by psychologists in terms of the structure of intelligence and abilities of the person [1]. Various tests have been developed to determine the creative abilities level of the person and investigations conducted into the personal characteristics of more and less creative people [2–5].

At the same time, it is possible to assume that in their everyday lives each person is capable of making both creative and trivial decisions, and the brain activity in relation to qualitatively different decisions differs [6]. From the "evolutionary point of view" both trivial and creative decisions have their advantages, as the first can save the time in the critical situation, the second – can suggest a new approach. The question of distinctions in electroencephalographic (EEG) correlates of creative and trivial decisions in the same person is insufficiently investigated. Exploration of this question can matter for understanding brain mechanisms [7, 8].

According to Mednick's theory of creative thinking [5] in the course of creative activity new associative links have to be formed. At the same time, the more remote the character-

istics and elements of a problem people can connect together, the more creative and original such decisions and processes will be.

Based on this provision of associative theory, within the present research the task was focused on initiation of a verbal associative search, leading to finding creative (association of remote characteristics of concepts) and trivial decisions in the conditions of the same instruction. Today, information exists on the physiological correlates of brain maintenance of creativity [9–13]. However, there is little information on what actually occurs at the moment a person makes a creative, original decision and how processes providing creative decisions in the brain differ from processes providing trivial decisions in the conditions of the same instruction.

One of the informative parameters of a change in brain bioelectric activity, which allows the chance to obtain additional information on when distinctions occur, is the time and frequency transformation of the EEG signal in event-related synchronization/desynchronization (ERS/ERD) EEG analysis. [14, 15]. The study aimed to explore EEG correlates of a person's creative (non-trivial) and trivial decision-making in conditions of associative search by means of ERS/ERD spectral power changes analysis.

METHODS

Participants. In total, 60 native Russian-speaking participants took part in the study (18 males, mean age 27 ± 3, two left-handed [16]), with education above the secondary school level. At the time of the study, all participants were healthy and were not following any medical treatment. Subjects gave their voluntary agreement to participate in the psychophysiological study, which was conducted in accordance with all the ethical standards of the 1964 Helsinki Declaration and its later revisions.

Tasks and procedure of the investigation. The experimental task [17] was based on the modified Remote Associates Test (RAT) [5]. The RAT is widely used in psychophysiological studies of creativity for inducing states of remote associative search and insight [10, 11]. The designed experimental task preserved the remote associative search and could lead to finding of both trivial and creative solutions.

However, differently from the classical RAT, our task consisted of words from different/remote semantic fields and many brief trials with the same instruction — to "be original". A lot of trials were necessary to fit the stimulus-response ERP paradigm of a psychophysiological study. Participants were presented with 444 noun pairs of singular nominative form, IPM (items per million) >10. Nouns were of one, two, three, four, or five syllable length, with similar or comparable length in each pair — e.g., "cake" and "towel". Participants were asked to come up with a non-trivial/original definition/adjective for each of the noun pairs. As an example, the remote association between the above words ("cake" and "towel") in Russian could be "waffle". We expected the given instruction to facilitate subjects' associative search for remote associations between nouns in the pairs.

Participants were seated in a comfortable chair in a separate shielded room. Stimuli presentation was performed via a 17-inch LCD monitor placed 1.5 meters away from the participant's head; the average visual angle of stimuli presentation was 4.9' × 2.1'. Nouns were presented in black bold typeset above and below the fixation cross to minimize horizontal eye movements. For the first 300 ms, participants saw a black cross on a white screen. Each noun pair was shown for 400 ms in the center of the white screen. Following the noun pair presentation, the participant was given 4500 ms to think of a non-trivial, original definition linking the two given nouns (belonging to remote semantic fields) which could also be associated and used with each of the nouns separately. If the participant came up with a definition during this creative task time, she/he had to press the button with her right forefinger and, after seeing the question mark on the screen at the end of the creative task period (5100 ms from the trial onset), tell the researcher the suggested definition via microphone.

If no definition was found for the two nouns and there was no pushing of the button, the participant had to say 'no' after the presentation of the question on the screen. All the participants' answers were recorded via the audio system for the following data analysis. The interval between the trials varied randomly between 1500 and 2500 ms, and trials' presentation were also randomized across the participants to minimize order and fatigue effects. The complete investigation, together with all preparation and breaks, lasted around 70 minutes.

EEG data recording. Electroencephalogram (EEG) was recorded using the Mitsar 31 channel EEG system (Mitsar Ltd., St. Petersburg, http://www.mitsar-medical.com) by means of the WinEEG software package (V.A Ponomarev, Ju.D Kropotov, register for computer program RF № 2001610516, 08.05.2001). Silver chloride electrodes were positioned according to the 10–20 system (Fp1, Fp2, F7, F3, Fz, F4, F8, T3, C3, Cz, C4, T4, T5, P3, Pz, P4, T6, O1, O2). The input signals were referenced to the linked ears, were filtered between 0.53 Hz and 30 Hz, and were digitized at a rate of 500 Hz, notch filter 45–55 Hz. The ground electrode was located on the left hand. Resistance of the electrodes did not exceed 5 kOhm.

EEG data analysis. All the data were initially transformed by WAR (weighted averaged reference) [18] in order to diminish the influence of common reference. Eye blink artifacts were corrected by zeroing the activation curves of individual independent components corresponding to eye blinks. These components were obtained by application of independent component analysis (ICA) to the raw EEG fragments. The method has been previously described [19–21]. High and low frequency activities were marked as artifacts and were excluded from further analysis. The thresholds were set as follows: (1) 50 μV for slow waves in the 0–1 Hz band; (2) 35 μV for fast waves in the 20–35 Hz band.

For the data analysis, we synchronized participants' EEG records on button pressing and investigated the time interval of EEGs before the button pressing to figure out distinctions in the EEG signal changes connected with the different quality of tasks performed (original, trivial). The desynchronization and synchronization of EEG connected with the events were calculated by means of Morlet wavelet transformation [22]: the frequency-time characteristics of the EEG signal were evaluated for the 5000 ms analysis period (2000 ms before pressing the button i.e., when finding the decision and 3000 ms after pressing the button) for different central frequencies in the range of 2–7.5 Hz with 0.5 Hz steps, with a five cycle width of the wavelet. To reduce data dispersion, the spectral power dynamic of EEG was smoothed by moving averages with the width of an average period equal 100 ms.

Participants' trials with RT (response times) of less than 2000 ms were excluded from analysis to diminish the influence of the stimulus presentation on the EEG. To define how many experimental trials (short fulfilled tasks) were enough for averaging EEG data and ERS/ERD analysis, group dispersion of average EEG power in each analyzed time interval for chosen electrode was evaluated empirically with different numbers of averaged trials. When averaging more than 40 and 50 trials of each type (trivial, non-trivial answers), dispersions were practically unchanged; when averaging 30 trials, group dispersion of the average EEG power increased. Thus, for each participant, 40 was the optimum number of trials for averaging. Those subjects who had fewer than 40 artifact free trials of each type were excluded from data analysis. Values of EEG power signal dynamics for the remaining subjects (21 persons, six men, age 26.6 ± 6 years) were averaged. For reduction of the influence of ERP components on ERS/ERD, ERPs were calculated and subtracted from each fragment of EEG [23]. Distinctions in the ERS/ERD were investigated in the range of interest: frequencies of EEG (2–7.5 Hz) with a step of 0.5 Hz in three 500-millisecond intervals (1500–1000 ms; 1000–500 ms; 500–0 ms) before pressing the button. Thus we focused on two bands of interest (Δ: 2–3.8 Hz and θ: 4–7.5 Hz). These frequency bands are described as playing a role in verbal memory processes and associative search [24–27].

The obtained values of absolute power for the specified time windows for each EEG site on each person were taken under logarithm as the normalization of data. The statistically

significant differences of EEG power in different conditions were evaluated by means of unpaired Student's *t*-test that was chosen as provided a smaller number of positive results. The regions of the interest were assessed by the differential time-frequency maps between original and trivial findings. The power differences were observed in frontal and temporal regions of the left hemisphere. The non-accidental spectral power differences were estimated as significant differences with $p < 0.01$ in the regions of interest and $p < 0.01$ (in some cases 0.05) in the nearby ranges of frequencies, or in the nearby intervals of time. Probabilities were corrected for multiple comparisons using a false discovery rate procedure (http://sdmproject.com/utilities/?show=FDR).

RESULTS AND DISCUSSION

According to the literature data, the search for remote associations during RAT performance could be considered as a creative process leading to an original decision [28]. Remote associations [5] combine concepts on the basis of their non-obvious characteristics (their figurative/extended meaning/sense).

In the present research, subjects were asked to find an original unifying definition of the nouns shown in pairs. Subjects' answers that focused on the determination of non-obvious/implicit signs of the concepts (making figurative sense) were considered creative and original, while those making literal sense, defining obvious external characteristics such as the size, color, or form of an object, were considered trivial.

We were interested in whether there are any physiological distinctions in subjects' finding of qualitatively different (creative and trivial) decisions in conditions of similar instruction and performance of the same activity — searching for unifying definitions. On the basis of subjects' answers, three types of trial were revealed: a) those connected with finding original, creative answers; b) those connected with finding trivial answers; and c) trials without answers. We did not consider the last type of trial as there was no possibility of their synchronization on pressing the button.

Explored subjects on average gave 295 ± 60 answers, of which 119 ± 37 on average were focused on the determination of non-obvious characteristics of the concepts and were considered by us to be original [28] and creative.

The average time for finding the remote defining association was about 3 ± 0.24 seconds, while for the trivial it was 3 ± 0.29 seconds: those times did not differ statistically. It should be noted that in a research, Jung-Beeman and colleagues [29] spent time finding insightful decisions (that unexpectedly came to mind) and non-insightful decisions (logically built) upon implementation of the modified RAT test that also did not reveal significant differences.

Furthermore, at separate EEG sites, for separate frequencies with 0.5 Hz step, Student's *t*-test was applied for statistical assessment of EEG event-related power changes in the 2–7.5 Hz range.

When comparing average EEG power values (corresponding to original and trivial answers from subjects) in various frequency bands and various intervals of time, for the majority of EEG sites, statistically significant distinctions were not revealed or were observed chaotically.

Apparently statistically significant distinctions that appeared in the case of plurality of comparisons we considered as false alarms (statistical errors of the first type). Only at sites F7, T3, and Fz were statistically significant differences revealed ($p < 0.01$, and in some cases 0.05, which were in the nearby ranges of frequencies, or in the nearby intervals of time, or both). As it is rather difficult to explain these group of significant distinctions only as a result of multiple comparisons, we considered them as statistically significant effects. The greatest statistically significant differences were observed for the central frequency of 3 Hz at the Fz site, 3.5 Hz at T3, and 4 Hz at F7. These differences were significant after

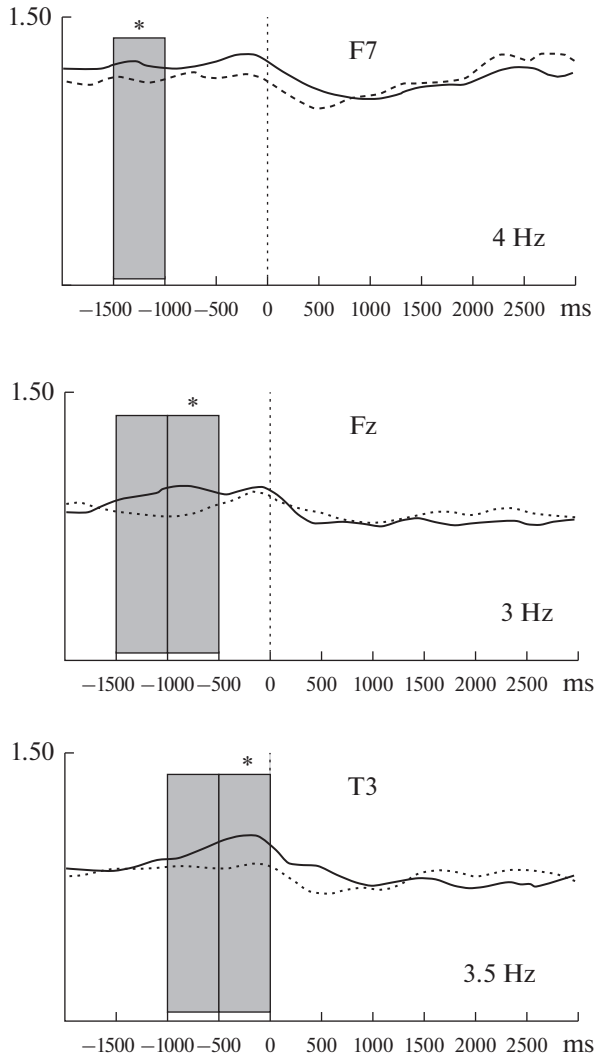


Fig. 1. Event-related changes of EEG power during the finding of original (associative) and trivial decision.

FDR correction ($p < 0.05$). Graphical representation of the dynamics of EEG power at the specified sites during the finding of original (associative) definitions and trivial answers are presented in Fig. 1.

The illustration is given for a time interval 5000 ms (2000 ms before pressing the button, 3000 ms after). The continuous line – the solution of a task was followed by finding of original answers, a dashed line – the solution of a task was followed by finding of trivial answers. A vertical dashed line – pressing the button as the mark of decision finding. Ordinate axis – P (μV^2), abscissa axis – time (ms).

Grey bars mark time windows of 500 ms for those site, that revealed the significant ($p < 0.05$) differences of event-related changes of EEG power. Star marks the time windows that re-

vealed the maximum difference for the central frequency of wavelet. The central frequency of wavelet for different sites is presented in the in the bottom right corner.

At the F7 site, differences in EEG power during the search for original (remote) associations were observed in the time interval 1500–1000 ms before pressing the button, with the central frequency 4 Hz: differences (taking into account the properties of the wavelet) were also observed in the interval for the nearby frequencies (2.5–5.5 Hz). We do not exclude the possibility that the specified time interval could also be covered by the duration of visual ERP (800–1000 ms) and the reaction of the synchronization in delta band frequencies [30, 31] for some numbers of averaged trials with RT of 2000 ms. However, observed differences could hardly be related to the latter, as the fronto-temporal site (lateral frontal cortex) in the left hemisphere of the brain is not a typical zone for distribution of visual ERP and reactions of synchronization (traditional distribution of the visual ERP is much more pronounced in the parietal and occipital areas of the cortex). In this situation, observed differences can be connected with the specificity of the performed task, in one case, leading to the finding of an associative remote definition and, in another, to a literal definition of characteristics of concepts in conditions of similar instruction.

At Fz site, the maximum difference was observed for the central frequency 3 Hz (2.5–4.2 Hz) in the time interval of 500–1000 ms before pressing the button. At T3, the maximum distinction in power was observed for the central frequency 3.5 Hz (2.5–6 Hz) in the last 500 ms before pressing the button. It is known that spontaneous pressing of the button is connected with the emergence of readiness potential about 500 ms before pressing [32, 33]. Pressing is followed by a desynchronization in the sensorimotor cortex zones, mostly in the contralateral hemisphere at a frequency greater than 10 Hz [34, 35]. In the range of slow frequencies, emergence of EEG reaction at the central sites is possible [36, 37]. However, in our case, spontaneous pressing was present in all trials considered, and localization of observed differences (average values of absolute power and the temporal zone in the cortex in the left hemisphere of the brain were greater than at Fz site) does not allow us fully to correlate observed differences in brain reaction when pressing the button.

From this, it is possible to conclude that the finding of creative decisions was followed by a higher level of synchronization of the event-related low-frequency component of EEG in the fronto-temporal and middle temporal regions of the left hemisphere of the brain, as well as in the fronto-central region. This does not exclude the possible existence of changes in other frequency ranges, but indicates the importance of the synchronization of a low-frequency component of EEG for brain processes in associative search and related states. Moreover, in a number of studies (for a review see [38–40]) addressing the nature of EEG signals, it has been noted that synchronous low-frequency (slow wave) activity can modulate the high-frequency component of a bioelectric signal when cognitive processes occur.

The obtained results are partly in agreement with the data of our colleagues Danko et al. [41], who revealed an increase of power in the delta (1.5–3.5 Hz) EEG band in the front (bilaterally) and middle temporal areas of the left hemisphere of the brain during fulfilment of verbal creative tasks (creation of associative chains) focused on use of an insight strategy in tasks' performance by non-actor students. For the general group of subjects, including both student actors and student non-actors, bilateral increase in power in the delta and theta (4–7 Hz) EEG frequency bands was observed in the frontal cortex zone during the creation of associative chains. The results of the present research can also be correlated to data from Razumnikova, who found an increase in EEG power in the teta-1 (4–6 Hz) frequency band in the frontal cortex areas when finding remote associations (RAT was used) in comparison with the finding of simple associations [27]. In the earlier work of Whitton [42], it was reported that four seconds before healthy subjects gave their creative answers when performing tasks with creative thinking, slow activity in the delta and theta frequencies appeared in their EEG.

At the same time, the results of the present research contradict the data [43] demonstrating a decrease in EEG power in the theta band in the earlier study when performing a task on overcoming a stereotype of long-term memory, a search for an original ending to well-known proverbs and sayings with the purpose of changing their sense. Firstly, this can be explained through features of the EEG signal processing (in the present research, we have revealed short-term synchronization of slow frequencies of EEG) and by differences in the tasks designs.

The increase in power in the delta EEG frequency band in the frontal and temporal zones of the cortex during the solving of mental tasks by healthy subjects can be considered a motivational component of the task that has to be solved [40], or can arise from attention focus and its activation in relation to internal processes, braking of irrelevant information [44], or the comparison of signals and decision-making [45]. At the same time, an increase in synchronization in the theta frequencies could be treated as an indicator of the active involvement of the corresponding cortex zones in the maintenance of mental problem-solving with different complexity levels and the demands of memory load, concentration, and emotional reactions. An increase in theta activity can characterize cortex activation level. The research of Pizagalli and colleagues revealed a positive correlation between the current density of the theta activity generator in the inferior part of the cingula gyrus BA24/32 and the metabolism of glucose [46] that characterizes the cortex activation level. After that, the phenomenon of synchronization itself is considered in the involvement of a large number of neural populations in the realization of the studied activity [47].

In our investigation, synchronization of EEG in the range of theta and delta frequencies was observed for both cases (finding of trivial and original decisions); at the same time, the search for remote associations seemed to be carried out with the higher level of activation of a number of cortex zones than for trivial associations.

According to the expected schema of the search for definitions in both cases (finding creative and trivial definitions), subjects needed to carry out a lexical analysis of words [48], to concentrate on a problem and, as the result of a search for remote associative links between concepts, to choose a decision which was internally considered to be original. As in both cases it was necessary for subjects to carry out a lexical analysis of the words and to concentrate on the problem, the quality of the found solution could presumably be affected (influenced) by the depth of the associative search – or, in other words, mental memory load during the search for associative definitions of the concepts. Also, it is impossible to exclude the condition of the instruction to "be original" from the subjects' subjective evaluation of their own decisions that was presumably happening before pressing the button.

As the mentioned processes are tightly bound with the operation of verbal information, detected differences in the frontal and temporal cortex zones in the left hemisphere of the brain are quite explainable. Presumably, the increase in power in the delta and theta frequency bands in these zones in earlier time intervals can be connected with the processes underlying verbal associative search (memory loading) when finding the remote characteristics of the presented concepts, whereas the later stages – around 1000 ms before pressing – reflect the motivational and evaluation components connected with the search and choice evaluation [49, 50] of the original decision.

The results are indirectly comparable with those achieved in an earlier PET research [51], where an increase in the regional blood flow in the cortex in the left hemisphere of the brain was shown (BA 47) when there was a need to be original in the condition of verbal creative task performance in comparison with performance of a non-creative task.

At the same time, higher values for event-related absolute power in the fronto-central (Fz) site while finding original decisions in the range of frequencies 2.5–4.2 Hz, with the central frequency at 3 Hz, seem to be connected with the need to preserve internal attention and eliminate unnecessary information [44] for a successful search (finding an original decision) in the wide associative field of concepts. This assumption corresponds with previ-

ous results demonstrating a decrease in EEG spectral power in the beta2 frequency band in the left frontal areas in searching for the original definition of a word using another from a remote associative field [52].

