РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА
Том 108, № 1, 2022

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

СОДЕРЖАНИЕ

Обзорные и проблемные статьи

Причины гипоксемии при COVID-19
Ж. А. Донина 3

Экспериментальные статьи

Односторонняя хроническая ишемия области каротидных телец изменяет активность симпатической нервной системы
М. А. Марков, М. П. Давыдова 13

Методологические и вычислительные аспекты извлечения обширных мышечных синергий при локомоциях умеренной интенсивности
С. А. Моисеев, А. М. Пухов, Е. А. Михайлова, Р. М. Городничев 24

Этосуксимид улучшает когнитивную гибкость при реверсивном обучении у крыс линии WAG/R_{ij} с абсанс-эпилепсией и коморбидной депрессией
Е. А. Федосова, А. Б. Шацкова, К. Ю. Саркисова 36

Клеточная терапия как способ коррекции нарушений нейрогенеза во взрослом мозге в модели болезни Альцгеймера
А. В. Чаплыгина, Д. Ю. Жданова, В. И. Ковалев, Р. А. Полтавцева, Н. И. Медвинская, Н. В. Бобкова 59

Участие $5\text{-}HT_1$ И $5\text{-}HT_{5A}$ рецепторов в модуляции синаптической передачи и внутренних свойств мембраны спинальных мотонейронов лягушки (*Rana ridibunda*)
Н. И. Калинина, Н. П. Веселкин 85

Влияние аллостерического модулятора M_5 холинорецепторов VU 0238429 на нервно-мышечную передачу в диафрагмальной мышце мыши
И. В. Ковязина, А. А. Хамидуллина, Н. С. Фёдоров, А. И. Маломуж 98

Участие глутаминсинтетазы в развитии гипербарических кислородных судорог
О. С. Алексеева, С. Ю. Жиляев, Т. Ф. Платонова, Д. Л. Цыба, О. В. Кирик, Д. Э. Коржевский, И. Т. Демченко 109

Эффекты аналога гонадотропин-рилизинг гормона сурфагона на болевую чувствительность у крыс
И. И. Бобынцев, А. О. Ворвуль, М. Е. Долгинцев, А. А. Крюков 121

CONTENTS

Reviews

Causes of Hypoxemia in COVID-19
Zh. A. Donina 3

Experimental Articles

Unilateral Chronic Ischemia of the Carotid Bodies Changes the Activity of the Sympathic Nervous System
M. A. Markov and M. P. Davydova 13

Methodological and Computational Aspects of Extracting Extensive Muscle Synergies in Moderate-Intensity Locomotions
S. A. Moiseev, A. M. Pukhov, E. A. Mikhailova, and R. M. Gorodnichev 24

Ethosuximide Improves Cognitive Flexibility during Reversal Learning in WAG/Rij Rats with Absence Epilepsy and Comorbid Depression
E. A. Fedosova, A. B. Shatskova, and K. Yu. Sarkisova 36

Cell Therapy as a Way to Correct Disorders of Neurogenesis in the Adult Brain in a Model of Alzheimer's Disease
A. V. Chaplygina, D. Y. Zhdanova, V. I. Kovalev, R. A. Poltavtseva, N. I. Medvinskaya, and N. V. Bobkova 59

Involvement of 5-HT_1 and 5-HT_{5A} Receptors in Modulation of Synaptic Transmission and Internal Properties of the Membrane of Spinal Frog Motoneurons (*Rana ridibunda*)
N. I. Kalinina and N. P. Veselkin 85

Effects of Compound VU 0238429, an Allosteric Modulator of M_5 Cholinoreceptors, on the Neuromuscular Transmission in the Mouse Diaphragm
I. V. Kovyazina, A. A. Khamidullina, N. S. Fedorov, and A. I. Malomouzh 98

Involvement of Glutamine Synthetase in the Development of Hyperbaric Oxygen Seizures
O. S. Alekseeva, S. Yu. Zhilyaev, T. F. Platonova, D. L. Tsyba, O. V. Kirik, D. E. Korzhevskii, and I. T. Demchenko 109

Effects of Gonadotropin-Releasing Hormone Analogue Surfagon on Rats' Pain Sensitivity
I. I. Bobyntsev, A. O. Vorvul, M. E. Dolgintsev, and A. A. Kriukov 121

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2022, том 108, № 1, с. 3–12

ОБЗОРНЫЕ И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

ПРИЧИНЫ ГИПОКСЕМИИ ПРИ COVID-19

© 2022 г. Ж. А. Донина*

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия
**E-mail: zdonina@mail.ru*

Поступила в редакцию 21.09.2021 г.
После доработки 13.10.2021 г.
Принята к публикации 18.10.2021 г.