CONCLUSIONS

By means of an ERS/ERD method of EEG data analysis, EEG correlates of finding verbal creative decisions were investigated, focused on a search for remote associations in comparison with making trivial decisions focused on the definition of external characteristics of the phenomena and objects. We revealed an increase in event-related synchronization in the delta and theta frequency bands in the frontal and temporal zones of the left hemisphere of the brain and in the front and central cortex areas while making creative decisions. We assume that observed differences in the early stages, before the subject made a decision, can be connected with deeper loading of the memory and the search for definitions in the wide associative field, and can reflect the choice and assessment of originality of the thought-up definition in the later stage.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors sincerely thank all the participants of the study. Authors particularly thank V.A. Ponomarev – the developer of a software package WinEEG, for his additionally elaborated options necessary for the analysis of data, for valuable methodical and advisory help. Authors also thank A. Valjamae for his comments to the text.

SOURCE OF SUPPORT

Russian Government program with reg. № AAAA-A18-118012290142-9 and in part by Russian Foundation for Basic Research grant № 19-015-00412.

REFERENCES

1. *Guilford J.P.* The nature of human intelligence. N.Y. Mc-Graw Hill. 1967.
2. *Guilford J.P.* Creativity. Am. Psychol. 5: 444–454. 1950.
3. *Guilford J.P, Wilson R.C., Christensen P.R.* A factor-analytic study of creative thinking: II. Administration of tests and analysis of results. Rep. Psychol. Lab. No8: Univer. Southern Calif. 1952.
4. *Torrance E.P.* Guiding creative talent. Englewood Cliffs. N.J. US. Prentice-Hall Inc. 1962.
5. *Mednick S.A.* The associative basis of the creative process. Psychol. Rev. 69: 220–232. 1962.
6. *Grabner R.H., Fink A., Neubauer A.C.* Brain correlates of self-rated originality of ideas: evidence from event-related power and phase-locking changes in the EEG. Behav. Neurosci. 121: 224–230. 2007.
7. *Bechtereva N.P.* The Usefulness of Psychophysiology in Intellectual Life. Honorary Lecture. 14th World Congress of Psychophysiology. The Olympics the Brain. September 8–13, 2008. St. Petersburg. Russia. St. Petersburg. IHB RAS. 2008.
8. *Bechtereva N.P.* The Magic of Creativity and Psychophysiology. Considerations, thoughts, hypotheses. St. Petersburg. IHB RAS. 2006.
9. *Sternberg R.J., O'Hara L.A.* Creativity and intelligence. pp. 251–273. In: *Sternberg R.J.* (Ed). Handbook of Creativity. Cambridge Univer. Press. 1999.
10. *Arden R., Chavez R.S., Grazioplene R., Jung R.E.* Neuroimaging creativity: a psychometric view. Behav. Brain Res. 214: 143–156. 2010.
11. *Dietrich A., Kanso R.A.* Review of EEG, ERP, and Neuroimaging Studies of Creativity and Insight. Psychol. Bull. 136: 822–848. 2010.
12. *Beaty R.E., Benedek M., Silvia P.J., Schacter D.L.* Creative Cognition and Brain Network Dynamics. Trends Cogn. Sci. 20: 87–95. 2016.
13. *Nagornova Zh.V., Shemiakina N.V.* Differences of activations in visual and associative zones during figurative and verbal activity. Ross. Fiziol. Zh. Im. I. M. Sechenova. 100: 418–432. 2014. (In Russ).
14. *Pfurtsheller G., Aranibar A.* Event-related cortical desynchronization detected by power measurement of scalp EEG. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 42: 817–826. 1977.

15. *Kiebel S., Tallon-Baudry C., Friston K.J.* Parametric analysis of oscillatory activity as measured with EEG/MEG. Hum. Brain Mapp. 26: 170–177. 2005.
16. *Oldfield R.G.* The assessment and analysis of handedness: the Edinburgh inventory. Neuropsychologia. 9: 97–113. 1971.
17. *Shemyakina N.V., Nagornova Zh.V.* Comparative research of perception couples of nouns from the nearby and remote semantic fields by visual ERP approach. Materials of the conference "High Technologies, Basic and Applied Researches in Physiology and Medicine" Vol. IV. St. Petersburg. November 23–26. 2010.
18. *Lemos M.S., Fisch B.J.* The weighted average reference montage. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 79: 361–370. 1991.
19. *Vigário R.N.* Extraction of ocular artifacts from EEG using independent component analysis. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 103: 395–404. 1997.
20. *Jung T.P., Makeig S., Humphries C., Lee T.W., McKeown M.J., Iragui V., Sejnowski T.J.* Removing electroencephalographic artifacts by blind source separation. Psychophysiology. 37: 163–178. 2000.
21. *Tereshchenko E.P., Ponomarev V.A., Kropotov Yu.D., Müller A.* Comparative efficiencies of different methods for removing blink artifacts in analyzing quantitative electroencephalogram and event-related potentials. Human Physiology. 35: 241–247. 2009.
22. *Tallon-Baudry C., Bertrand O.* Oscillatory gamma activity in humans and its role in object representation. Trends Cogn. Sci. 3: 151–162. 1999.
23. *Kalcher J., Pfurtsheller G.* Discrimination between phase-locked and non-phase-locked event-related EEG activity. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 94: 381–384. 1995.
24. *Meyer L., Grigutsch M., Schmuck N., Gaston P., Friederici A.D.* Frontal-posterior theta oscillations reflect memory retrieval during sentence comprehension. Cortex. 71: 205–218. 2015.
25. *Pavlov Y.G., Kotchoubey B.* EEG correlates of working memory performance in females. BMC Neurosci.18: 26. 2017.
26. *Yang C.Y., Huang C.K.* Working-memory evaluation based on EEG signals during n-back tasks. J. Integr. Neurosci. 17(3–4): 695–707. 2018.
27. *Razumnikova O.M.* Creativity related cortex activity in the remotes associates task. Brain Res. Bull. 73: 96–102. 2007.
28. *Wilson R.C., Guilford J.P., Christensen P.R.* The measurement of individual differences in originality. Psychol. Bull. 50: 362–370. 1953.
29. *Jung-Beeman M., Bowden E.M., Haberman J., Frymiare J.L., Arambel-Liu S., Greenblatt R., Reber P.J., Kounios J.* Neural activity when people solve verbal problems with insight. PLoS Biol. 2(4): E97. 2004.
30. *Başar E., Demiralp T., Schürmann M., Başar-Eroglu C., Ademoglu A.* Oscillatory Brain Dynamics, Wavelet Analysis and Cognition. Brain Lang. 66: 146–183. 1999.
31. *Basar E., Basar-Eroglu C. Karakas S., Schurmann M.* Brain oscillations in perception and memory. Int. J. Psychophysiol. 35: 95–124. 2000.
32. *Libet B., Gleason C.A., Wright E.W., Pearl D.K.* Time of conscious intention to act in relation to onset of cerebral activity (readiness-potential). The unconscious initiation of a freely voluntary act. Brain. 106(Pt 3): 623–642. 1983.
33. *Keller I., Heckhausen H.* Readiness potentials preceding spontaneous motor acts: voluntary vs. involuntary control. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 76: 351–361. 1990.
34. *Pfurtscheller G., Aranibar A.* Evaluation of event-related desynchronization (ERD) preceding and following voluntary self-paced movement. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol 46: 138–146. 1979.
35. *Leocani L., Toro C., Manganotti P., Zhuang P., Hallett M.* Event-related coherence and event-related desynchronization/synchro-nization in the 10 Hz and 20 Hz EEG during self-paced movements. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 104: 199–206. 1997.
36. *Deecke L., Grözinger B., Kornhuber H.H.* Voluntary finger movement in man: cerebral potentials and theory. Biol. Cybern. 23: 99–119. 1976.
37. *Urbano A., Babiloni C., Onorati P., Babiloni F.* Dynamic functional coupling of high resolution EEG potentials related to unilateral internally triggered one-digit movements. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 106: 477–487. 1998.
38. *Womelsdorf T., Vinck M., Leung L.S., Everling S.* Selective theta-synchronization of choice-relevant information subserves goal-directed behavior. Front Hum. Neurosci 4: 210. 2010.
39. *Nyhus E., Curran T.* Functional role of gamma and theta oscillations in episodic memory. Neurosci. Biobehav. Rev. 34: 1023–1035. 2010.
40. *Knyazev G.G.* EEG delta oscillations as a correlate of basic homeostatic and motivational processes. Neurosci. Biobehav. Rev. 36: 677–695. 2012.
41. *Danko S.G., Starchenko M.G., Bechtereva N.P.* EEG Local and Spatial Synchronization during a Test on the Insight Strategy of Solving Creative Verbal Tasks. Human Physiology. 29: 502–504. 2003.

42. *Whitton J.L., Moldofsky H., Lue F.* EEG frequency patterns associated with hallucinations in schizophrenia and "creativity" in normal. Biol. Psychiatry. 13: 123–133. 1978.
43. *Shemyakina N.V., Danko S.G., Nagornova Zh.V., Starchenko M.G., Bechtereva N.P.* Changes in the power and coherence spectra of the EEG rhythmic components during solution of a verbal creative task of overcoming a stereotype. Human Physiology. 33: 524–530. 2007.
44. *Harmony T., Fernández T., Silva J., Bernal J., Díaz-Comas L., Reyes A., Marosi E., Rodríguez M., Rodríguez M.* EEG delta activity: an indicator of attention to internal processing during performance of mental tasks. Int. J. Psychophysiol. 24: 161–171. 1996.
45. *Başar-Eroglu C., Başar E., Demiralp T., Schürmann M.* P300-response: possible psychophysiological correlates in delta and theta frequency channels. Int. J. Psychophysiol. 13: 161–179. 1992.
46. *Pizzagalli D.A., Oakes T.R., Davidson R.J.* Coupling of theta activity and glucose metabolism in the human rostral anterior cingulate cortex: an EEG/PET study of normal and depressed subjects. Psychophysiology. 40: 939–949. 2003.
47. *Klimesch W.* EEG alpha rhythms and memory processes. Int. J. Psychophysiol. 26: 319–340. 1997.
48. *Bastiaansen M.C., van der Linden M., Ter Keurs M., Dijkstra T., Hagoort P.* Theta responses are involved in lexical-semantic retrieval during language processing. J. Cogn. Neurosci. 17: 530–541. 2005.
49. *Thompson-Schill S.L., Esposito M.D., Aguirre G.K., Farah M.J.* Role of left inferior prefrontal cortex in retrieval of semantic knowledge: a reevaluation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 14792–14797. 1997.
50. *Kan I.P., Thompson-Schill S.L.* Selection from perceptual and conceptual representations. Cogn. Affect. Behav. Neurosci. 4: 466–482. 2004.
51. *Shemyakina N.V.* PET study of verbal creativity in different evolved emotional conditions. Book of abstracts International C.I.A.N.S conference. Bratislava. Slovakia. 72. 2005.
52. *Shemyakina N.V., Dan'ko S.G.* Changes in the power and coherence of the β2 EEG band in subjects performing creative tasks using emotionally significant and emotionally neutral words. Human Physiology. 33: 20–26. 2007.

TO CITE THIS ARTICLE:

Shemyakina N.V., Nagornova Zh.V. Event-Related Changes in EEG Spectral Power Corresponding to Creative and Trivial Decisions. Russian Journal of Physiology. 106(7): 880–889.

DOI: 10.31857/S0869813920070067

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 7, с. 890–897

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

БИОЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ГОЛОВНОГО МОЗГА У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ВИРУСНЫМ ЭНЦЕФАЛИТОМ

© 2020 г. В. Б. Войтенков[1, 3, *], М. В. Синкин[2], Н. В. Скрипченко[1], Е. В. Екушева[3], Е. Ю. Горелик[1], Н. В. Марченко[1], А. В. Штеклейн[4], М. А. Бедова[1]

[1]Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

[2]НИИ скорой помощи им Н.В. Склифосовского, Москва, Россия

[3]Академия постдипломного образования, ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, Москва, Россия

[4]Медицинский институт Российского университета дружбы народов, Москва, Россия

*****E-mail: vlad203@inbox.ru*

Поступила в редакцию 05.02.2020 г.
После доработки 06.03.2020 г.
Принята к публикации 04.05.2020 г.

Целью работы явилась оценка изменений биоэлектрической активности головного мозга по данным электроэнцефалографии (ЭЭГ) у детей с острым вирусным энцефалитом. Обследовано 26 детей, доставленных в Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства России, с клинически установленным диагнозом “вирусный энцефалит”. Преобладали мальчики в соотношении 18 : 8, средний возраст группы – 12 ± 2.1 года. Все пациенты находились в остром периоде (первые 14 суток). В качестве группы сравнения был проведен анализ ЭЭГ 10 здоровых детей. Группы были однородны по полу и возрасту. Всем пациентам регистрировали ЭЭГ энцефалографом Нейрон Спектр 5 (Россия, Иваново), затем проводился визуальный анализ ЭЭГ и спектральный анализ частот. Оценивалась спектральная мощность в диапазонах альфа-, тета- и дельта-частот, а также отношения спектральной мощности альфа-/тета- и альфа-/дельта-диапазонов. При визуальном анализе ЭЭГ в 100% случаев у детей в остром периоде вирусного энцефалита регистрировалось диффузное замедление с регистрацией дельта- и тета-волн. Очаговые изменения в виде острых волн регистрировались в 85% случаев (21 пациент). Периодической активности в обследованной группе пациентов ни в одном случае зарегистрировано не было. При количественном анализе по результатам статистической обработки выявлено статистически значимое снижение соотношения альфа/тета ($p = 0.035$), максимальной альфа ($p = 0.046$) и минимальной тета ($p = 0.044$) у пациентов с энцефалитами в сравнении с группой здоровых детей. Делается заключение,что у пациентов детского возраста в остром периоде вирусного энцефалита регистрируется достоверное нарушение нормального соотношения мощности альфа- и тета-ритмов на ЭЭГ. Это нарушение проявляется снижением мощности альфа- и тета-ритма. Можно предполагать, что причиной данного снижения является угнетение функциональной активности таламуса и таламо-кортикальных путей, а также ретикулярной формации головного мозга.

Ключевые слова: дети, электроэнцефалография, тета-волны, энцефалит

DOI: 10.31857/S0869813920070109

Электроэнцефалография (ЭЭГ) является одним из методов оценки функционального состояния головного мозга, который применяют при невозможности клинической оценки у пациентов с энцефалопатией, тяжесть энцефалопатии приводит к нарушению уровня бодрствования [1]. Показания к ЭЭГ – диагностика пароксизмальных состояний, прогнозирование исхода заболевания, приведшего к развитию критического состояния, оценка биоэлектрической активности при подозрении на смерть мозга и т.д. [2]. До 90% нативной ЭЭГ в условиях спокойного бодрствования у здоровых лиц занимает активность частотой до 10 Гц, высотой 40–80 мкВ, именуемая альфа-ритм, либо альфа-активность [3]. Наиболее общепринятой в настоящее время является теория таламического генеза альфа-ритма с релейными ядрами таламуса в качестве основных его генераторов [4]. Существует предположение, что альфа- и тета-ритм формируют так называемый альфа-тета континуум, поскольку частота разрядной активности таламических нейронов меняется в диапазоне от 2 до 13 Гц; центром генерации тета-ритма считается гиппокамп [3]. При различных заболеваниях повышается представленность тета-ритма в ЭЭГ, что может объясняться, в особенности при очаговом поражении головного мозга, нарушением межцентрального взаимодействия и нормального соотношения активности нейромедиаторов и сигнальных молекул [3].

При очаговом поражении головного мозга воспалительной природы (энцефалите) регистрируются и описываются различные неспецифические изменения на ЭЭГ. Так, типичной является регистрация общего замедления ритма, генерализованной медленноволновой активности, очаговых изменений в виде острых волн, а также сверхвысоких дельта-щёток “*extreme delta brush waves*” или EDB [5]. Описывается дельта-волновая активность, иногда латерализованная, так, при энцефалите Расмуссена регистрируется высокоамплитудная медленная активность в ипсилатеральном очаге полушария [6]. Иногда при энцефалите данной этиологии находят и билатеральные изменения, такие как продолженная региональная спайк-волновая активность бифронтально с единичными разрядами диффузной спайк-волновой активности и феноменом вторичной билатеральной синхронизации [7]. При герпетическом энцефалите описывается диффузная тета- и дельта-активность с очаговыми изменениями [8]. При ветряночном энцефалите регистрируется диффузная медленноволновая активность, иногда описывается периодическая активность с формированием трехфазных волн [9, 10]. Описывается периодическая активность также при энцефалите, ассоциированном с инфекционным мононуклеозом, а также при энцефалите, вызванном вирусом лихорадки Западного Нила [11, 12].

Для формирования стандартизированного заключения ЭЭГ у пациентов с энцефалопатией любого генеза используют специальную схему, описывающую фоновую активность, единичные графоэлементы и их сочетания, которые принято называть ритмичные, и периодические паттерны. Она не включает методологию количественного анализа ЭЭГ, несмотря на относительно широкое распространение этого метода [13].

Несмотря на широкий спектр изменений, описываемых на разных стадиях развития острого вирусного энцефалита, до сих пор не до конца разрешенным остается вопрос количественного, объективного анализа ЭЭГ-паттернов при этом заболевании, в особенности в педиатрической практике. Считается, что применение количественного анализа ЭЭГ у детей с вирусным энцефалитом может быть ценным дополнительным инструментом к визуальному анализу [14]. В этой связи нами было проведено исследование ЭЭГ-изменений у детей в остром периоде вирусного энцефалита с количественным математическим анализом полученных данных.

Цель настоящей работы – оценить состояние биоэлектрической активности головного мозга у детей в остром периоде вирусного энцефалита с количественным математическим анализом полученных изменений.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Всего было обследовано 26 детей, доставленных в Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства России с клинически установленным диагнозом “вирусный энцефалит” после его лабораторного подтверждения. Преобладали мальчики в соотношении 18 : 8. Средний возраст группы – 12 ± 2.1 года.

Все пациенты находились в остром периоде (первые 14 сут) вирусного энцефалита. Среди вирусных энцефалитов преобладали заболевания, вызванные герпесвирусами (n = 12), в т.ч. по 4 больных с энцефалитами ВПГ 1/2 и ВГЧ-6 типа и по одному ребенку с энцефалитами ВЭБ и ВВО этиологии. У 6 детей верифицирован энтеровирусный энцефалит; у 1 – парвовирусный энцефалит; еще у 6 этиология осталась неуточненный.

У 21 пациента (85%) состояние манифестировало судорожными приступами в первые 3 суток заболевания, у оставшихся на 4-й и 7-й день болезни. По семиотике приступов превалировали фокальные пароксизмы – 18 детей (77%), из них у большинства (n = 14) с вторичной генерализацией. У 8 детей отчетливый фокальный компонент выявлен не был. У всех детей отмечались от 2 до 4 судорожных приступов в первые 3 суток заболевания с дальнейшей ремиссией на фоне подбора антиконвульсантной терапии. Смертельных исходов не было. В исходе заболевания у 12 пациентов сформировалась выраженная резидуальная неврологическая симптоматика в виде спастических парезов, когнитивных нарушений и отставания в психомоторном развитии.

Всем пациентам проводилось нейровизуализационное обследование на предмет верификации заболевания с помощью инструментальных методов обследования. Структурная и мультипараметрическая магнитно-резонансная томография (МРТ) проводилась в острый период заболевания на аппарате Philips Ingénue, 1.5 Т. Изменения носили типичный характер для острого вирусного энцефалита, в ряде случаев (80%) с многоочаговым поражением, в 20% случаев – одноочаговым (рис. 1).

В качестве группы сравнения был проведен анализ ЭЭГ 10 здоровых детей. Группы были однородны по полу и возрасту. Всем пациентам регистрировали ЭЭГ энцефалографом Нейрон Спектр 5 (Россия, Иваново). Электроды располагали на коже голов в соответствии с международной системой расположения электродов “10–20”. В случае использования медикаментозной седации, ее прекращали за 2 ч до регистрации ЭЭГ.

Для спектрального анализа частот ЭЭГ выбирали безартефактный участок записи длительностью одну минуту. В обеих группах оценивали спектральную мощность в диапазонах альфа-, тета- и дельта-частот, а также отношения спектральной мощности альфа-/тета- и альфа-/дельта-диапазонов.

Статистическую обработку данных проводили с использованием прикладных программ Excel, Statistica 10. Нормальность распределения определяли с помощью критериев Шапиро–Уилка, асимметрии и эксцесса, Колмогорова–Смирнова. Для оценки значимости разницы между двумя независимыми выборками для нормально распределенных количественных признаков использовался параметрический t-критерий Стьюдента, для ненормально распределенных – непараметрический критерий Манна–Уитни, уровень значимости p = 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При визуальном анализе ЭЭГ в 100% случаев у детей в остром периоде вирусного энцефалита регистрировалось диффузное замедление с регистрацией дельта- и тета-волн. Очаговые изменения в виде острых волн регистрировались в 85% случаев (21 пациент). Периодической активности в обследованной группе пациентов ни в одном случае зарегистрировано не было.

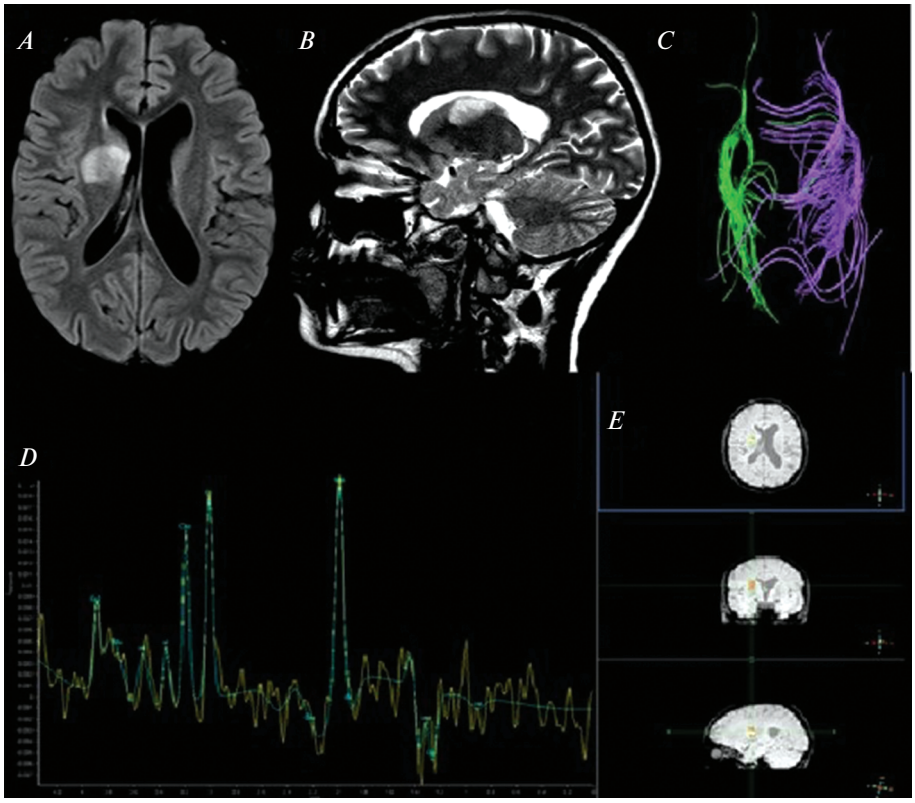


Рис. 1. Изменения на МРТ головного мозга у пациента 8 лет, острый период вирусного энцефалита парвовирусной этиологии. Крупное одноочаговое поражение головного мозга, гиперинтенсивное в FLAIR (*A*) и Т-2 режимах (*B*), изменения по данным МР-трактографии (*C*), МР-спектроскопии (*D*, *E*).
Fig. 1. Changes of brain MRI in the patient of 8 years with an acute period of viral encephalitis parvovirus etiology. It is revealed major single-focal lesion of the brain hyperintensive in FLAIR (*A*) and T-2 modes (*B*), abnormalities according to MR-tractography (*C*), MR-spectroscopy (*D*, *E*).

При количественном анализе ЭЭГ в группе больных с энцефалитами медиана мощности спектра альфа-частот составила 1.102 мкВ^2, тета-спектра – 4.252 мкВ^2, дельта – 65.702 мкВ^2. Отношения спектров в группе заболевших составили для альфа/дельта – 0.037, альфа/тета – 0.3. В контрольной группе – медиана мощности спектра альфа-частот – 2.407, тета-спектра – 7.644, дельта-спектра – 48.107. Отношения спектров в контрольной группе составили для альфа/дельта – 0.1335, альфа/тета – 0.405.

По результатам статистической обработки выявлена статистически значимое снижение соотношения альфа/тета ($p = 0.035$), максимальной альфа ($p = 0.046$) и минимальной тета ($p = 0.044$) у пациентов с энцефалитами в сравнении с группой здоровых детей.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные нами данные по изменениям ЭЭГ, выявляемым при визуальном анализе ЭЭГ, соотносятся со сведениями других исследователей. Так, при остром

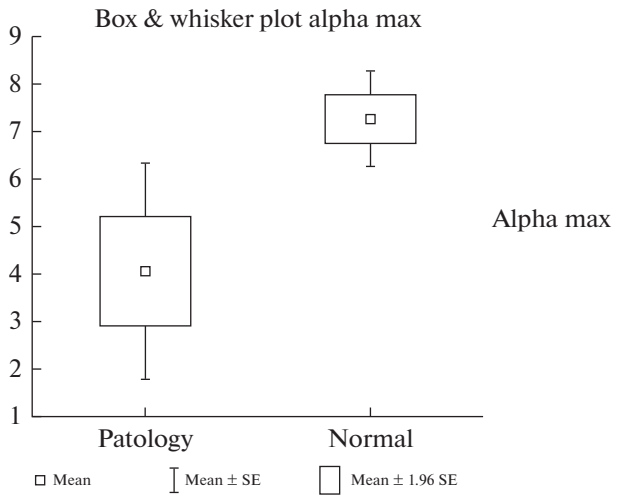


Рис. 2. Данные статистического анализа соотношения максимальной альфа-активности у пациентов в остром периоде вирусного энцефалита и детей группы сравнения.
Fig. 2. Statistical data of the ratio of maximum alpha activity in patients in the acute period of viral encephalitis and children in the comparison group.

вирусном энцефалите, обусловленном вирусом гриппа H1N1, у детей раннего возраста диффузное замедление регистрировалось в 58% случаев, а очаговая активность в 14% [15]. Другими авторами на больших выборках пациентов с вирусными энцефалитами сообщается о выявлении патологических изменений на ЭЭГ (замедления и очаговой активности) в 80 и 100% случаев [16, 17]. При герпесвирусном энцефалите вышеописанные изменения могут регистрироваться в 86% случаев [18]. При энцефалите, обусловленном вирусом краснухи, а также при энтеровирусном и клещевом энцефалитах сообщается о 100% регистрации патологически измененной ЭЭГ [19–22]. Все эти данные демонстрируют большой разброс частоты получаемых изменений, невысокую их специфичность и позволяют предполагать, что количественный анализ биоэлектрической активности при остром энцефалите может дать дополнительные достоверные сведения.

При проведении количественного анализа биоэлектрической активности у детей с вирусными энцефалитами в остром периоде нами выявлено достоверное снижение мощности альфа-и тета-ритмов ЭЭГ у детей в остром периоде вирусного энцефалита. Мощность в данном случае отражает степень возбуждения и способности к генерации определенного ритма мозговыми структурами. Учитывая, что источником генерации и альфа- и тета-ритмов является таламус [3], можно предположить, что в остром периоде нейроинфекций происходит временное угнетение его активности, а также активности нейронов ретикулярной формации головного мозга; данное преходящее ухудшение нейрофизиологических параметров наблюдалось нами ранее при остром бактериальном гнойном менингите по данным акустических стволовых вызванных потенциалов, остром вирусном энцефалите по данным зрительных вызванных потенциалов и при серозных менингитах – по данным диагностической транскраниальной магнитной стимуляциии [23].

ВЫВОДЫ

1. У пациентов детского возраста в остром периоде вирусного энцефалита регистрируется достоверное нарушение нормального соотношения мощности альфа- и тета-ритмов на ЭЭГ.

2. Это нарушение проявляется снижением мощности альфа- и тета-ритма.

3. Можно предполагать, что причиной данного снижения является угнетение функциональной активности таламуса и таламо-кортикальных путей, а также ретикулярной формации головного мозга.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование было выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-015-00269 и в рамках государственного задания № 075-00776-19-02.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Гнездицкий В.В., Пирадов М.А.* Нейрофизиология комы и нарушения сознания (анализ и интерпретация клинических наблюдений). Иваново. ПресСто. 2015. *[Gnezditsky V.V., Piradov M.A.* Neurophysiology of coma and impaired consciousness (analysis and interpretation of clinical observations). Ivanovo. PresSto. 2015. (In Russ)].
2. *Herman S.T., Abend N.S., Bleck T.P., Chapman K.E., Drislane F.W., Emerson R.G., Gerard E.E., Hahn C.D., Husain A.M., Kaplan P.W., LaRoche S.M., Nuwer M.R., Quigg M., Riviello J.J., Schmitt S.E., Simmons L.A., Tsuchida T.N., Hirsch L.J.* Consensus statement on continuous EEG in critically ill adults and children, part I: indications. J. Clin. Neurophysiol. 32(2):87-95. 2015.
https://doi.org/10.1097/WNP.0000000000000166
3. *Александров М.В., Чухловин А.А., Павловская М.Е., Костенко И.А., Архипова Н.Б.* Альфа-тета континуум: нейрофизиологические механизмы генерации. Мед. алфавит. 1(14): 46–50. 2017. *[Aleksandrov M.V., Chukhlovin A.A., Pavlovskaya M.Ye Kostenko I.A., Arkhipova N.B.* Alpha-theta continuum: neurophysiological mechanisms of generation. Med. Alfavit. 1(14): 46–50. 2017. (In Russ)].
4. *Andersen P., Andersson S.A.* Physiological basis of the alpha rhythm. New York. Century Crofts. 1968.
5. *Li H., Wang X.H., Fang F., Ding C.H., Lyu J.L., Chen C.H., Han T.L., Wu Y., Zhang W.H., Li J.W., Wang H.M., Yang X.Y., Zhang S., Deng J., Gong S., Sun X., Dai L.F.* Clinical and electroencephalographic analysis of anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis in children. Zhonghua Er Ke Za Zhi. 54(7): 510–514. 2016.
6. *Bahi-Buisson N., Nabbout R., Plouin P. Bulteau C., Delalande O., Pannier Hertz L.,Dulac O., Chiron C.* Avancees actuelles sur les concepts pathogeniques et therapeutiques de l'encephalite de Rasmussen. Rev. Neurol. (Paris). 161(4): 395–405. 2005.
7. *Котов А.С., Рудакова И.Г., Мухин К.Ю, Миронов М.Б., Кваскова Н.Е., Алиханов А.А.* Энцефалит Кожевникова–Расмуссена. Описание двух клинических случаев. Русск. журн. детской неврол. 4(2): 42–50. 2009. [Kotov A.S., Rudakova I.G., Mukhin K.YU., Mironov M.B., Kvaskova N.Ye., Alikhanov A.A. Encephalitis Rasmussen. description of two clinical cases. Russ. Zhurn. Detskoy Nevrol. 4(2): 42–50. 2009. (In Russ)].
8. *Мироненко Т.В., Погорелова Г.А.* К вопросу дифференциации вирусных энцефалитов. Актуальная инфектология. 2(3): 90–92. 2014. *[Mironenko T.V., Pogorelova G.A.* To the issue of differentiation of viral encephalitis. Aktual'naya Infektologiya. 2(3): 90–92. 2014. (In Russ)].
9. *Voitenkov V.B., Skripchenko N.V., Komantsev V.N.* Varicella Encephalitis-Related EEG Modifications in Children. Neurophysiology. 45: 219. 2013.
https://doi.org/10.1007/s11062-013-9359-4
10. *Westmoreland B.F.* The EEG in cerebral inflammatory processes. In: Electroencephalography. *E. Niedermeyer, L. Da Silva* (Eds.). Baltimore. Williams & Wilkins. 302–316. 1999.
11. *Greenberg D.A., Weinkle D.J., Aminoff M.J.* Periodic EEG complexes in infectious mononucleosis encephalitis. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. 45: 648–651. 1982.
12. *Rodriguez A.J., Westmoreland B.F.* Electroencephalographic characteristics of patients infected with West Nile virus. J. Clin. Neurophysiol. 24: 386–389. 2007.

13. *Синкин М.В., Баранова Е.А., Комольцев И. Г.* Методология регистрации и описания электроэнцефалограмм у пациентов с угнетением уровня бодрствования. Мед. алфавит. Серия Соврем. функциональная диагностика. 3(29): 17–24. 2019. *[Sinkin M.V, Baranova Ye.A., Komol'tsev I.G.* Methodology for recording and describing electroencephalograms in patients with inhibition of the level of wakefulness. Med. Alfavit. 3(29): 17–24. 2019. (In Russ)].
14. *Wu Y., Chen M., Cui Y., He X., Niu J., Zhang Y., Zhou L.*Viral encephalitis in quantitative EEG. J. Integr. Neurosci. 17(3-4): 493–501. 2018. https://doi.org/10.3233/JIN-180084
15. *Li X.F., Ai B., Ye J.W., He D.M., Tan L.M., Chen M.X., Yang H.M., Zeng F.S., Yang F.X., Liu H.S., Xu Y.* Clinical analysis of seven cases of H1N1 influenza-associated encephalopathy in children. Zhonghua Er Ke Za Zhi. 57(7): 538–542. 2019.
16. *Ben Achour N., Benrhouma H., Rouissi A., Touaiti H., Kraoua I., Turki I., Gouider-Khouja N.* Epidemic of rubella encephalitis. Arch. Pediatr. 20(8): 858–862. 2013. https://doi.org/10.1016/j.arcped.2013.05.010
17. *Корнякова А.А., Ясинская Л.И., Кудин А.П.* Клинико-лабораторные особенности энцефалитов и менингоэнцефалитов энтеровирусной этиологии у детей. Мед. журн. 1(11): 53-57. 2005. [*Kornyakova A.A., Yasinskaya L.I., Kudin A.P.* Clinical and laboratory features of encephalitis and meningoencephalitis enterovirus etiology in children. Med. J. 1(11): 53–57. 2005. (In Russ)].
18. *Кузнецова Е., Исмагилов М., Хабибуллина Р.* Нейрофизиологические аспекты диагностики клещевого энцефалита. Врач. 9: 71–75. 2013. *[Kuznetsova Ye., Ismagilov M., Khabibullina R.* Neurophysiological aspects of the diagnosis of tick-borne encephalitis. Vrach. 9: 71–75. 2013. (In Russ)].
19. *Попонникова Т.В., Галиева Г.Ю., Новиков В.Э., Галаганова Л.Г.* Клещевой энцефалит у детей: особенности клиники и дифференциальной диагностики в современных условиях. Русск. журн. детской неврол. 6(2): 11–24. 2011. [*Poponnikova T.V., Galiyeva G.YU., Novikov V.E., Galaganova L.G.* Tick-borne encephalitis in children: clinical features and differential diagnosis in modern conditions. Russk. Zhurn. Detskoy Nevrol. 6(2): 11–24. 2011. (In Russ)].
20. *Lin Y., Zhang G., Wang Y., Chai J., Jiang X., Li C., Xu H.* Prognostic evaluation of child patients with infectious encephalitis through AEEG and REEG. Exp. Ther. Med. 16(6): 5243–5247. 2018. https://doi.org/10.3892/etm.2018.6882
21. *Zhang W.L., Peng C.S., Xia J., Tian L., Yang L., Kang Y, Xie W.X., Cao Y.A.* Clinical analysis in viral encephalitis patients accompanying generalized tonic clonic seizure. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi. 25(3): 217–219. 2011.
22. *Çiftçi Kavaklioğlu B., Çoban E., Şen A., Söylemezoğlu E., Aldan M.A., Atakli D., Soysal A.* Review of Viral Encephalitis Cases Seen at a Tertiary Care Center in Turkey: Focus on Herpes Simplex Type 1. Noro Psikiyatr Ars. 54(3): 209–215. 2017. https://doi.org/10.5152/npa.2016.12540
23. *Скрипченко Н.В., Лобзин Ю.В., Войтенков В.Б., Карев В.Е., Алексеева Л.А., Васильева Ю.П., Вильниц А.А., Климкин А.В.* Инновации в ведении нейроинфекций у детей. Детские инфекции. 16(3): 5–9. 2017. [*Skripchenko N.V., Lobzin YU.V., Voytenkov V.B., Karev V.Ye., Alekseyeva L.A., Vasil'yeva YU.P., Vil'nits A.A., Klimkin A.V.* Innovations in the management of neuroinfections in children. Detskiye Infektsii. 16(3): 5–9. 2017. (In Russ)].

Bioelectrical Activity of the Brain in Children with Acute Viral Encephalitis

V. B. Voitenkov[a, c, *], M. V. Sinkin[b], N. V. Skripchenko[a], E. V. Ekusheva[c], E. Yu. Gorelick[a], N. V. Marchenko[a], A. B. Shtekleyn[d], and M. A. Bedova[a]

[a] *Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases of the Federal Medical and Biological Agency, Saint-Petersburg, Russia*

[b] *Sklifosovsky Research Institute of Emergency Care, Moscow, Russia*

[c] *Academy of Postgraduate Education, Federal Scientific Research Center of the Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russia*

[d] *Medical faculty, RUDN University, Moscow, Russia*

**e-mail: vlad203@inbox.ru*

Aim of our study was to evaluate changes of bioelectrical activity in children with acute viral encephalitis. The study involved 26 children delivered to The Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases of the Federal Medical and Biological Agency of Russia with a clinically established diagnosis of viral encephalitis. Boys prevailed in the ratio of 18 : 8, the average age of the group was 12 ± 2.1 years. All patients were enrolled in the study in the first 14 days of acute viral encephalitis; an EEG analysis of

10 healthy children was performed as a comparison group. All patients were registered EEG with the Neuron Spectrum 5 Encephalograph (Russia, Ivanovo), then a visual and spectral analysis of the frequencies were performed. The spectral power of the α-, δ- and θ-rhythms were analyzed, as well as α/δ and α/θ ratios.Visual analysis of EEG in 100% of cases in children in the acute period of viral encephalitis recorded diffuse slowdown with the registration of delta and theta waves. Focal changes in the form of sharp waves were recorded in 85% of cases (21 patients). Periodic activity in the examined group of patients was not registered in any case. A quantitative analysis based on the results of statistical processing revealed a statistically significant decrease in the ratio of α/θ ($p = 0.035$), maximal spectral power of α ($p = 0.046$) and minimal of θ ($p = 0.044$) in children with encephalitis compared with a group of healthy children. Conclusion: In children with viral encephalitis in its acute period significant disruption of normal distribution and power of α- and θ-rhythms is seen. This disruption may be characterized as lowering of the power of both rhythms. We may suppose, that these changes are the result of the inhibition of the thalamus and reticular formation functional activity.

Keywords: children, EEG, θ-waves, encephalitis

ЦИТИРОВАТЬ:

Войтенков В.Б., Синкин М.В., Скрипченко Н.В., Екушева Е.В., Горелик Е.Ю., Марченко Н.В., Штеклейн А.В, Бедова М.А. Биоэлектрическая активность головного мозга у детей с острым вирусным энцефалитом. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(7): 890–897.

DOI: 10.31857/S0869813920070109

TO CITE THIS ARTICLE:

Voitenkov V.B., Sinkin M.V., Skripchenko N.V., Ekusheva E.V., Gorelick E.Yu., Marchenko N.V., Shtekleyn A.B., Bedova M.A. Bioelectrical Activity of the Brain in Children With Acute Viral Encephalitis. Russian Journal of Physiology. 106(7): 890–897.

DOI: 10.31857/S0869813920070109

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 7, с. 898–915

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ И ИХ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ СООТНОШЕНИЙ У ЛИЦ ЗРЕЛОГО ВОЗРАСТА КЛИМАТОГЕОГРАФИЧЕСКИ РАЗНЫХ РАЙОНОВ СЕВЕРА

© 2020 г. Ф. А. Бичкаева[1, *], Н. И. Волкова[1], Д. С. Галстян[1], А. А. Бичкаев[1], А. А. Лобанов [2]

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

[2]Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии, Москва, Россия

*****E-mail: fatima@fciarctic.ru*

Поступила в редакцию 13.03.2020 г.
После доработки 18.03.2020 г.
Принята к публикации 19.03.2020 г.