Пандемия нового коронавирусного заболевания (COVID-19) поставила перед специалистами здравоохранения всего мира задачи, связанные с диагностикой, интенсивным изучением эпидемиологических и клинических особенностей протекания коронавирусной инфекции, разработкой профилактики, терапевтических подходов к методам лечения и реабилитационным мероприятиям. Но несмотря на достигнутые успехи в изучении патогенеза COVID-19, многие аспекты, усугубляющие тяжесть протекания заболевания и высокую смертность пациентов, остаются неясными. Основным клиническим проявлением нового варианта вирусной инфекции SARS-CoV-2 является пневмония с массивным паренхиматозным поражением легочной ткани, диффузным повреждением альвеол, тромботическими проявлениями, нарушением вентиляционно-перфузионных отношений и др. Однако симптомы у пациентов, госпитализированных с COVID-пневмонией, имеют значительные различия: у большинства заболевание протекает с минимальными проявлениями, у других развивается тяжелая дыхательная недостаточность, осложненная развитием острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) с быстро прогрессирующей гипоксемией, приводящей к высокой смертности. Многочисленные публикации клиницистов сообщают, что у части пациентов с COVID-пневмонией без субъективных признаков тяжелой дыхательной недостаточности (одышка, воздушный “голод”) был зарегистрирован чрезвычайно (экстремально) низкий уровень сатурации. В результате возникает ситуация, получившая названия “тихая гипоксия”, “молчаливая гипоксия”, “счастливая гипоксия”, противоречащая основам физиологии – тяжелая гипоксемия, несовместимая с жизнью и отсутствие при этом ощущений дыхательного дискомфорта. Все это вызывает многочисленные вопросы у врачей, что привело к широкой дискуссии в научных публикациях, освещающих вопросы патогенеза COVID-19. Дыхательная недостаточность – сложная клиническая проблема, многие аспекты которой остаются спорными. Однако, по мнению большинства авторов, одним из объективных показателей клинического признака дыхательной недостаточности, прежде всего, являются изменения внешнего дыхания, связанные с гипоксемией. В данном обзоре рассматриваются некоторые возможные причины возникновения гипоксемии при COVID-19.

Ключевые слова: коронавирусная инфекция (SARS-CoV-2), цитокиновый шторм, гипоксемия, острая дыхательная недостаточность

DOI: 10.31857/S0869813922010058

В конце 2019 г. в Китайской Народной Республике (КНР) произошла вспышка новой коронавирусной инфекции с эпицентром в городе Ухань (провинция Хубэй). Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) 11 февраля 2020 г. определила

официальное название инфекции, вызванной новым коронавирусом – COVID-19 (“Coronavirus disease 2019”). Международный комитет по таксономии вирусов 11 февраля 2020 г. присвоил официальное название возбудителю инфекции – SARS-CoV-2 [1].

Коронавирусы (*Coronaviridae*) – это большое семейство РНК-содержащих вирусов, способных инфицировать как животных, так и человека. У людей коронавирусы могут вызвать целый ряд заболеваний – от легких форм острой респираторной инфекции (ОРВИ) до тяжелого острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) [2, 3]. Масштабные исследования обнаружили, что в первую очередь инфицируются эпителиальные клетки дыхательных путей и иммунные клетки слизистых оболочек. Инфицированные клетки вызывают неконтролируемую каскадную экспрессию провоспалительных цитокинов, хемокинов и других медиаторов острофазового ответа, образующих “цитокиновый шторм” – избыточный иммунный ответ на инфекцию [4–6]. Отличие COVID-19 от других форм вирусных инфекций заключается в том, что органом-мишенью при этом варианте цитокинового шторма преимущественно являются легкие, что связано с тропизмом коронавируса к легочной ткани [7, 8]. На сегодняшний день показано, что основным фактором смертности у критических больных COVID-19 являются респираторные осложнения, обусловленные высокой чувствительностью легких к вирусу SARS-CoV-2 [9–11]. Причина такой чувствительности объясняется тем, что клетки альвеолярного эпителия II типа имеют высокий уровень экспрессии ангиотензин-превращающего фермента 2 (АПФ2), который является рецептором SARS-CoV-2, и клеточной трансмембранной сериновой протеазы типа 2 (ТСП2), которая способствует связыванию вируса с АПФ-2 и проникновению в клетку [12–14]. Имеющиеся на сегодняшний день данные показывают, что АПФ2 и ТСП2, экспрессированные на поверхности различных клеток органов дыхания, пищевода, кишечника, сердца, надпочечников, мочевого пузыря, головного мозга а также эндотелия и макрофагов, могут быть причиной полиорганной недостаточности [4, 7–12, 15–21].