Цель исследования – изучение методом газожидкостной хроматографии состава полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) в сыворотке крови и оценка информативности их индивидуальных соотношений на примере клинически здоровых лиц зрелого возраста (22–35, 36–45 и 46–60 лет) приарктической (661 человек) и арктической (895 человек) территории Севера России. Результаты исследования показали, что несмотря на повышение в обоих регионах с 22–35 до 46–60 лет уровня ω-6 – линолевой (C18:2ω6c), арахидоновой (C20:4ω6), эйкозатриеновой (C20:3ω6) и ω-3 линоленовой (C18:3ω3), эйкозапентаеновой (C20:5ω3), докозагексаеновой (C22:6ω3) кислот в крови, установлен дефицит докозапентаеновой (C22:5ω3) и докозагексаеновой (C22:6ω3), особенно в приарктическом и избыток арахидоновой кислоты в арктическом регионе. Вместе с тем, во всех возрастных группах приарктического региона отмечен рост величины соотношения C20:4ω6/C20:5ω3 и снижение C20:5ω3/C22:5ω3, (C20:3ω6 + C20:5ω3)/C22:6ω3, относительно аналогичных возрастов арктического региона, указывающих на интенсификацию синтеза субстрата для образования эйкозаноидов провоспалительного действия. При этом в арктическом регионе статистически значимое повышение как ω-3, так и ω-6 может являться компенсаторно-приспособительной реакцией в сохранении липидного компонента клеточных мембран, направленной на снижение риска их деструкции, но повышение величины соотношения арахидоновая/эйкозатриеновая является одним из скрытых критериев риска синтеза провоспалительных эйкозаноидов. Полученные результаты демонстрируют возрастную специфику состава ПНЖК у жителей северных территорий, определяют их физиологическое состояние и отражают риски развития метаболически обусловленных заболеваний.

Ключевые слова: ω-3 и ω-6 полиненасыщенные жирные кислоты, приарктический и арктический регионы, зрелый возраст

DOI: 10.31857/S0869813920050039

Метаболически обусловленные заболевания (МОЗ) являются одной из ведущих причин нарушения здоровья и смертности в современном обществе, основой которых является изменение в липидном обмене [1, 2]. У северян это связано, в первую

очередь, с активацией энергетических затрат за счет липидных энергоносителей, что выгодно при проживании в условиях холодного климата [3]. При этом сложившаяся в последние годы модификация образа жизни, связанная с ограничением физической активности, увеличением калорийности пищевых продуктов и неуклонным ростом эмоционально-стрессовых нагрузок, провоцирует адаптивные перестройки в липидном обмене, как в содержании сывороточных липидов, так и в перераспределении состава жирных кислот (ЖК) в липидах клеточных мембран. Все это потенцирует основные факторы риска возникновения сердечно-сосудистых заболеваний, которые являются "отрицательным достоянием прогресса", а именно повышение артериального давления, дислипидемии, сахарный диабет и ожирение [4–6].

Истощение в клеточном мембранном пуле физиологически важных полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) является негативным фактором дисфункции в синтезе биологически активных метаболитов – оксилипинов (эйкозаноидов: простагландинов, лейкотриенов, тромбоксанов) [7–9]. Доказано, что нарушение синтеза оксилипинов и его дисбаланс в организме является причиной хронических воспалений, артериальной гипертензии, ишемической болезни сердца, атеросклероза, сахарного диабета [10–12]. Цепочка последовательных нарушений, начиная с патологии транспортных белков ЖК, приводит к клеточному дефициту незаменимых жирных кислот и нарушению синтеза эйкозаноидов, формируя метаболический синдром. Изменение профиля ЖК в липидах мембран не только изменяет синтез оксилипинов, но и является причиной нарушения их физико-химических свойств с понижением жидкостности, рецепторной чувствительности и мембранной проницаемости [13, 14]. При этом состав эссенциальных ЖК сыворотки крови, отражающий структурные и функциональные изменения клеток и всего организма в целом, значительно зависит от характера питания [15–20].

Одной из важнейших ω-6 ЖК является арахидоновая кислота (C20: 4ω6), а из ω-3 – эйкозапентаеновая (C20: 5ω3) и докозагесаеновая кислоты (C22: 6ω3) [14, 21]. Отмечено, что высвобождение арахидоновой кислоты из фосфолипидов и последующий ее метаболизм происходят в ответ на самые различные факторы (стресс, гипоксия, катехоламины, реакцию антиген–антитело и др.). Данная кислота является основным субстратом для циклооксигеназ и липоксигеназ, быстро метаболизируется с образованием эйкозаноидов 2-й и 4-й серии, которые, изменяя содержание цАМФ и цГМФ в клетке, модулируют ее метаболизм и активность [21, 22]. Вместе с тем установлено, что избыток арахидоновой кислоты повышает синтез эйкозаноидов, что приводит к различным метаболически обусловленным заболеваниям и усилению воспалительных процессов [12, 23]. Однако достаточное количество эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот, конкурируя с арахидоновой кислотой за одни и те же ферменты, обеспечивает синтез противовоспалительных "эндогормонов" (простагландинов-3, тромбоксанов-3 и лейкотринов-5). То есть, для комфортного существования необходим определенный баланс "эндогормонов", производных эйкозапентаеновой, докозагексаеновой ω-3 и арахидоновой ω-6 кислот [12, 21, 23].

Вместе с тем у практически здоровых жителей Севера, проживающих в районах с разной степенью экстремальности, содержание ПНЖК и их соотношений остаются малоизученными, особенно у лиц зрелого возраста, хотя рядом авторов показано, что одним из критериев в адаптационно-компенсаторном механизме северян является активация липидного обмена (24, 25). В ранних исследованиях коллектива сотрудников лаборатории биологической и неорганической химии ИФПА ФИЦКИА РАН был отмечен дефицит эйкозатриеновой, арахидоновой, эйкозапентаеновой и докозагексаеновой ПНЖК у девочек 8–18 лет [26]. В другом исследовании при сравнении коренного и пришлого населения северных территорий 16–21 лет более высокие зна-

чения ПНЖК были отмечены у коренных жителей [27]. Также есть сведения, что у лиц, проживающих в Арктическом регионе, уровни ПНЖК значимо выше, чем у жителей более южных регионов России [28, 29].

Кроме того, отмечен большой интерес у исследователей к уровню ПНЖК при различных заболеваниях. Так, у лиц с атеросклеротическими повреждениями и ишемической болезнью сердца установлено снижение в крови преимущественно уровня ω-3 кислот ПНЖК – α-линоленовой, эйкозапентаеновой и докозагексаеновой [30–32]. В других исследованиях показано, что важным звеном в патогенезе хронических заболеваний бронхолегочной системы является нарушение метаболизма ПНЖК вследствие конкурентного ингибирования биосинтеза ω-3 ПНЖК (эйкозапентаеновой и докозапентаеновой) с преобладанием образования ω-6 полиеновых кислот (арахидоновой и докозатетраеновой) и эйкозаноидов с выраженными провоспалительными свойствами [33]. Новгородцева и соавт., изучая уровни ПНЖК у лиц с метаболическим синдромом, отметили дефицит полиеновых кислот в клетках, связанный с интенсивностью транспорта в крови и поглощением клетками насыщенных и ненасыщенных жирных кислот [1, 34]. Плотникова и соавт. обращают внимание на то, что чувствительность тканей к инсулину повышается с увеличением ω-3 ПНЖК, это повышает текучесть клеточных мембран и выработку простагландинов, способствующих увеличению числа инсулиновых рецепторов [35]. Таким образом, уровни ПНЖК в крови являются важными биомаркерами функционального состояния организма и в виду ограниченности сведений как по содержанию ПНЖК, так и по их соотношениям у жителей зрелого возраста экологически разных районов Севера изучение их является актуальным.

В связи с этим целью работы стало изучение состава полиненасыщенных жирных кислот и оценка информативности их индивидуальных соотношений, отражающих дисбаланс в эйкозаноидном цикле на примере клинически здоровых лиц зрелого возраста, проживающих в приарктическом и арктическом регионе Севера России.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для выполнения данной цели был использован материал 19-ти экспедиций, проведенных с 2009 по 2019 гг. в приарктическом и арктическом регионе Севера России. Обследовано 1556 практически здоровых (I и II группа здоровья) жителей северных территорий зрелого возраста 22–35, 36–45 и 46–60 лет, согласно возрастной периодизации [36]. Из них 661 человек (206 человек – 22–35 лет, 144 человека – 36–45 лет и 311 человек 46–60 лет) в приарктическом и 895 человек (259 человек – 22–35 лет, 244 человека – 36–45 лет и 392 человека – 46–60 лет) в арктическом регионах.

Арктический регион включал поселки Ненецкого автономного округа – п. Нельмин-Нос (67°59′ с.ш.), п. Несь (66°36′ с.ш.) Заполярного района; Архангельской области – д. Совполье (65°18′ с.ш), д. Сояна (65°46′ с.ш), с. Долгощелье (66°02′ с.ш.) Мезенского района; Ямало-Ненецкого автономного округа – с. Сёяха (70°10′ с.ш.) Ямальского района, г. Надым (65°32′ с.ш.), с. Ныда (66°37′ с.ш.), с. Нори (66°09′ с.ш.) Надымского района; с. Гыда (70°54′ с.ш.), с. Газ-Сале (67°22′ с.ш.), п. Тазовский (67°21′ с.ш.), с. Антипаюта (69°06′ с.ш.) Тазовского района; с. Толька (64°00′ с.ш.), с. Красноселькуп (65°42′ с.ш.) Красноселькупского района, а приарктический регион – г. Архангельск (64°54′ с.ш.), п. Пинега (64°41′ с.ш.), п. Коноша (60°58′ с.ш.), с. Рикасиха (64°32′ с.ш.) Архангельской области. Чтобы исключить влияние сезонных факторов и фотопериода исследование проводилось в весенний период (март–апрель), то есть в период увеличения светового дня, когда в организме северян происходят наиболее существенные перестройки метаболических процессов [37, 38].

В ходе исследования осуществляли забор крови в вакутайнеры из локтевой вены утром натощак с 8:00 до 10:00 ч, кровь центрифугировали, отбирали сыворотку, фасовали в эппендорфы, замораживали в жидком азоте и сохраняли ее до начала анализов. Одновременно проводилось анкетирование и физикальный осмотр врачами. При анкетировании все испытуемые заполняли стандартную анкету, которая содержала вопросы о возрасте, национальности пациента и их родителей, перенесенных заболеваниях, вредных привычках, питании, антропометрических параметрах и др.

В процессе физикального осмотра врач проводил беседу, измерял артериальное давление и на его основании, а также анамнестических и анкетных данных делал заключение о состоянии здоровья участников исследования.

В арктическом регионе в исследование были включены коренные жители, перешедшие с "кочевого" образа жизни на "оседлый", живущие в поселке вместе с европеоидным (местное русское) населением, в том числе в межэтнических браках и изменившие не только социально-бытовую среду, но и характер питания, который стал ближе к местному русскому населению с бóльшим потреблением быстрых углеводов и транс-жиров [18–20]. Это явилось причиной незначимых различий в уровне, изучаемых нами показателей, и позволило объединить их в одну группу сравнения с местными русскими [39].

Критерии исключения – сердечно сосудистые заболевания и их осложнения, сахарный диабет, заболевания щитовидной железы, острые патологические состояния и обострение хронических болезней, а также коренные жители, ведущие "кочевой" образ жизни. Исследование одобрено этическим комитетом и выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации 1964 г. с изменениями и дополнениями 2013 г. Все обследованные подписали форму добровольного информированного согласия на участие в исследовании, одобренное Комиссией по биомедицинской этике при Институте физиологии природных адаптаций ФИЦКИА РАН.

Количественное определение состава полиненасыщенных жирных кислот в сыворотке крови проводили в лаборатории биологической и неорганической химии ИФПА ФИЦКИА РАН г. Архангельска. Методом газожидкостной хроматографии на хроматографе Agilent 7890A с пламенно-ионизационным детектором на капиллярных колонках ВРХ-90 SGE (60 м–0.25 мм–0.25 мкм) после предварительной экстракции липидов и последующим получением метиловых эфиров ЖК определяли содержание ω-3 α-линоленовой (C18:3ω3), эйкозапентаеновой (C20:5ω3), докозагексаеновой (C22:6ω3), эйкозатриеновой (C20:3ω6), докозапентаеновой (C22:5ω3), ω-6 линолевой (C18:2ω6c), арахидоновой (C20:4n6), докозатетраеновой (C22:4ω6) кислот. Экстрагирование липидов и метилирование ЖК в сыворотке крови проводили методом Бичкаевой и др. [40]. Идентификацию ЖК осуществляли с использованием стандарта Nu-Chek Prep Ins 569 B (США), а количественный расчет ЖК проводили методом внутреннего стандарта C19:0 (нонадекановая кислота) в программе AgilentChemStationB.03.01 (США).

Рассчитывали величины соотношений индивидуальных ЖК: C20:4ω6/C22:6ω3, C20:4ω6/C20:5ω3, C20:4ω6/C20:3ω6, C20:4ω6/C22:4ω6, C20:5ω3/C22:5ω3, C22:6ω3/C22:5ω3, C18:2ω6c/C20:4ω6, (C20:3ω6 + C20:5ω3)/C22:6ω3.

Статистическую обработку данных, определение границ нормального распределения показателей проводили с использованием программы SPSS 15.0. Критический уровень значимости $p \leq 0.05$. Для подавляющего большинства показателей в группах была выявлена ассиметрия рядов распределения, поэтому использованы методы непараметрической статистики. Выполнен дискриптивный анализ, определены медиана, значения 25-го и 75-го перцентилей Me (25, 75%), для сравнения медиан в группах использовали U-критерий Манна–Уитни [41].

Таблица 1. Средние Me (25; 75) значения омега-3 и омега-6 полиненасыщенных жирных кислот в крови у клинических здоровых жителей зрелого возраста Приарктического (ПР) и Арктического (АР) регионов Севера России

Table 1. Mean Me (25; 75) values of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids in the blood in clinically healthy residents of the mature age of the Subarctic (SR) and Arctic (AR) regions of the North of Russia

Кислота, мкг/мл норма Acid, μkg /ml norm		Возрастные группы Age groups			Уровни значимости Significance levels	
	регион region	22–35 (1)	36–45 (2)	46–60 (3)	*P* между возрастами between ages	*P* между аналогичными возрастными группами ПР и АР between similar age groups of SR and AR
		Me (25; 75)	Me (25; 75)	Me (25; 75)		
n (человек) *n* (people)	ПР SR	206	144	311		
	АР AR	259	244	392		
Линолевая кислота Linoleic acid (C18:2ω6c) 371.97–1041.0	ПР SR	642.57 (453.50; 806.69)	672.44 (444.74; 936.78)	766.21 (555.11; 960.72)	1–2 = 0.428 **1–3 < 0.001** **2–3 = 0.013**	1–1 = 0.777 2–2 = 0.577 **3–3 = 0.002**
	АР	643.42 (470.27; 824.40)	692.98 (521.90; 887.67)	686.68 (524.69; 858.42)	**1–2 = 0.031** **1–3 = 0.010** 2–3 = 0.976	
Арахидоновая кислота Arachidonic acid (C20:4ω6) 26.33–139.53	ПР SR	59.07 (27.71; 104.01)	62.93 (35.44; 110.90)	78.46 (32.83; 123.58)	1–2 = 0.241 **1–3 = 0.005** 2–3 = 0.182	**1–1 = 0.002** **2–2 < 0.001** **3–3 < 0.001**
	АР AR	81.56 (41.48; 118.24)	96.22 (56.56; 139.47)	91.26 (58.95; 141.26)	**1–2 = 0.001** **1–3 < 0.001** 2–3 = 0.880	
Цис-7,1013,16-Докозатетраеновая кислота Cis-7,1013,16-Docosatetraenoic acid (C22:4ω6) 1.09–6.15	ПР SR	1.94 (1.35; 2.95)	1.32 (1.02; 2.11)	1.56 (1.06; 2.27)	*1–2 = 0.066* 1–3 = 0.203 2–3 = 0.461	**1–1 = 0.012** **2–2 < 0.001** **3–3 < 0.001**
	АР AR	3.15 (1.77; 5.41)	3.52 (1.95; 5.01)	3.19 (2.08; 5.01)	1–2 = 0.866 1–3 = 0.947 2–3 = 0.651	
Линоленовая кислота Linolenic acid (C18:3ω3) 1.51–9.57	ПР SR	3.54 (1.86; 5.72)	4.26 (2.50; 6.36)	4.68 (3.08; 6.92)	**1–2 = 0.011** **1–3 < 0.001** *2–3 = 0.084*	**1–1 < 0.001** **2–2 = 0.001** 3–3 < **0.001**
	АР AR	4.64 (2.98; 6.62)	5.38 (3.53; 7.17)	5.80 (4.06; 8.72)	**1–2 = 0.009** **1–3 < 0.001** **2–3 = 0.014**	
Эйкозапентаеновая кислота Eicosapentaenoic acid (C20:5ω3) 3.36–71.38	ПР SR	7.11 (3.26; 12.31)	8.91 (3.97; 16.11)	9.98 (4.67; 19.39)	**1–2 = 0.019** **1–3 < 0.001** 2–3 = 0.224	**1–1 < 0.001** **2–2 < 0.001** **3–3 < 0.001**
	АР AR	13.80 (6.48; 27.12)	20.24 (10.69; 38.42)	23.07 (10.4; 45.99)	**1–2 < 0.001** **1–3 < 0.001** 2–3 = 0.350	
Докозагексаеновая кислота Docosahexaenoic acid (C22:6ω3) 8.84–138.9	ПР SR	20.56 (9.39; 50.81)	27.38 (12.33; 59.93)	37.01 (12.49; 71.57)	*1–2 = 0.095* **1–3 < 0.001** 2–3 = 0.122	**1–1 = 0.048** **2–2 < 0.001** **3–3 < 0.001**
	АР AR	29.30 (13.89; 53.05)	44.23 (22.10; 74.75)	45.64 (21.11; 85.08)	**1–2< 0.001** **1–3< 0.001** 2–3 = 0.247	

Таблица 1. Окончание

Кислота, мкг/мл норма Acid, μkg /ml norm		Возрастные группы Age groups			Уровни значимости Significance levels	
	регион region	22–35 (1)	36–45 (2)	46–60 (3)	*P* между возрастами between ages	*P* между аналогичными возрастными группами ПР и АР between similar age groups of SR and AR
		Me (25; 75)	Me (25; 75)	Me (25; 75)		
n (человек) *n* (people)	ПР SR	206	144	311		
	АР AR	259	244	392		
Цис-8,11,14-Эйкозатриеновая кислота Cis-8,11,14-Eicosatrienic acid (C20:3ω6) 3.72–44.32	ПР SR	15.04 (6.01; 24.23)	15.74 (7.92; 27.72)	19.45 (7.62; 32.11)	1–2 = 0.126 **1–3 = 0.001** 2–3 = 0.166	1–1 = 0.245 *2–2 = 0.075* 3–3 = 0.258
	АР AR	15.13 (7.89; 25.79)	19.31 (10.61; 30.21)	20.52 (11.03; 31.08)	**1–2 = 0.009** **1–3 < 0.001** 2–3 = 0.409	
Докозапентаеновая кислота Docosapentaenoic acid (C22:5ω3) 3.23–19.93	ПР SR	4.03 (2.11; 6.56)	3.15 (2.42; 5.78)	3.34 (2.31; 4.85)	1–2 = 0.505 1–3 = 0.407 2–3 = 0.809	**1–1 < 0.001** **2–2 < 0.001** **3–3 < 0.001**
	АР AR	8.26 (5.16; 13.46)	8.64 (5.05; 14.61)	9.43 (6.02; 13.37)	1–2 = 0.522 1–3 = 0.120 2–3 = 0.563	

Жирным шрифтом выделены статистически значимые различия ($p \le 0.05$), курсивом выделены тенденциальные различия ($0.05 < p \le 0.1$).
Statistically significant differences are highlighted in bold ($p \le 0.05$), and potential differences are highlighted in italics ($0.05 < p \le 0.1$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Содержание в сыворотке крови рассматриваемых нами ПНЖК у лиц зрелого возраста приарктического и арктического регионов представлено в табл. 1.

Сравнение медианных значений (Me) линолевой кислоты, являющейся субстратом для образования остальных ω-6 ЖК, показало, что в обоих регионах ее концентрация с возрастом увеличилась, но в приарктическом регионе у 46–60-летних, относительно 22–35 и 36–45-летних ($p < 0.001$, $p = 0.013$), в арктическом у 36–45- и 46–60-летних относительно 22–35-летних ($p = 0.031$, $p = 0.010$), а также у 46–60-летних приарктического региона была выше аналогичного возраста в арктическом ($p = 0.002$). Причем, повышение уровня в крови с возрастом сопровождалось снижением процента лиц с ее дефицитом от 11.2 до 6.1%, $p = 0.038$ в приарктическом и от 12.0 до 4.8%, $p = 0.001$ в арктическом регионах и повышением с избытком от 10.2 до 22.2%, $p < 0.001$ в приарктическом и от 9.7 до 10.5%, $p = 0.74$ в арктическом регионе (табл. 1, рис. 1).

Содержание арахидоновой кислоты – главного субстрата синтеза провоспалительных эйкозаноидов с возрастом повышалась и в арктическом у 36–45- и 46–60-летних ($p = 0.001$, $p < 0{,}001$), а в приарктическом регионе у 46–60-летних ($p = 0.005$) ее уровень был выше 22–35-летних. Более того, у 22–35- ($p = 0.002$), 36–45- ($p < 0.001$) и 46-60-летних ($p < 0.001$) арктического региона ее уровень в 1.4, 1.5 и 1.2 раза был выше. Процент лиц с отклонениями C20:4ω6 от нормы у 22–35-, 36–45-летних жителей приарктического региона был больше смещен в сторону ниже, чем выше

нормативных значений (с 21.4 и 9.7%, $p = 0.011$; 13.9 и 12.5%, $p = 0.72$), у 22–35-летних жителей арктического региона в равной степени в сторону ниже и выше нормы (15.5 и 15.9%, $p = 0.86$), а у 46–60-летних обитателей приарктического региона (16.2 и 19.5%, $p = 0.28$) и 36–45- (9.1 и 25.1%; $p < 0.001$), 46-60-летних арктической зоны (7.9 и 25.8%, $p = 0.001$) больше в сторону выше нормативных значений (табл. 1, рис. 1)

Уровень эйкозатриеновой кислоты изменялся аналогично арахидоновой – повышение С20:3ω6 относительно 22–35-летних, но в приарктическом регионе у 46–60-летних ($p = 0.001$), а в арктическом у 36–45- и 46–60-летних ($p = 0.009$, $p < 0.001$), и в отличие от С20:4ω6 без региональных различий ($p = 0.245$, $p = 0.075$, $p = 0.258$).

Вместе с тем во всех возрастных группах жителей арктического региона, относительно приарктического, содержание докозатетраеновой кислоты было выше ($p = 0.012$, $p < 0.001$, $p < 0.001$), что совместно с высокими уровнями арахидоновой кислоты, является неблагоприятным фактором усиления синтеза провоспалительных эйкозаноидов (табл. 1).

В обоих регионах у жителей 36–45 и 46–60 лет установлено повышение относительно 22–35-летних, основного антагониста арахидоновой и докозатетраеновой кислот, эйкозапентаеновой кислоты (в приарктическом регионе – $p = 0.019$, $p < 0.001$; в арктическом – $p < 0.001$, $p < 0.001$), но у жителей приарктического региона ее содержание во всех возрастных группах было ниже аналогичных возрастов арктического региона ($p < 0.001$, $p < 0.001$). Кроме того, с возрастом у лиц приарктического региона установлено снижение процента лиц с ее недостатком от 23.2 до 15.6%, $p = 0.031$ (против от 11.2 до 9.5%, $p = 0.48$ в арктическом), а в арктическом, наоборот, повышение с избытком от 5.0 до 12.3% $p = 0.002$ (против от 1.5 до 2.9%, $p = 0.30$ в приарктическом) (табл. 1, рис. 1).

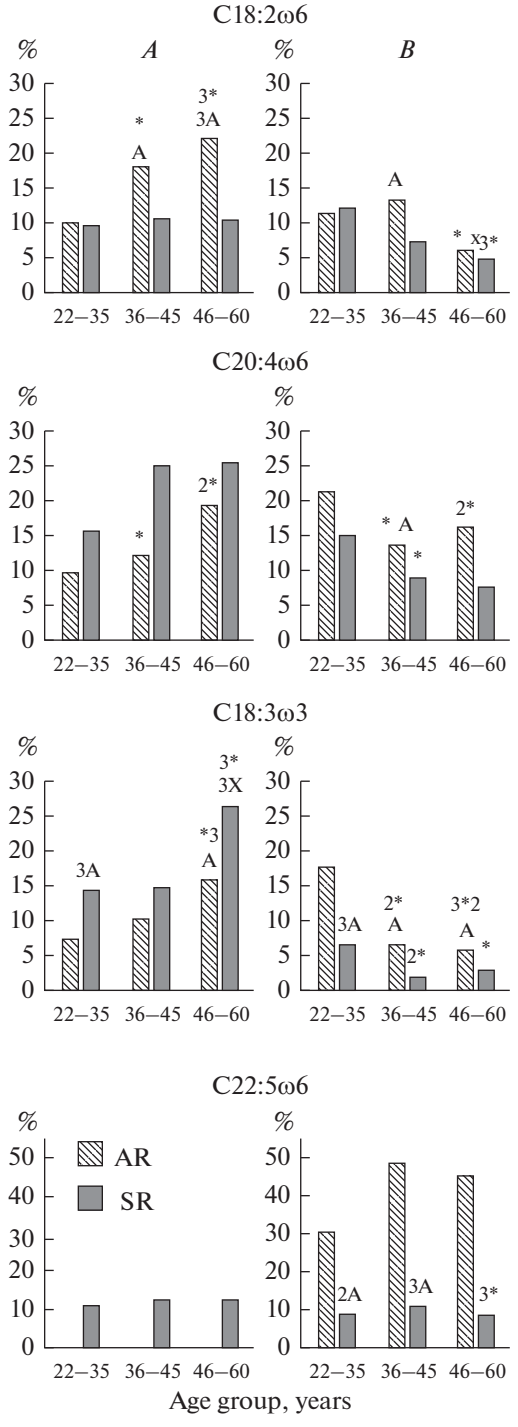
Снижение уровня эйкозапентаеновой кислоты в крови явилось причиной недостатка ее метаболита докозапентаеновой кислоты, особенно у жителей приарктического региона, где относительное ее содержание было в 2.0, 2.7 и 2.8 раза ниже, чем в аналогичных возрастных группах арктического ($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$).

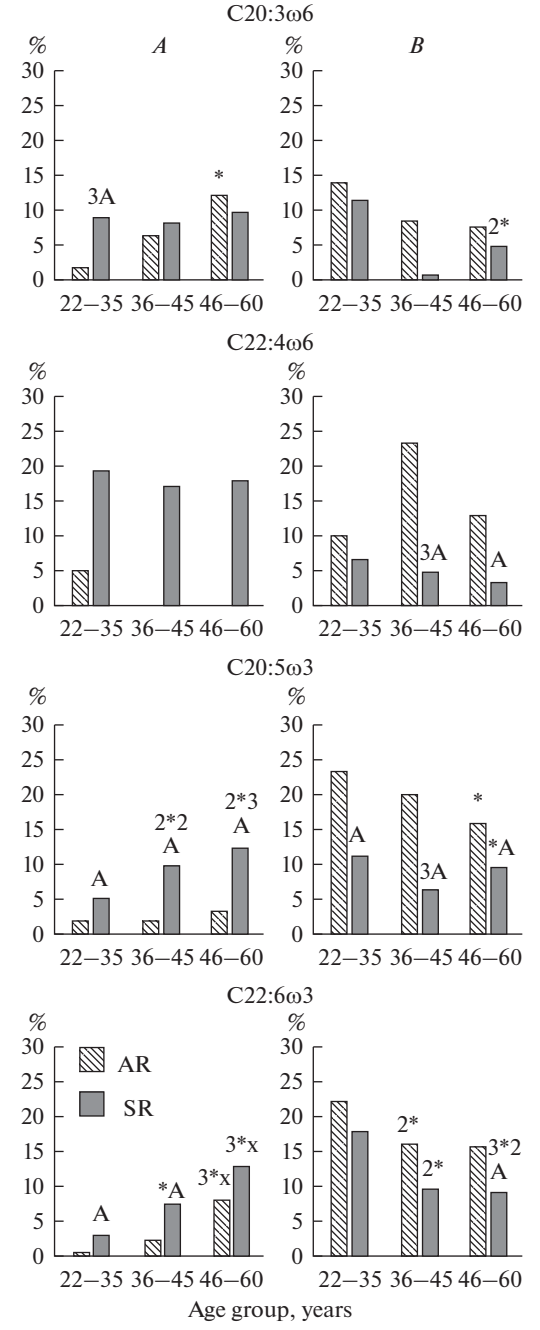
В отношении докозагексаеновой кислоты установлена подобная эйкозапентаеновой кислоте динамика, то есть у 46–60-летних ($p < 0.001$, $p < 0.001$) лиц обоих регионов, а в арктическом также у 36–45-летних ($p < 0.001$) ее содержание было выше 22–35-летних. При этом уровень докозагексаеновой кислоты, подобно эйкозапентаеновой, был выше в аналогичных возрастных группах арктического региона ($p = 0.048$, $p < 0.001$, $p < 0.001$) (табл. 1). С возрастом в обоих регионах установлено снижение процента лиц с ее недостатком от 22.3 до 15.8%, $p = 0.062$ в приарктическом, от 18.1 до 9.2%, $p = 0.001$ в арктическом и увеличение с избытком от 0.5 до 8.1%, $p < 0.001$ в приарктическом, от 3.1 до 13.0%, $p < 0.001$ в арктическом. То есть, в приарктическом регионе процент лиц с ее дефицитом был больше, а с избытком, наоборот, меньше. Вместе с тем, дефицит докозагексаеновой кислоты у жителей обоих регионов повышает вероятность синтеза провоспалительных эйкозаноидов, но особенно в приарктическом регионе.

Содержание незаменимой α-линоленовой кислоты, являющейся предшественником эйкозатриеновой, эйкозапентаеновой и докозагексаеновой ω-3 кислот, повышалось у 36–45- и 46–60-летних людей обоих регионов относительно 22–35-

Рис. 1. Распределение частоты отклонений уровня полиненасыщенных жирных кислот от нормативных значений у практически здоровых жителей зрелого возраста приарктического и арктического регионов Севера России: *А* – выше нормативных значений, *В* – ниже нормативных значений.

Fig. 1. Distribution of the frequency of deviations of the level of polyunsaturated fatty acids from the normative values in practically healthy residents of the mature age of the Subarctic regions (SR) and the Arctic (AR) regions of the North of Russia: *A* – above the normative values, *B* – below the normative values.


C18:2ω6
%
A
B
30
25
20
15
10
5
0
*
A
3*
3A
A
*
x3*
22–35
36–45
46–60
C20:4ω6
2*
*
* A
*
2*
C18:3ω3
3A
*3
A
3*
3X
3A
2*
A
2*
3*2
A
*
C22:5ω6
AR
SR
50
40
2A
3A
3*
Age group, years



AR; SR; statistical significance of differences relative to:
* – 22–35 years; x – 36–45 years; about – 46–60 years;
A – between regions; 1 – $p < 0.05$; 2 – $p < 0.01$; 3 – $p < 0.001$

Рис. 1. Окончание

летних (в приарктическом – $p = 0.011$, $p < 0.001$; в арктическом – $p = 0.009$, $p < 0.001$). При этом 22–35-летних пределы ее колебаний были разнонаправленными, в приарктическом смещены преимущественно в сторону ниже нормативных значений (17.5% против 6.6%, $p < 0.001$), в арктическом, наоборот, выше нормативных (7.3% против 14.3%, $p = 0.017$). У 36–45- и 46-60-летних жителей обоих регионов ее содержание было смещено лишь в сторону выше нормативных значений, но процент лиц с ее избытком в приарктическом был меньше, чем в арктическом (10.4 и 15.8% против 14.8 и 26.4%, $p = 0.123$, $p = 0.001$) (табл. 1, рис. 1).

Учитывая, что одной из главных причин изменения состава ЖК является изменение активности ферментов их метаболизма, нами были проанализированы некоторые показатели превращений ЖК: величина соотношения C20:4ω6/C20:3ω6 косвенно отражала активность Δ5-десатураз; C22:6ω3/C22:5ω3 – показатель активности ферментов последнего этапа биосинтеза ЖК; C20:4ω6/C22:4ω6 и C20:5ω3/C22:5ω3 – показатель активности элонгаз. Величина C20:4ω6/C22:6ω3 и (C20:3ω6 + C20:5ω3)/C22:6ω3 отражали состояние метаболизма в эйкозаноидном цикле, а значение C20:4ω6/C20:5ω3 позволяло оценить участие в эйкозаноидном цикле предшественников различных семейств. Информативная значимость представленных критериев была доказана для больных сердечно сосудистой патологией [1, 4, 6], но при этом нет данных по клинически здоровым лицам.

Анализ полученных нами значений не выявил значимых изменений величины 20:4ω6/20:3ω6 у лиц обоих регионов с повышением возраста, но при сравнении аналогичных возрастных групп величина данного соотношения у лиц арктического региона была выше ($p = 0.014$, $p = 0.001$, $p = 0.009$). Это косвенно указывает на повышение активности Δ5-десатураз, катализирующих реакции синтеза субстрата для эйкозаноидов 2-й и 4-й серии (табл. 2).

Вместе с тем в обоих регионах установлено снижение с возрастом относительно 22–35-летних величины 20:4ω6/20:5ω3, более значимое во всех возрастных группах арктического региона ($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$). При этом у лиц 36–45 лет приарктического региона значение C20:4ω6/C22:4ω6 было выше 46–60-летних ($p = 0.044$), а значимых возрастных изменений C20:5ω3/C22:5ω3 у них не установлено ($p = 0.747$, $p = 0.500$, $p = 0.726$); в арктическом регионе значения обоих соотношений C20:4ω6/C22:4ω6 и C20:5ω3/C22:5ω3 с возрастом повышались и у 46–60-летних были выше 22–35-летних ($p = 0.020$, $p = 0.031$). Сравнение аналогичных возрастных групп жителей приарктического и арктического регионов показало, что у жителей приарктического региона, с одной стороны, значимо выше величина соотношения C20:4ω6/C20:5ω3 ($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$), с другой, значимо ниже величина C20:5ω3/C22:5ω3 ($p = 0.05$, $p = 0.011$, $p < 0.001$) и (C20:3ω6 + C20:5ω3)/C22:6ω3 ($p < 0.001$, $p = 0.134$, $p = 0.005$) (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученное в нашем исследовании увеличение во всех возрастных группах уровня арахидоновой и докозатетраеновой кислот у жителей арктического региона относительно аналогичных возрастов приарктического происходило на фоне повышения основных ингибиторов и конкурентов за циклооксигеназные и липоксигеназные метаболические пути эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот. Но, несмотря на то, что условия проживания в арктическом регионе более дискомфортные по сравнению с приарктическим, с почти повсеместным распространением вечной мерзлоты, более суровыми и продолжительными зимами, более низкими температурами, напряженным ветровым режимом и резкими перепадами атмосферного давления, перечисленные выше изменения в уровне ПНЖК могут указывать на увеличение синтеза противовоспалительных эйкозаноидов, улучше-

Таблица 2. Средние Me (25; 75) значения соотношений полиненасыщенных жирных кислот в крови клинически здоровых лиц зрелого возраста приарктического (ПР) и арктического (АР) регионов Севера России
Table 2. Mean Me (25; 75) values of ratios of polyunsaturated fatty acids in the blood of clinically healthy people of mature age in the Subarctic (SR) and Arctic (AR) regions of the North of Russia

Соотношение кислот, усл. ед. The ratio of acids conv. units		Возрастные группы Age groups			Уровни значимости Significance levels	
	регионы regions	22–35 (1)	36–45 (2)	46–60 (3)	*P* между возрастами between ages	*P* между аналогичными возрастными группами ПР и АР between similar age groups of SR and AR
		Me (25; 75)	Me (25; 75)	Me (25; 75)		
n (человек) *n* (people)	ПР SR	206	144	311		
	АР AR	259	244	392		
C20:4ω6/C22:6ω3	ПР SR	2.55 (1.78; 3.86)	2.27 (1.58; 3.54)	2.19 (1.52; 3.24)	*1–2 = 0.068* **1–3 = 0.001** 2–3 = 0.286	1–1 = 0.623 2–2 = 0.519 **3–3 = 0.050**
	АР	2.63 (1.90; 3.79)	2.30 (1.67; 3.00)	2.06 (1.38; 2.96)	**1–2<0,001** **1–3<0.001** **2–3 = 0.014**	
C20:4ω6/C20:5ω3	ПР SR	8.97 (4.79; 15.40)	6.43 (3.8; 13.27)	6.80 (3.9; 13.06)	1–2 = 0.896 **1–3 = 0.006** 2–3 = 0.985	**1–1 < 0.001** **2–2 < 0.001** **3–3 < 0.001**
	АР	5.45 (2.81; 9.33)	4.05 (2.36; 7.59)	3.85 (2.25; 7.85)	**1–2 = 0.013** **1–3 = 0.001** 2–3 = 0.484	
C20:4ω6/C20:3ω6	ПР SR	4.34 (3.35; 5.93)	4.28 (3.4; 5.89)	4.22 (3.24; 5.66)	1–2 = 0.280 1–3 = 0.198 2–3 = 0.981	**1–1 = 0.014** **2–2 = 0.001** **3–3 = 0.009**
	АР	4.81 (3.52; 7.71)	5.10 (3.69; 6.98)	4.52 (3.36; 6.69)	1–2 = 0.925 *1–3 = 0.100* *2–3 = 0.073*	
C22:6ω3/C22:5ω3	ПР SR	4.82 (3.86; 7.08)	4.15 (3.00; 4.99)	4.61 (3.82; 5.23)	**1–2 = 0.050** 1–3 = 0.235 2–3 = 0.270	1–1 = 0.404 **2–2 = 0.042** 3–3 = 0.178
	АР	4.60 (3.58; 6.01)	4.78 (3.53; 6.33)	4.88 (3.66; 6.54)	1–2 = 0.468 1–3 = 0.223 2–3 = 0.697	
C20:4ω6/C22:4ω6	ПР SR	24.19 (20.68; 33.53)	27.83 (23.14; 33.72)	23.33 (18.62; 30.38)	1–2 = 0.352 1–3 = 0.354 **2–3 = 0.044**	1–1 = 0.408 2–2 = 0.259 3–3 < **0.001**
	АР	26.19 (20.30; 41.31)	28.88 (23.07; 43.00)	29.63 (22.64; 46.28)	*1–2 = 0.085* **1–3 = 0.020** 2–3 = 0.511	
C20:5ω3/C22:5ω3	ПР SR	1.99 (1.56; 2.45)	1.97 (1.24; 2.68)	1.89 (1.19; 2.41)	1–2 = 0.747 1–3 = 0.500 2–3 = 0.726	**1–1 = 0.05** **2–2 = 0.011** **3–3 < 0.001**
	АР	2.38 (1.39; 3.93)	2.70 (1.60; 4.68)	2.84 (1.65; 4.22)	1–2 = 0.104 **1–3 = 0.031** 2–3 = 0.761	

Таблица 2. Окончание

Соотношение кислот, усл. ед. The ratio of acids conv. units		Возрастные группы Age groups			Уровни значимости Significance levels	
	регионы regions	22–35 (1)	36–45 (2)	46–60 (3)	*P* между возрастами between ages	*P* между аналогичными возрастными группами ПР и АР between similar age groups of SR and AR
		Me (25; 75)	Me (25; 75)	Me (25; 75)		
n (человек) *n* (people)	ПР SR	206	144	311		
	АР AR	259	244	392		
(C20:3ω6 + + C20:5ω3)/C22:6ω3	ПР SR	0.92 (0.68; 1.43)	0.94 (0.65; 1.51)	0.83 (0.65; 1.27)	1–2 = 0.760 1–3 = 0.328 2–3 = 0.250	**1–1 < 0.001** 2–2 = 0.134 **3–3 = 0.005**
	АР	1.12 (0.87; 1.61)	1.03 (0.78; 1.43)	0.96 (0.73; 1.33)	**1–2 = 0.021** **1–3<0.001** 2–3 = 0.150	

Жирным шрифтом выделены статистически значимые различия ($p \le 0.05$), курсивом – тенденциальные различия ($0.05 < p \le 0{,}1$).
Statistically significant differences are highlighted in bold ($p \le 0.05$), italicized are the differences ($0.05 < p \le 0.1$).

ние текучести фосфолипидной жидкокристаллической структуры мембран клеток и косвенно свидетельствовать о незначительном снижении риска развития метаболически обусловленных заболеваний у лиц арктического региона.

Обращает на себя внимание то, что выявленные изменения в уровне арахидоновой кислоты именно у жителей арктического региона, более северного района с большей жесткостью погодных условий, чем в приарктическом сочетались с большей частотой встречаемости избыточных состояний линолевой кислоты. Известно, что именно линолевая кислота метаболизируется в арахидоновую, но интенсивность процессов определяется активностью ферментов элонгации и десатурации. Хотя анализ полученных нами значений 20:4n6/20:3n6 не выявил значимых изменений у лиц обоих регионов с повышением возраста, но величина данного соотношения у лиц всех возрастных групп арктического региона была выше, что косвенно указывает на повышение активности D5-десатураз, катализирующих реакции синтеза арахидоновой кислоты – субстрата для эйкозаноидов 2-й и 4-й серии. Это, по нашему мнению, связано с тем, что совокупность климатических факторов Севера, стимулирует выброс стрессовых гормонов, усиливает липолиз, а простагландины-2 эндогенно модулируют метаболизм липидов через снижение образования цАМФ, необходимого для активации липолиза [12, 21, 22].

Вместе с тем, повышение уровня C20:4ω6 (C20:4ω6/C20:5ω3 выше во всех возрастных группах приарктического, а C20:4ω6/C20:3ω6 во всех возрастных группах арктического регионов) увеличивает риск дисбаланса эйкозаноидов в сторону провоспалительного характера, что может являться причиной развития хронического воспаления, эндотелиальной дисфункции и артериальной гипертонии [12, 23] – клинико-биохимических процессов метаболического синдрома. При этом, смещение уровня C20:5ω3 у лиц обоих регионов в сторону нижней границы нормы и высокий процент лиц с ее содержанием ниже нормы, особенно у 22–35- и 36–45-летних лиц приарктического региона, способствует развитию инсулинорезистентности и, как следствие, ожирения, согласно гипотезе инсулинорезистентности в развитии мета-

болического синдрома [1, 34, 35]. Следовательно, установленные значения С20:4ω6/С20:5ω3 и С20:4ω6/С20:3ω6 у жителей северных регионов, являются значимым фактором повышенного риска развития метаболического синдрома во всех возрастных группах зрелого возраста.

Одной из причин выявленных нами изменений ЖК в крови северян с возрастом, может быть, как нарушение их активного транспорта, так и несбалансированное питание, в частности, потребление легко усваиваемых углеводов и транс-жиров, ранее нехарактерное для жителей арктического региона [15, 17–20]. Кроме того, поскольку основным субстратом перекисного окисления липидов являются ПНЖК, дефицит ω-3 и избыток ω-6, установленный у лиц обоих регионов, указывает на усиление окислительных процессов с образованием атерогенных фракций липидов [2, 3, 6].

Положительным моментом работы был анализ не только индивидуальных ПНЖК, но и оценка их соотношений с учетом возраста и региона проживания. Традиционно обеспеченность полиненасыщенными жирными кислотами сводится к их качественному и количественному определению, анализу соотношений ω-3 и ω-6 кислот между собой и их суммарного содержания (∑ω-6/∑ω-3). Однако, результаты исследований в последние годы свидетельствуют о том, что данные коэффициенты не всегда корректно отражают функциональные свойства ω-3 и ω-6 ПНЖК. При этом соотношения ПНЖК косвенно являются показателями их метаболизма – одной из реальных причин изменения состава ЖК. Так, в обоих регионах было установлено снижение с возрастом величины 20:4n6/20:5n3 и повышение 20:4n6/22:4n6, характеризующих взаимосвязь между предшественником синтеза эйкозаноидов и ингибитором их образования. При сравнении аналогичных возрастных групп обоих регионов показано, что у жителей приарктического региона, с одной стороны, значимо выше величина соотношения 20:4n6/20:5n3, с другой, значимо ниже величина 20:5n3/22:5n3 и (20:3n6 + 20:5n3)/22:6n3, что свидетельствует об изменении метаболизма ЖК.

Таким образом, у северян, особенно приарктического региона, установлены изменения в метаболизме ЖК и биосинтезе эйкозаноидов при отсутствии клинических симптомов, обусловленные угнетением активности ферментов начального и последнего этапа метаболизма эссенциальных ЖК с реципрокным подавлением синтеза циклооксигеназных и липоксигеназных метаболитов ω-3 ЖК. Следовательно, значимым фактором повышенного риска развития метаболического синдрома во всех возрастных группах зрелого возраста приарктического региона было повышение величины соотношения 20:4n6/20:5n3, а в арктическом – 20:4n6/20:3n6.

Полученные результаты свидетельствуют об изменении состава жирных кислот в сыворотке крови у клинически здоровых лиц зрелого возраста, основанной на нарушении их метаболизма, конкурентном ингибировании биосинтеза ω-3 ЖК, преобладании образования ω-6 ЖК и эйкозаноидов с выраженными провоспалительными свойствами. Можно заключить, что у жителей Арктики, особенно приарктического региона, начиная с 22–35 лет, развивается нарушение липидного обмена на клеточном уровне (в легкой степени тяжести), которое сохраняется до 46–60 лет. То есть, важным звеном метаболического синдрома является дезорганизация липидного компонента клеточных мембран.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования показали, что в обоих регионах с возрастом повышение уровня предшественника ω-6 ЖК линолевой кислоты сочеталось с увеличением содержания арахидоновой, докозатетраеновой и эйкозатриеновой кислот, а предшественника ω-3 ЖК α-линоленовой кислоты с повышением эйкозапентае-

новой, докозапентаеновой и докозагексаеновой кислот, содержание которых было выше у лиц арктического региона.

При избытке ω-6 арахидоновой кислоты в арктическом и линолевой кислоты в приарктическом в обоих регионах, несмотря на повышение уровня ω-3 эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот от 22–35 до 46–60 лет, процент лиц с их дефицитом оставался высоким, особенно в приарктическом регионе. Это свидетельствует не только о снижении у северян синтеза субстрата противовоспалительных эйкозаноидов, но и определяет содержание ЖК в липидах мембран, изменяя их свойства в сторону понижения жидкостности, рецепторной чувствительности и мембранной проницаемости, за счет избытка у жителей приарктического региона линолевой, а арктического – арахидоновой кислоты и дефиците в обоих регионах докозапентаеновой и докозагексаеновой кислот.

Во всех возрастных группах жителей приарктического региона отмечено увеличение величины C20:4ω6/C20:5ω3 и снижение C20:5ω3/C22:5ω3, (C20:3ω6 + + C20:5ω3)/C22:6ω3 относительно аналогичных возрастов арктического, что указывает на интенсификацию метаболизма ПНЖК и усиление синтеза субстрата для образования эйкозаноидов провоспалительного действия. При этом в арктическом регионе статистически значимое повышение как ω-3, так и ω-6 может являться компенсаторно-приспособительной реакцией сохранения липидного компонента клеточных мембран, направленной на снижение риска их деструкции, а повышение величины соотношения арахидоновая/эйкозазатриеновая – одним из скрытых критериев риска синтеза провоспалительных эйкозаноидов.

Полученные нами данные о содержании и соотношениях ПНЖК показывают их значимую роль в сохранении липидного компонента клеточных мембран и синтезе эйкозаноноидов у клинически здоровых лиц в условиях высоких широт. Результаты исследования следует учитывать при разработке и выборе профилактических и терапевтических мероприятий по снижению риска метаболически обусловленных заболеваний с учетом региона проживания и возраста.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в соответствии с гос. заданием НИР лаборатории “Изучение адаптивных возрастных эндокринно-метаболических перестроек у жителей арктических территорий”, № государственной регистрации АААА-А15-115122810187-7

АВТОРСТВО

Бичкаева Ф.А. внесла существенный вклад в концепцию и дизайн исследования, получение, анализ и интерпретацию данных; Волкова Н.И. внесла вклад в анализ и интерпретацию данных; Бичкаев А.А. участвовал в сборе и обработке биологического материала, анализе и интерпретации данных; Галстян Д.С. участвовал в анализе и интерпретации данных; Лобанов А.А. принимал участие в организации исследования, получении данных.

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

Бичкаева Фатима Артемовна ORCID 0000-0003-2970-4469 SPIN-код: 3562-3921

Волкова Наталья Ивановна ORCID 0000-0003-1958-028X SPIN-код: 7571-6607

Лобанов Андрей Александрович ORCID 0000-0002-6615-733XSPIN-код: 5793-4055

Галстян Давид Самвелович нет

Бичкаев Артем Альбертович ORCID – 0000-0002-6307-9399

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Новгородцева Т.П., Денисенко Ю.К., Антонюк М.В., Юбицкая Н.С., Лобанова Е.Г., Жукова Н.В.* Жирные кислоты крови в формировании и коррекции метаболического синдрома. Терапевт. архив. 8: 30–34. 2016. [*Novgorodtseva T.P., Denisenko Yu.K., Antonyuk M.V., Yubitska-*

ya N.S., Lobanova E.G., Zhukova N.V. Blood fatty acids in the development and correction of metabolic syndrome. Therap. Arch. 8: 30–34. 2016. (In Russ)].
2. *Василькова Т.Н., Матаев С.И.* Метаболический синдром в популяции коренных народов Крайнего Севера. Вестн. Южно-Уральского ГУ. Серия: Образование, здравоохранение, физическая культура. 27: 71–73. 2009. [*Vasilkova T.N., Mataev S.I.* Metabolic a syndrome in population of the radical people of the extreme North Herald. South Ural State University. Series: Education, healthcare, physical education. 27: 71–73. 2009. (In Russ)].
3. *Панин Л.Е.* Гомеостаз и проблемы приполярной медицины методологические аспекты адаптации. Бюлл. СО РАМН. 3: 6–11. 2010. [*Panin L.E.* Homeostasis and problems of circumpolar health (Methodological aspects of adaptation). Bull. SB RAMS. 3: 6–11. 2010. (In Russ)].
4. *Psota T.L., Gebauer S.K., Kris-Etherton P.* Dietary omega-3 fatty acid intake and cardiovascular risk. Am. J. Cardiol. 98: 3–18. 2006.
5. *Zhou Y.E., Kubow S., Dewailly E., Julien P., Egeland G.M.* Decreased activity of desaturase 5 in association with obesity and insulin resistance aggravates declining long-chain n-3 fatty acid status in Cree undergoing dietary transition. Br. J. Nutr. 102(6): 888–894. 2009.
6. *Драпкина О.М., Шепель Р.Н.* Омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты и возраст – ассоциированные заболевания: реалии и перспективы. Рациональная фармакология в кардиологии. 3(11): 309–316. 2015. [*Drapkina O.M., Shepel R.N.* Omega-3 fatty acids and age-related diseases: realities and prospects Racional'naya farmakologiya v kardiologii. 3(11): 309–316. 2015. (In Russ)].
7. *Stillwell W., Wassall S.R.* Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. Chem. Phys. Lipids. 126(1): 1–27. 2003.
8. *Новгородцева Т.П., Караман Ю.К., Жукова Н.В., Лобанова Е.Г., Антонюк М.В., Кантур Т.А.* Состав свободных и эстерифицированных жирных кислот крови при формировании метаболического синдрома. Бюлл. СО РАМН. 32(2): 61–66. 2012. [*Novgorodtseva T.P., Karaman Y.K., Zhukova N.V., Lobanova E.G., Antonyuk M.V. Kantur T.A.* Composition of blood free and esterified fatty acids under the forming of metabolic syndrome. Bull. SO RAMN. 32(2): 61–66. 2012. (In Russ)].
9. *Назаров П.Е., Мягкова Г.И., Гроза Н.В.* Полиненасыщенные жирные кислоты как универсальные эндогенные биорегуляторы. Вестник МИТХТ им. М.В. Ломоносова. 4(5): 3–19. 2009. [*Nazarov P.E., Miagkova G.I., Groza N.V.* Polyunsaturated fatty acids as universal endogenious bioregulators. Vestnik MITHT im. M.V. Lomonosova. 4(5): 3–19. 2009. (In Russ)].
10. *Calder P.C.* n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases Am. J. Clin. Nutr. 83(6): 1505–1519. 2006.
11. *Lorente-Cebrián S., Costa A.G.V., Navas-Carretero S., Zabala M., Laiglesia L.M., Martínez J.A., Moreno-Aliaga M.J.* An update on the role of omega-3 fatty acids on inflammatory and degenerative diseases. J. Physiol. Biochem. 71(2): 341–349. 2015.
12. *Новгородцева Т.П., Денисенко Ю.К., Антонюк М.В., Жукова Н.В.* Модификация состава жирных кислот мембраны эритроцитов при хронической обструктивной болезни легких. Бюл. СО РАМН. 33(5): 64–69. 2013. [*Novgorodtseva T.P., Denisenko Y.K., Antonyuk M.V., Zhukova N.V.* Modification of fatty acid content of cell membranes of erythrocytes at chronic obstructive pulmonary disease. Bull. SO RAMN. 33(5): 64–69. 2013. (In Russ)].
13. *Таратухин Е.О.* Атеросклероз и жирные кислоты: важная взаимосвязь и новое направление терапии. Рос. кардиол. журнал. 5: 77–80. 2011. [*Taratukhin E.O.* Atherosclerosis and fatty acids: important association and new therapeutic approach. Ross. Kardiol. Zhurn. 5: 77–80. 2011. (In Russ)].
14. *Williams J.A., Batten S.E., Harris M., Rockett B.D., Shaikh S.R., William S., Wassall S.R.* Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids segregate differently between raft and nonraft domains. Biophys. J. 103(2): 228–237. 2012.
15. *Чанчаева Е.А.* К вопросу об адекватности питания аборигенного населения Сибири. Экология человека. 3: 31–34. 2010. [*Tchantchaeva E.A.* To the issue of the adequacy of nutrition of siberian aboriginal population Literature rewiev. Ekologiya cheloveka. 3: 31–34. 2010. (In Russ)].
16. *Innis S.M.* Omega-3 fatty acid biochemistry: perspectives from human nutrition. Mil. Med. 179(11): 82–87. 2014.
17. *Лобанов А.А., Богданова Е.Н., Андронов С.В., Попов А.И., Кочкин Р.А., Кострицин В.В., Лобанова Л.П., Протасова И.В., Лобанова Е.В., Кобелькова И.В.* Исследование традиционного питания жителей Арктической зоны западной Сибири. Вопросы питания. 87(5): 31–32. 2018. [*Lobanov A.A., Bogdanova E.N., Andronov S.V., Popov A.I., Kochkin R.A., Kostricin V.V., Lobanova L.P., Protasova I.V., Lobanova E.V., Kobelkova I.V.* A study of the traditional diet of the inhabitants of the Arctic zone of Western Siberia. Voprosy pitaniya. 87(5): 31–32. 2018. (In Russ)].
18. *Никифорова Н.А., Карапетян Т.А., Доршакова Н.В.* Особенности питания жителей Севера. Экология человека. 11: 20–22. 2018. [*Nikiforova N.A., Karapetyan T.A., Dorshakova N.* Feeding habits of the northerners. Ekologiya cheloveka. 11: 20–22. 2018. (In Russ)].

19. *Иванова Г.В., Сафронова Т.Н.* Особенности питания коренного населения арктической зоны российской федерации. Рос. Арктика. 3: 60–69. 2018. [*Ivanova G.V., Safronova T.N.* Nutritional pecularities of the arctic indigenous population. Ross. Arktika. 3: 60–69. 2018. (In Russ)].
20. *Белова Н.И., Лавринов П.А., Воробьева Н.А., Зуева Т.Н., Айвазова Е.А.* Алиментарный статус коренного населения ненецкого автономного округа. Экология человека. 7: 10–14. 2013. [*Belova N., Lavrinov P., Vorobyova N., Zueva T., Ayvazova E.* Alimentary status of native population of the nenets autonomous area. Ekologiya cheloveka.7: 10–14. 2013. (In Russ)].
21. *Денисенко Ю.К., Виткина Т.И., Кондратьева Е.В., Жукова Н.В. Назаренко А.В.* Модификация состава жирных кислот мембран митохондрий тромбоцитов у больных хроническим необструктивным бронхитом. Здоровье. Медицинская экология. Наука.2(56): 59–61. 2014. [*Denisenko Yu.K., Vitkina T.I., Kondratyeva E.V., Zhukova N.V., Nazarenko A.V.* Modification of the composition of fatty acids in membranes of mitochondria of platelets in patients with chronic non-obstructive bronchitis. Zdorov'e. Medicinskaya ekologiya. Nauka. 2(56): 59–61. 2014. (In Russ)].
22. *D'Alessandro M.E., Chicco A., Lombardo Y.B.* Fish oil reverses the altered glucose transporter, phosphorylation, insulin receptor substrate-1 protein level and lipid contents in the skeletal muscle of sucrose-rich diet fed rats. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. 88(2): 171–177. 2013.
23. *Schwartz J.* Role of polyunsaturated fatty acids in lung disease. Am. J. Clin. Nutr. 71(1): 393S-396S. 2000.
24. *Панин Л.Е.* Особенности энергетического обмена. Механизмы адаптации человека в условиях высоких широт. Л. Медицина. 1980. *[Panin L.E.* Features of energy metabolism. Mechanisms of human adaptation in high latitudes. L. Medicine. 1980. (In Russ)].
25. *Бойко Е.Р.* Физиолого-биохимические основы жизнедеятельности человека на Севере. Екатеринбург. 2005. [*Boyko E.R.* Fiziologo-biohimicheskie osnovy zhiznedeyatel'nosti cheloveka na Severe. [Physiological and biochemical foundations of human life in the North]. Ekaterinburg. 2005. (In Russ)].
26. *Третьякова Т.В., Власова О.С., Волкова Н.И., Баранова Н.Ф.* Особенности фракций сывороточного холестерина и ω-3, ω-6 полиненасыщенных жирных кислот у девочек северо-восточного региона в зависимости от стадии полового развития. Вестник Уральской мед. акад. науки. 2: 159–162. 2014. [*Tretyakova T.V., Vlasova O.S., Volkova N.I., Baranova N.F.* Features of fractions of serum cholesterol and ω-3, ω-6 polyunsaturated fatty acids in girls of the north-eastern region depending on the stage of sexual development. Vestnik Ural'skoj med. akad. nauki. 2: 159–162. 2014. (In Russ)].
27. *Третьякова Т.В., Власова О.С., Баранова Н.Ф.* Сравнительный анализ параметров липидного и углеводного обмена у коренного и некоренного юношеского населения арктического региона. Вестник Уральской мед. акад. науки. 15(2): 229–238. 2018. [*Tretyakova T.V., Vlasova O.S., Baranova N.F.* Comparative Analysis of Parameters of Lipid and Carbohydrate Matabolism in Aboriginal and Non-Aboriginal Young People in the Arctic Region. Vestnik Ural'skoj med. akad. nauki. 15(2): 229–238. 2018. (In Russ.)]
28. *Бичкаева Ф.А., Кокоев Т.И., Джиоева Ц.Г., Волкова Н.И., Третьякова Т.В., Власова О.С.* Сравнительная характеристика углеводного и жирового обменов у жителей двух различных климатогеографических территорий. Вестник акад. знаний. 1: 174–181. 2013. [Comparative characteristics of carbohydrate and fat metabolism in residents of two different climatogeographic territories. Vestnik akad. znanij. 1: 174–181. 2013. (In Russ)].
29. *Galstyan D.S., Bichkaeva F.A., Vlasova O.S., Volkova N.I., Tretyakova T.V., Nesterova E.V., Shengoff B.A., Baranova N.F., Bichkaenv A.A.* Features content of essential omega 3 polyunsaturated fatty acids and glucose level in the inhabitants of the Arctic region of mature age. IOP Conference. Series:Earth and Environmental Science. Arctic Biomonitoring: International Conference. Arkhangelsk. Russian Federation. 263(1): 169–173. 2018.
30. *Lausada N.R., Boullon S., Boullon F.* Tacconi de Gomez Dumm I. N. Erythrocyte membrane, plasma and atherosclerotic plaque lipid patten in coronary disease. Medicina. (B Aires). 67(5): 451–457. 2007.
31. *Салахова Л.К., Никитина Е.В., Гусаров А.В.* Экспрессное определение жирных кислот в капиллярной крови методом газаовой хроматографии. Вестник казанск. техн. универ. 3(4): 27–32. 2007. [*Salakhova L.K., Nikitina E.V., Gusarov A.V.* Rapid determination of fatty acids in capillary blood by gas chromatography. Vestnik kazanskogo tekhn. univer. 3(4): 27–32. 2007. (In Russ)].
32. *Ткачева Н.И., Морозов С.В., Стахнева Е.М., Шрамко В.С., Рагино Ю.И.* Хроматографическое определение содержания жирных кислот в различных биологических средах при атеросклеротических повреждениях. Атеросклероз и дислипидемии. 1: 17–28. 2017. [*Tkacheva N.I., Morozov S.V., Stakhneva E.M., Shramko V.S., Ragino Yu.I.* Chromatographic determination of the content of fatty acids in different biological environments at atherosclerotic damages. Ateroskleroz i dislipidemii. 1: 17–28. 2017. (In Russ)].

33. *Денисенко Ю.К., Новгородцева Т.П., Жукова Н.В., Жукова Н.В., Лобанова Н.Г., Антонюк М.В.* Метаболические превращения полиненасыщенных жирных кислот при хронических воспалительных заболеваниях органов дыхания. Междунар. Журн. прикладных и фундаментальных исследований. 11(2): 201–206. 2015. [*Denisenko Y.K., Novgorodtseva T.P., Zhukova N.V., Lobanova E.G., Antonuk M.V.* Metabolic conversion of polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory respiratory diseases. Mezhdunar. Zhurn. prikladnyh i fundamental'nyh issledovanij. 11(2): 201–206. 2015. (In Russ)].
34. *Александров О.В., Алехина Р.М., Григорьев С.П., Ежова И.С., Золкина И.В.* Метаболический синдром. Рос. мед. журн. 6: 50–55. 2006. [*Aleksandrov O.V., Alekhina R.M., Grigor'ev S.P., Yezhova I.S., Zolkina I.V.* Metabolic syndrome. Ros. med. zhurn. 6: 50–55. 2006. (In Russ)].
35. *Плотникова Е.Ю. Синькова М.Н., Исаков Л.К.* Роль омега-3 ненасыщенных кислот в профилактике и лечении различных заболеваний. Лечащий врач. 8: 56. 2018. [*Plotnikova E.Yu., Sinkova M.N., Isakov L.K.* Role of omega-3 unsaturated acids in prevention and treatment of different diseases (part 2). Lechashchij vrach. 8: 56. 2018. (In Russ.)]
36. *Безруких М.М., Сонькин В.Д., Фарбер Д.А.* Возрастная физиология. М. Академия. 2002. [*Bezrukikh M.M., Sonkin V.D., Farber D.A.* Age physiology. (*Bezrukikh M.M., Sonkin V.D., Farber D.A.* Izdatel'skij centr. Moscow. Akademiya. 2002. (In Russ)].
37. *Красильникова В.А., Хаснулин В.И.* Сезонные изменения метаболизма коренных жителей Тывы. Экология человека. 3: 20–24. 2015. [*Krasilnikova V.A., Hasnulin V.I.* Seasonal changes in metabolism of tyva indigenous people. Ekologiya cheloveka. 3: 20–24. 2015. (In Russ)].
38. *Бичкаева Ф.А.* Резервные возможности эндокринной регуляции метаболических процессов у человека на Севере. Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Архангельск. 2006. [*Bichkaeva F.A.* Reserve capabilities of endocrine regulation of metabolic processes in humans in the North: abstract of thesis. Dr. biol. sciences. 2006. (*Bichkaeva F.A.* Reserve capabilities of endocrine regulation of metabolic processes in humans in the North: abstract of thesis. Dr. biol. sciences. Arkhangelsk. 2006. (In Russ)].
39. *Бичкаева Ф.А., Типисова Е.В., Бичкаев А.А* Особенности жирно-кислотного состава и гормонов поджелудочной железы у аборигенного и местного русского населения Заполярья. Вестник Уральской мед. акад. науки. 2(48): 116–119. 2014. [*Bichkaeva F.A., Tipisova E.V., Bichkaev A.A.* Aspects of fatty acid profile and pancreatic hormones in aboriginal and local russian population from polar region. Vestnik Ural'skoj med. akadem. nauki. 2(48): 116–119. 2014. (In Russ)].
40. *Бичкаева Ф.А., Баранова Н.Ф., Власова О.С., Третьякова Т.В., Нестерова Е.В., Шенгоф Б.А., Бичкаев А.А., Волкова Н.И.* Методика измерений массовой концентрации метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) в сыворотке крови методом газожидкостной хроматографии. Реестр методик измерений УрО РАН. Номер 88-16365-001-2019. Номер ФР.1.31.2019.33742. [*Bichkaeva F.A., Baranova N.F., Vlasova O.S., Tretyakova T.V., Nesterova E.V., Shengof B.A., Bichkaev A.A., Volkova N.I.* Method for measuring the mass concentration of fatty acid methyl esters (FAMEs) in blood serum by gas-liquid chromatography. The register of measurement methods of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences. Number 88-16365-001-2019. Number FR.1.31.2019.33742. 2019. (In Russ)].
41. *Наследов А.Д.* SPSS 15.0 Профессиональный статистический анализ данных. СПб. 2008. [*Nasledov A.D.* SPSS 15.0 Professional'nyj statisticheskij analiz dannyh [Professional'nyj statisticheskij analiz dannyh. SPSS 15.0]. St. Petersburg. 2008. (In Russ)].

Study of the Composition of Polyunsaturated Fatty Acids and Their Individual Ratios in Persons of Mature Ageo Different Regions of the North

F. A. Bichkayeva[a, *], N. I. Volkova[a], D. S. Galstyan[a], A. A. Bichkayev[a], and A. A. Lobanov[b]

[a] *Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research (FCIARctic), Arkhangelsk, Russia*
[b] *State institution YNAO "Scientific center of Arctic research", Nadym, Russia*
**e-mail: fatima@fciarctic.ru*

The aim of the study was to investigate by gas-liquid chromatography the serum polyunsaturated fatty acids content in the blood and to evaluate the informative value of their individual relations in clinically healthy adult persons aged 22–35, 36–45 and 46–60 years living in Subarctic (661 people) and Arctic (895 people) of territories of Russia at the present time. The results of the study showed that despite the increase from 22–35 to 46–60 years the serum ω-6 linoleic (C18:2ω6c), arachidonic (C20:4ω6), eicosatrienoic (C20:3ω6), ω-3 linolenic (C18:3ω3), eicosapentaenoic (C20:5ω3), docosahexaenoic (C22:6ω3) acids levels in both regions, there were a deficiency of docosapentaenoic (C22:5ω3) and docosahexaenoic (C22:6ω3) acids, especially in the subarctic, and an excess of arachi-

donic acid in the arctic region. At the same time, there were an increase in the arachidonic/eicosapentaenoic ratio and a decrease in the magnitude of 20:5ω3/22:5ω3, (20: 3ω6 + 20:5ω3)/22:6ω3 in all age groups of subarctic region relative to similar ages of arctic region. That indicates intension in fatty acid metabolism and intensification of substrate synthesis for the generation of pro-inflammatory eicosanoids. At the same time, in the arctic region a statistically significant increase in both ω-3 and ω-6 may be a compensatory-adaptive response in preserving the lipid component of cell membranes, aimed at reducing the risk of their destruction. But increasing the C20:4ω6/C20:5ω3 ratio is one of the hidden criteria risks of synthesizing pro-inflammatory eicosanoids. The obtained results demonstrate the age specificity of the polyunsaturated fatty acids composition in the inhabitants of the Northern territories, determine their physiological state and reflect the risks of the development of metabolic diseases at the present stage.

Keywords: ω-3 and ω-6 polyunsaturated fatty acids, subarctic and arctic regions, mature age

ЦИТИРОВАТЬ:

Бичкаева Ф.А., Волкова Н.И., Галстян Д.С., Бичкаев А.А., Лобанов А.А. Изучение состава полиненасыщенных жирных кислот и их индивидуальных соотношений у лиц зрелого возраста климатогеографически разных районов севера. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(5): 898–915.

DOI: 10.31857/S0869813920050039

TO CITE THIS ARTICLE:

Bichkayeva F.A., Volkova N.I., Galstyan D.S., Bichkayev A.A., Lobanov A.A. Study of the Composition of Polyunsaturated Fatty Acids and Their Individual Ratios in Persons of Mature Age of Different Regions of the North. Russian Journal of Physiology. 106(5): 898–915.

DOI: 10.31857/S0869813920050039

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 7, с. 916–924

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ СИММЕТРИЧНЫХ ОРГАНОВ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЕНИЯ АРТЕРИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ

© 2020 г. Л. В. Мезенцева*

НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина, Москва, Россия
**E-mail: l.v.mezentseva@mail.ru*

Поступила в редакцию 25.11.2019 г.
После доработки 25.02.2020 г.
Принята к публикации 04.05.2020 г.

Известно, что ключевым звеном в патогенезе многих заболеваний, в том числе артериальной гипертензии, являются нарушения микроциркуляции (МЦР). Несмотря на большое количество публикаций, посвященных изучению показателей МЦР у больных артериальной гипертензией, вопросы функциональной асимметрии этих характеристик и их взаимосвязи с артериальным давлением до сих пор мало изучены. Поэтому целью настоящего исследования явилось изучение особенностей проявления лево-правосторонней асимметрии в регуляции сосудистого тонуса симметричных областей парных органов в условиях изменения артериального давления (АД). Измерения показателей МЦР проводили у 5 здоровых добровольцев от 50 до 70 лет методом лазерной допплеровской флоуметрии (ЛДФ) с помощью прибора ЛАКК-02 НПП ЛАЗМА-двухканальный. Датчики ЛДФ-сигнала устанавливали на симметричных сторонах нижних частей правого и левого плеча в точках, расположенных на 3 см выше локтевого сгиба. Оценивали значения показателей МЦР (перфузии) и составляющих частотного спектра: нейрогенной, миогенной дыхательной и сердечной, а также корреляционные взаимосвязи между показателями левой и правой сторон измерения. Результаты корреляционного анализа выявили наличие лево-правосторонней асимметрии в регуляции показателей МЦР, не связанную с величиной артериального давления. Невысокие значения коэффициентов корреляции между показателями МЦР и АД, полученные в ходе настоящего исследования, указывают на отсутствие линейных регрессионных зависимостей между этими величинами, но не исключают наличие нелинейных взаимосвязей между ними.

Ключевые слова: микроциркуляция, асимметрия, артериальное давление, лазерная допплеровская флоуметрия

DOI: 10.31857/S0869813920070043

Несмотря на значительный прогресс в изучении различных сердечно-сосудистых заболеваний, физиологические механизмы регуляции артериального давления (АД) и возникновения артериальной гипертензии (АГ) до сих пор окончательно не выяснены. В то же время известно [1–3], что формирование и протекание различных форм АГ не может осуществляться без участия изменений в системе МЦР. Показано [3], что ключевым звеном в регуляции показателей МЦР является периферическое сосудистое сопротивление, изменения которого приводят к возрастанию или снижению АД. Кровоток в микроциркуляторном русле подвержен спонтанным флуктуациям, поэтому для анализа временных рядов, описывающих дина-

мику процессов МЦР, применяются методы корреляционно-спектрального анализа, позволяющие дифференцировать вклад в общую спектральную мощность составляющих регуляции сосудистого тонуса различной природы: эндотелиальной, нейрогенной, миогенной и других [4, 5]. С помощью этих методов были выявлены корреляционные взаимосвязи между различными составляющими регуляции сосудистого тонуса симметричных областей парных органов млекопитающих и установлено наличие феномена функциональной асимметрии в регуляции МЦР [6–10]. Несмотря на большое количество публикаций, касающихся изучения показателей МЦР у больных АГ [11–14], особенности проявления функциональной асимметрии в регуляции микрокровотока парных органов и их взаимосвязи с АД до сих пор мало изучены. Поэтому целью настоящей работы явилось изучение корреляционных взаимосвязей между показателями МЦР сосудов симметричных органов в условиях изменения АД.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Методом лазерной допплеровской флоуметрии (ЛДФ) измеряли показатели МЦР у 5 здоровых добровольцев от 50 до 70 лет. Измерения проводили с помощью прибора ЛАКК-02 НПП ЛАЗМА-двухканальный. Датчики ЛДФ фиксировались на наружной поверхности симметричных областей нижних частей правого и левого плеча в точках, расположенных на 3 см выше локтевого сгиба. Синхронные измерения показателей МЦР слева и справа проводили в дневное время 5 раз в сутки через каждые 3 ч в течение 5 дней (общий объем выборки $n = 125$ измерений). Записи ЛДФ-сигнала проводилась с частотой 20 Гц в течение 2 мин с интервалом отсчетов 0.05 с. Математическая обработка результатов измерений включала в себя как оценку статистических параметров МЦР каждого фрагмента (среднего значения перфузии PM, стандартного отклонения (σ) и коэффициента вариации KV = $= (\sigma/\text{ПМ})100\%$), так и оценку показателей амплитудно-частотного спектра колебаний, отражающих выраженность различных составляющих спектра [4]: нейрогенного N (0.02–0.06 Гц), миогенного M (0.06–0.15 Гц), дыхательного R (0.15–0.4 Гц) и сердечного C (0.4–1.6 Гц). Расчеты всех показателей МЦР проводились в условных (перфузионных) единицах с помощью программного обеспечения, прилагаемого к ЛДФ-анализатору. Далее проводили множественный корреляционный анализ сопряженности между показателями МЦР симметричных областей. Степень сопряженности между признаками оценивали по величине коэффициента корреляции (r). Принималась, что при $|r| < 0.3$ степень связи практически отсутствует; при $0.3 < |r| < 0.5$ имеет место слабая степень связи; при $0.5 < |r| < 0.7$ – умеренная степень связи; при $0.7 < |r| < 1$ – сильная степень связи. Синхронные измерения систолического и диастолического АД проводили с помощью прибора DIGITAL BLOOD PRESSURE MONITIR UA-777 A&D Company Limited (Токио, Япония). Статистический и корреляционный анализ результатов измерений проводили с использованием стандартных статистических методов, входящих в пакеты прикладных программ Excel for Windows, v. 6.0. Проверка выборок на нормальность проводилась по критерию асимметрии и эксцесса. Оценка значимости различий между данными, полученными в исследуемых временных рядах, проводилась с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены временные ряды, отражающие динамику синхронных изменений АД, ЧСС, перфузии (PM) и коэффициентов вариации (KV) симметричных областей у одного из испытуемых.

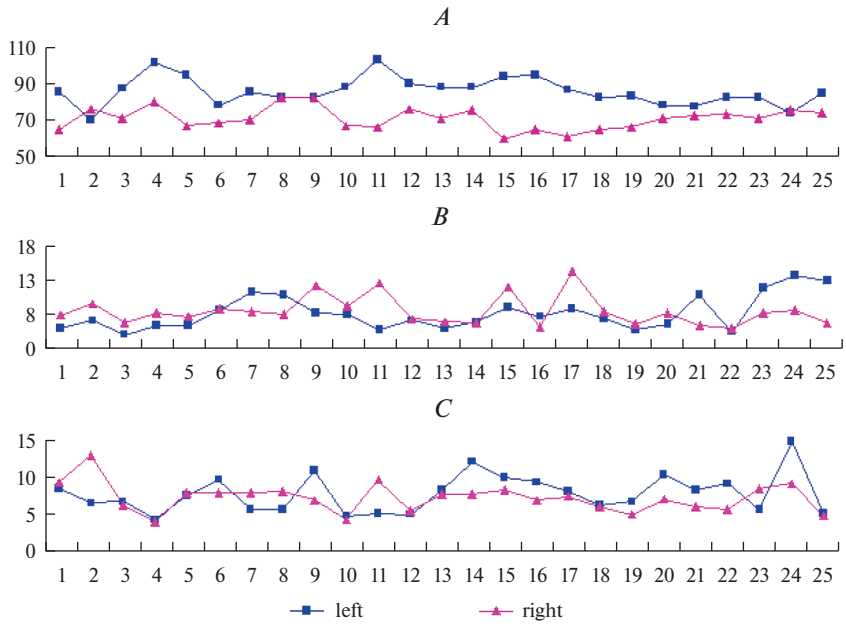


Рис. 1. Динамика изменения показателей гемодинамики и МЦР симметричных сторон измерения. *A* – динамика изменения диастолического AD, мм рт. ст. (синяя линия) и ЧСС (HR), уд/мин (красная линия). *B* – динамика изменения показателя микроциркуляции PM, усл. ед. *C* – динамика изменения коэффициента вариации (KV). Оси абсцисс – порядковый номер измерений.

Fig. 1. Dynamics of changes in hemodynamic parameters and parameters of microcirculation of symmetric sides of measurement. *A* – dynamics of changes of arterial diastolic blood pressure AD, mm Hg (blue line) and heart rate, (HR, beats/min) (red line). *B* – dynamics of changes of the perfusion PM, conv. un. *C* – dynamics of changes of the coefficient of variation KV. The abscissa axis is the sequence number of measurements.

Можно видеть, что динамика изменений показателей МЦР слева и справа – это разные, взаимно не накладывающиеся стохастические процессы. Статистический анализ этих процессов, выполненный для всех 5 испытуемых, показал, что среднее значение величины PM справа (7.57 ± 0.94) достоверно не отличалось от этого показателя слева (7.28 ± 0.89). Аналогичное имело место и для коэффициента вариации: величина KV справа составляла 7.56 ± 0.36, а слева 7.31 ± 0.51, разница не достоверна. Дальнейшие расчеты амплитудно-частотного спектра колебаний PM позволили оценить выраженность различных составляющих спектра симметричных областей. Оценивали максимальные амплитуды нейрогенного, миогенного, дыхательного и сердечного ритмов. На рис. 2 показаны временные ряды, отражающие динамику синхронных изменений амплитуд различных частотных составляющих спектра PM симметричных областей у одного из испытуемых. Можно видеть, что в целом динамика изменения всех показателей носит стохастический характер, поэтому для выявления особенностей лево-правосторонней асимметрии и взаимоотношений между различными составляющими спектра необходим более детальный математический анализ. В табл. 1 представлены результаты статистического анализа этих временных рядов у всех 5 испытуемых (объем выборки $n = 125$ измерений). Из этой таблицы можно видеть, что средние значения амплитуд нейрогенного, миогенного, дыхательного и сердечного ритмов справа были немного выше, чем слева, но эта разница не достоверна.

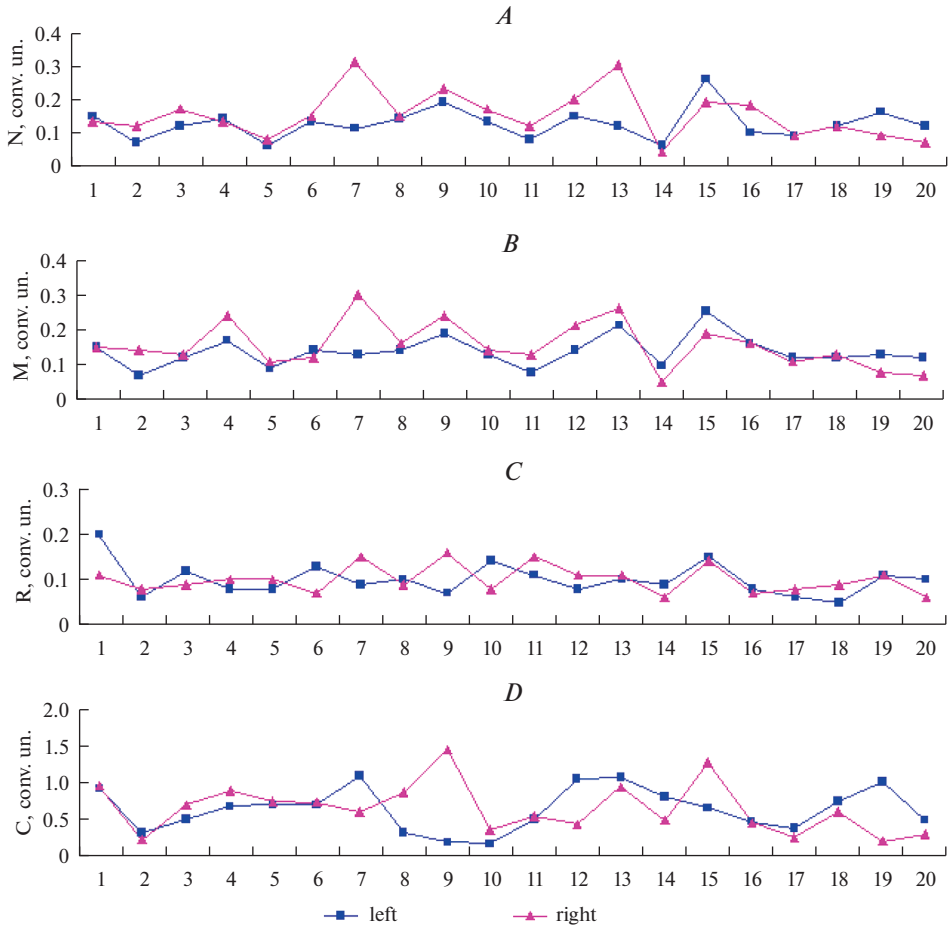


Рис. 2. Временные ряды, отражающие динамику изменения различных составляющих спектра МЦР симметричных сторон измерения. *A* – динамика изменения амплитуды нейрогенной (N) компоненты спектра МЦР. *B* – динамика изменения амплитуды миогенной (M) компоненты спектра МЦР. *C* – динамика изменения амплитуды дыхательной (R) компоненты спектра МЦР. *D* – динамика изменения амплитуды сердечной (C) компоненты спектра МЦР. Оси ординат – значения показателей (усл. ед); оси абсцисс – порядковый номер измерений.

Fig. 2. Time series, reflecting the dynamics of changes in the various components of the spectrum of microcirculation of symmetric sides of measurement. *A* – dynamics of changes in the amplitude of the neurogenic (N) component of the MCR spectrum. *B* – dynamics of changes in the amplitude of the myogenic (M) component of the MCR spectrum. *C* – dynamics of changes in the amplitude of the respiratory (R) component of the MCR spectrum. *D* – dynamics of changes in the amplitude of the cardiac (C) component of the MCR spectrum. Axes ordinate-values of indicators (conv. un.); The abscissa axis is the sequence number of measurement.

Дальнейший анализ был направлен на выявление корреляционных взаимоотношений между амплитудами нейрогенного, миогенного, дыхательного и сердечного ритмов симметричных областей. Результаты расчетов представлены в табл. 2.

Из этой таблицы можно видеть, что величины РМ справа и слева по-разному коррелируют с другими показателями. Так, для среднего значения перфузии РМ

Таблица 1. Средние значения показателей МЦР ($M \pm m$) симметричных областей
Table 1. The average values of the MCR ($M \pm m$) symmetric areas

Показатель (усл.ед.) Parameter (conv.un.)	Слева Left ($M \pm m$)	Справа Right ($M \pm m$)
Перфузия Perfusion (PM)	7.28 ± 0.89	7.57 ± 0.94
Коэффициент вариации The coefficient of variation (KV)	7.31 ± 0.51	7.56 ± 0.36
Нейрогенная компонента спектра Neurogenic component of the spectrum (N)	0.12 ± 0.01	0.15 ± 0.01
Миогенная компонента спектра Myogenic component of the spectrum (M)	0.16 ± 0.03	0.17 ± 0.02
Респираторная компонента спектра Respiratory component of the spectrum (R)	0.09 ± 0.02	0.10 ± 0.01
Сердечная компонента спектра Cardiac component of the spectrum (C)	0.49 ± 0.17	0.61 ± 0.01

справа, достоверно значимая ($|r| > 0.5$) степень связи была выявлена с нейрогенной, миогенной, дыхательной и сердечной компонентами той же стороны измерения. В то же время для среднего значения РМ слева достоверно значимая степень связи была выявлена только с сердечной компонентой спектра той же стороны измерения. Миогенная компонента спектра слева положительно коррелирует с сердечной компонентой той же стороны, а также с миогенной и нейрогенной компонентами противоположной стороны измерения. Если между миогенной компонентой спектра слева и средним значением РМ той же стороны измерения достоверной корреляционной взаимосвязи не обнаружено, то для правой стороны наблюдалось противоположное: между величинами Мпр и РМправ выявлена высокая степень корреляции ($r = 0.73$). Нейрогенная компонента спектра также характеризовалась лево-правосторонней асимметрией: если Nлев положительно коррелировала с миогенной компонентой той же стороны ($r = 0.71$), то Nправ коррелировала с миогенной компонентой противоположной стороны ($r = 0.57$). Относительно корреляционных связей нейрогенной компоненты с величиной среднего значения РМ также была выявлена асимметрия: справа между Nпр и РМпр наблюдалась сильная корреляционная связь ($r = 0.74$), а слева аналогичная взаимосвязь практически отсутствовала ($r = 0.09$). Асимметрия была выявлена и по отношению к дыхательной компоненте спектра: если величина дыхательной компоненты спектра справа коррелировала положительно со средним значением РМ, нейрогенной, миогенной и сердечной компонентой той же стороны, то аналогичные корреляции слева были не достоверны. Асимметрия отмечалась и по отношению к взаимосвязи между сердечной и дыхательной компонентами спектра: выявлена корреляционная взаимосвязь между этими показателями справа ($r > 0.5$) и не обнаружено аналогичных достоверных взаимосвязей слева. Между показателями МЦР симметричных областей и величиной АД достоверных корреляционных связей не выявлено. В то же время между ЧСС и нейрогенной компонентой спектра корреляционная связь характеризовалась асимметрией: справа имела место положительная корреляция, а слева – слабая отрицательная корреляция. Представленные в табл. 2 корреляционные взаимосвязи характеризуют регуляторные процессы, отраженные в динамике изменения индивидуальных характеристик МЦР, измеренных в разные временные периоды, т.е. временных рядах, изображенных на рис.2. Результаты корреляцион-

Таблица 2. Коэффициенты корреляции между показателями гемодинамики (артериальное давление, AD, мм рт. ст. и ЧСС, уд/мин) и показателями МЦР симметричных областей (перфузии (PM), коэффициента вариации (KV), нейрогенной (N), миогенной (M), респираторной (R) и сердечной (C) компонент спектра), $n = 125$

Table 2. Correlation coefficients between hemodynamic parameters (blood pressure (AD, mmHg) and heart rate (HR, b/min)) and MCR parameters of symmetric regions (perfusion (PM), coefficient of variation (KV), neurogenic (N), myogenic (M), respiratory (R) and cardiac (C) components of the spectrum), $n = 125$

Показатель Index	AD	HR	PM Лев Left	KV Лев Left	N Лев Left	M Лев Left	R Лев Left	C Лев Left	PM Пр Right	KV Пр Right	N Пр Right	M Пр Right	R Пр Right	C Пр Right
AD	**1.00**	–0.16	–0.09	–0.23	–0.31	0.18	0.18	–0.05	0.09	–0.05	0.18	0.25	–0.19	0.07
HR	–0.16	**1.00**	0.28	0.17	–0.41	–0.33	0.17	–0.12	–0.17	0.17	0.51*	0.13	0.11	0.25
PM Лев Left	–0.09	0.28	**1.00**	0.21	0.09	0.05	0.38	0.51*	0.12	–0.05	0.05	0.03	0.18	0.01
KV Лев Left	–0.23	0.17	0.21	**1.00**	0.49	0.45	0.11	0.76**	0.04	0.26	0.51*	0.33	0.34	0.08
N Лев Left	0.04	–0.41	0.09	0.49	**1.00**	0.71**	0.26	0.36	0.36	0.25	0.39	0.32	0.45	0.36
M Лев Left	–0.1	–0.33	0.05	0.45	0.71**	**1.00**	0.2	0.55*	0.52*	0.31	0.57*	0.55*	0.46	0.53*
R Left Лев	0.18	0.17	0.38	0.11	0.26	0.20	**1.00**	0.37	0.29	–0.17	0.2	0.01	0.36	0.25
C Лев Left	–0.05	–0.12	0.51*	0.76**	0.36	0.55*	0.37	**1.00**	0.28	0.38	0.34	0.42	0.46	0.21
PM Пр Right	–0.05	–0.17	0.12	0.04	0.36	0.52*	0.29	0.28	**1.00**	0.34	0.74**	0.73**	0.73**	0.61*
KV Пр Right	–0.05	0.17	–0.05	0.26	0.25	0.31	–0.17	0.38	0.34	**1.00**	0.35	0.55*	0.39	0.68*
N Пр Right	0.18	0.51*	0.05	0.51*	0.39	0.57*	0.20	0.34	0.74**	0.35	**1.00**	0.72**	0.58*	0.38
M Пр Right	0.13	0.13	0.03	0.33	0.32	0.55*	0.01	0.42	0.73**	0.55*	0.72**	**1.00**	0.65*	0.72**
R Пр Right	–0.19	0.11	0.18	0.34	0.45	0.46	0.36	0.46	0.73**	0.39	0.58*	0.65*	**1.00**	0.57*
C Пр Right	0.07	0.25	0.01	0.08	0.36	0.53*	0.25	0.21	0.61*	0.68*	0.38	0.72**	0.57*	**1.00**

$0 < |r| < 0.5$ | * $0.5 < |r| < 0.7$ | ** $0.7 < |r| < 1$

ного анализа этих временных рядов выявили наличие лево-правосторонней асимметрии в регуляции показателей МЦР и не выявили достоверных корреляционных взаимосвязей между этими показателями и величиной АД.

Имеющиеся в литературе данные относительно корреляционных взаимосвязей между АД и показателями МЦР противоречивы. В работе [3] показано, что у больных с АГ отмечается увеличение PM и увеличение амплитуд высокочастотных гар-

моник в спектре, что рассматривается как компенсаторное усиление парасимпатических влияний в регуляции кровотока. Однако авторы работы [2] показали, что у здоровых пациентов и больных АГ показатели МЦР не имели статистически значимых отличий. В работе [12] авторы изучали показатели МЦР подъязычной области у здоровых испытуемых и больных АГ различного возраста. Результаты исследований показали, что у больных АГ снижены показатели PVD (perfused vessel density) и TVD (total vessel density), но достоверных различий между остальными показателями МЦР здоровых пациентов и пациентов с АГ не обнаружено. Что касается корреляционных взаимосвязей между величиной АД и показателями МЦР симметричных органов, то до настоящего времени в клинической практике эти вопросы мало изучены. Вместе с тем, в экспериментах на животных было показано наличие феномена лево-правосторонней асимметрии в регуляции показателей МЦР [6–9], в том числе и в условиях снижения системного АД. Так, в работе [7] на основании данных ЛДФ было установлено, что при снижении АД кровоток в микроциркуляторном русле парных защечных мешков хомячка уменьшается, причем относительно исходного уровня снижение ПМ было более выражено слева. Авторы этой работы высказывают предположение, что одной из причин резкого снижения кровотока в МЦР слева является уменьшение числа функционирующих капилляров, которые чувствительны к изменению АД, и снижение скорости кровотока в венулах, вероятность расширения которых более выражена для МЦР слева, как показано при биомикроскопии русла в условиях снижения системного давления [15]. Результаты проведенных нами исследований показали, что числовые значения коэффициентов корреляции между величиной АД и параметрами МЦР находились в диапазоне $0 < r < 0.5$, сильных корреляционных взаимосвязей нами не обнаружено. Однако невысокие значения коэффициентов корреляции между показателями МЦР и АД указывают только на отсутствие линейных регрессионных зависимостей между этими величинами, но не исключают наличие нелинейных взаимосвязей между ними. Экспериментальные исследования, выполненные на животных, указывают на наличие именно нелинейных взаимосвязей между АД и показателями скорости кровотока в сосудах левого и правого кровеносного русла. Так, в работе Ногиной и соавт. [16] проведены синхронные регистрации величин объемной скорости кровотока в симметричных областях правой и левой общих сонных артериях головного мозга кошки в условиях изменения величины АД. Исследования показали, что при низких значениях АД объемная скорость кровотока в правой артерии выше, чем в левой, при высоких значениях АД обе эти величины сравниваются, а в диапазоне средних значений АД существует точка, где объемные скоростьи кровотока справа и слева равны. Причем, левое и правое кровеносное русло имеют различные типы регуляторных процессов: слева они описываются параболической зависимостью, а справа синусоидальной. Подобные нелинейные процессы не могут иметь значимые корреляционные взаимосвязи, т.к. при вычислении коэффициента корреляции суммирование происходит по всей выборке значений АД от самых низких до самых высоких. Учитывая, что локальные значения величин коэффициентов корреляции, измеренные в различных диапазонах изменения АД, различны не только по величине, но и по знаку, суммирование по всей выборке всегда будет иметь итогом невысокие значения коэффициентов корреляции, что говорит об отсутствии линейных регрессионных зависимостей исследуемых параметров кровотока от АД. Поэтому результаты проведенных нами исследований свидетельствуют о том, что взаимосвязь между параметрами МЦР симметричных областей АД нелинейная. Экспериментальное изучение этих взаимосвязей может быть выполнено только путем формирования репрезентативных групп испытуемых отдельно на каждом локальном диапазоне изменений величины АД, начиная от крайней левой границы этого диапазона (низкие значения АД, гипотоники), и кончая крайней правой

границы (высокие значения АД, гипертоники). Результаты проведенных нами исследований согласуются с предположением, высказанном авторами работы [16], о том, что определяющую роль в регуляции сосудистых функций играют не местные регуляторные влияния на сосуды, а системные ауторегуляторные процессы, обеспечивающие устойчивость функционирования целостной гемодинамической системы. Дальнейшие исследования механизмов системной регуляции сосудистых функций и роли функциональной асимметрии в поддержании устойчивости гемодинамических показателей важны не только для фундаментальной физиологии, но и для практической медицины.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена за счет средств Федерального бюджета РФ в рамках выполнения Государственного задания ФГБНУ НИИНФ им. П.К. Анохина.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проведены в соответствии с принципами биомедицинской этики, сформулированными в Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующих обновлениях, и одобрены локальным биоэтическим комитетом НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Абрамович С.Г., Машанская А.В.* Лазерная допплеровская флоуметрия в оценке микроциркуляции у здоровых людей и больных артериальной гипертонией. Сибирский мед. журн. (Иркутск). 92(1): 57–59. 2010. [*Abramovich S.G., Mashanskaya A.V.* Laser Doppler flowmetry in the assessment of microcirculation in healthy people and patients with arterial hypertension. Siberian Med. J. 92(1): 57–59. 2010. (In Russ)].
2. *Васильев А.П., Стрельцова Н.Н., Секисова М.А.* Варианты функциональной организации микроциркуляции кожи у больных артериальной гипертонией по результатам лазерной допплеровской флоуметрии. Рос. кардиол. журн. 4(120): 7–12. 2015. [*Vasiliev A.P., Streltsova N.N., Sekisova M.A.* Variants of functional organization of skin microcirculation in patients with arterial hypertension based on the results of laser Doppler flowmetry. Russ. J. Gardiol. 4 (120): 7–12. 2015 (In Russ)].
3. *Козлов В.И., Азизов Г.А.* Механизм модуляции тканевого кровотока и его изменение при гипертонической болезни. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 4(8): 53–59. 2003. [*Kozlov V.I., Azizov G.A.* The mechanism of modulation of tissue blood flow and its change in hypertension. Regionarnoe krovoobrachenie i micricirculacia. 4(8): 53–59. 2003. (In Russ)].
4. *Крупаткин А.И., Сидоров В.В.* Лазерная допплеровская флоуметрия микроциркуляции крови: руководство для врачей. М. Медицина. 2005. [*Krupatkin A.I., Sidorov V.V.* Laser Doppler flowmetry of blood microcirculation: a guide for doctors. Moscow. Medicine. 2005. (In Russ)].
5. *Kvandal P., Landsverk S.A., Bernjak A., Stefanovska A., Kvernmo H.D., Kirkebøen K.A.* Low-frequency oscillations of the laser Doppler perfusion signal in human skin. Microvasc. Res. 72 (3): 120–127. 2006.
https://doi.org/10.1016/j.mvr.2006.05.006
6. *Михайличенко Л.А.* Эндотелиальный компонент в механизмах регуляции тонуса сосудов парных образований по данным лазерной допплеровской флоуметрии. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 28(4): 71–79. 2008. [*Mikhailichenko L.A.* Endothelial component in mechanisms of regulation of a tone of vessels of pair formations according to laser Doppler flowmetry. Regionarnoe krovoobrachenie i micricirculacia. 28(4): 71–79. 2008. (In Russ)].
7. *Mikhailichenko L.A.* Parameters of microcirculation in hamster buccal pouches under conditions of reduced systemic blood pressure. Bull. Exp. Biol. Med. 145(1): 23–28. 2008.
8. *Михайличенко Л.А, Мезенцева Л.В.* Корреляционно-спектральный анализ регуляторных механизмов тонуса сосудов парных образований в постнатальном онтогенезе крыс. Бюл. экспер. биол. и мед. 158(9): 287–293. 2014. [*Mikhailichenko L.A., Mezentseva L.V.* Correlation and spectral analysis of the regulation mechanisms of vessel tone of pair formations in postnatal ontogenesis in rats. Bull. Exp. Biol. Med. 145(1): 23–28. 2008. (In Russ)].
9. *Mezentseva L.V., Pertsov S.S., Hugaeva V.K.* A Comparative Analysis of the Persistence of Capillary Blood Flow Oscillations in the Left and Right Rat Kidneys. Biophysics. 61(4): 656–660. 2016.
10. *Guzik P., Piskorski J., Krauze T., Narkiewicz K., Wykretowicz A., Wysocki H.* Asymmetric features of short-term blood pressure variability. Hypertens. Res. 33(11): 1199–205. 2010.
https://doi.org/10.1038/hr.2010.138

11. *Tsioufis C., Dimitriadis K., Katsiki N., Tousoulis D.* Microcirculation in Hypertension: An Update on Clinical Significance and Therapy. Curr. Vasc. Pharmacol. 13 (3): 413–417. 2015.
12. *Kanoore Edul V.S., Ince C., Estenssoro E., Ferrara G., Arzani Y., Salvatori C., Dubin A.* The Effects of Arterial Hypertension and Age on the Sublingual Microcirculation of Healthy Volunteers and Outpatients with Cardiovascular Risk Factors. Microcirculation. 22(6): 485–92. 2015. https://doi.org/10.1111/micc.12219
13. *Bruno R.M., Masi S., Taddei M., Taddei S., Virdis A.* Essential Hypertension and Functional Microvascular Ageing. High Blood Press. Cardiovasc. Prev. 25(1): 35–40. 2018. https://doi.org/10.1007/s40292-017-0245-9
14. *De Moraes R., Tibirica E.* Early Functional and Structural Microvascular Changes in Hypertension Related to Aging. Curr. Hypertens. Rev. 13(1): 24–32. 2017. https://doi.org/10.2174/1573402113666170413095508
15. *Михайличенко Л.А., Тимкина М.И.* Микрососуды защечных мешков хомячка в условиях снижения системного давления. Бюл. экспер. биол. и мед. 138(12): 617–621. 2004. [*Mikhailichenko L.A., Timkina M.I.* Microvessels in cheek pouches of a hamster under declining systemic pressure. Bull. Exp. Biol. Med. 138 (12): 617–621. 2004. (In Russ)].
16. *Ногина С.П., Саноцкая Н.В., Мациевский Д.Д.* Особенности гемодинамического режима в правой и левой общих сонных артериях кошки. Бюл. экспер. биол. мед. 105 (4): 414–417. 1988. [*Nogina S.P., Sanotskaya N.V., Matsievsky D.D.* Haemodynamic Regtimes in the common right and left carotid arteries in cats. Bull. Exp. Biol. Med. 105(4): 414–417. 1988. (In Russ)].

Analysis of Characteristics of Microcirculation of Symmetrical Organs under Changes in Blood Pressure

L. V. Mezentseva*

Anokhin Institute of Normal Physiology, Moscow, Russia
**e-mail: l.v.mezentseva@mail.ru*

It is known that a key link in a pathogenesis of many diseases, including arterial hypertension, is disturbances of microcirculation (MCR). Despite a considerable quantity of the publications on characteristics of MCR at patients with arterial hypertension, questions of functional asymmetry these characteristics and their interrelation with blood pressure till now are a little studied. Therefore the purpose of the present research was studying of features of left-right asymmetry in regulation of a vascular tonus of symmetric areas of paired organs under changes in blood pressure. Measurements of characteristics of microcirculation spent at 5 healthy volunteers from 50 till 70 years by means of a LDF method (device LAKK-02 NPP LASMA-two channels). The sensors LDF signal recorded on the symmetric parties of the bottom parts of the right and left shoulder in the points located on 3 cm above an elbow bend. Characteristics of MCR (perfusion) and amplitudes of frequency spectrum: neurogenic, myogenetic, respiratory and cardiac, and correlations between them was estimated. Correlation relationships between various components of a vascular tonus showed left-right asymmetry that has been not associated with blood pressure value. Low values of the correlation coefficients between the MCR and AD obtained in this study indicate the absence of linear regression dependencies between these values, but do not exclude the presence of nonlinear relationships between them.

Keywords: microcirculation, asymmetry, blood pressure, laser Doppler flowmetry

ЦИТИРОВАТЬ:

Мезенцева Л.В. Анализ показателей микроциркуляции симметричных органов человека в условиях изменения артериального давления. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(7): 916–924.

DOI: 10.31857/S0869813920070043

TO CITE THIS ARTICLE:

Mezentseva L.V. Analysis of Characteristics of Microcirculation of Symmetrical Organs Under Changes in Blood Pressure. Russian Journal of Physiology. 106(7): 916–924.

DOI: 10.31857/S0869813920070043