Как следует из недавних публикаций [22–25], у больных, поступающих в отделение интенсивной терапии с тяжелым течением ОРДС и диагностируемым COVID-19, регистрировался очень низкий уровень сатурации. Однако, несмотря на выраженность несовместимой с жизнью гипоксемии, у некоторых пациентов отсутствовали признаки респираторного дистресса (тахипноэ, одышка, “воздушный голод”). В дальнейшем, особенно у пожилых пациентов происходило резкое и внезапное ухудшение состояния, требующее применения экстренных реанимационных мероприятий. Так, например, отчет клинического наблюдения свидетельствует, что у 64-летнего пациента с положительным результатом теста на коронавирус 2 (SARS-CoV-2) и развитием ОРДС сатурация (SpO_2), измеренная с помощью пульсоксиметрии, составляла 68%, в то время как напряжение O_2 (PaO_2) в артериальной крови составляло 37 мм рт. ст. при нормокапнии ($PaCO_2$ 41 мм рт. ст.). У другого пациента в возрасте 74 лет также с подтвержденным результатом на SARS-CoV-2 при ингаляции кислорода посредством лицевой маски SpO_2 составляло 62%, а PaO_2 при этом соответствовало только 36 мм рт. ст. Однако эти больные не предъявляли жалоб на какие-либо ощущения затруднения дыхания. Из этого следует, что низкий уровень сатурации при отсутствии видимого дискомфорта со стороны респираторной системы во многих случаях является характерным явлением для большинства пациентов с COVID-пневмонией [22, 26].

Следует отметить, что для неинвазивного мониторинга гипоксемии в медицинской практике обычно используется пульсоксиметрия (SpO_2), которая отражает только насыщение гемоглобина кислородом (HbO_2%), что не соответствует истинному парциальному давлению кислорода в артериальной крови (PaO_2) [27]. Но по установившимся представлениям, определяющим фактором кислородного снаб-

жения тканей организма является не HbO_2%, а PaO_2, мм рт. ст. В соответствии с физиологическими принципами, переход кислорода из гемоглобина в кровь зависит прежде всего от положения кривой диссоциации оксигемоглобина (КДО), имеющей сигмовидную форму, от кислородной емкости крови, скорости кровотока, температурного фактора и др. [28]. Так, например, гипокапния и респираторный алкалоз, возникающие в результате гипервентиляции (тахипноэ, гиперпноэ), смещая кривую диссоциации влево, увеличивают сродство гемоглобина к кислороду, затрудняя его переход в кровь, что объясняет более высокий уровень SpO_2 при очень низком PaO_2 [29, 30].

Как видно из приведенных клинических примеров, независимо от методов измерения – неинвазивного (пульсоксиметрия) и инвазивного определения напряжения PaO_2 в артериальной крови, у больных с COVID-пневмонией развивается гипоксемия. В последнее время в публикациях многих авторов наличие гипоксии без соответствующих признаков дыхательного дискомфорта определяется как “тихая гипоксия”, “молчаливая гипоксия”, “счастливая гипоксия” [22, 23, 31, 32]. Сообщения о “загадочной гипоксии” или “бессимптомной гипоксии” вызвали широкую дискуссию в научных работах, освещающих на основе установленных патофизиологических механизмов причины отсутствия дыхательного дистресс-синдрома при тяжелой степени гипоксии на ранней стадии развития COVID-19 [31, 33, 34]. В проведенных исследованиях многократно было показано, что прогрессирование гипоксии на ранней стадии заболевания у больных COVID-19 происходит при нормальном уровне $PaCO_2$ (нормокапнии), что, по-видимому, не является признаком нарушения регуляции дыхания [22, 23, 35]. Однако, как известно, гипоксия вызывает гипервентиляцию, приводящую к гипокапнии, угнетающей центральные (медуллярные) хеморецепторы, в результате притупляется вентиляторная реакция на гипоксию, что объясняет отсутствие дыхательного дискомфорта (одышки) при гипоксии. В данном случае можно говорить о нарушении механизмов регуляции дыхания. Но поскольку респираторный дистресс развивается при повышенном уровне CO_2 (гиперкапнии), то соответствующие симптомы дисфункции дыхания, видимо, проявляются на более поздних стадиях развития болезни, когда на фоне гипоксии и гиперкапнии развивается критическая дыхательная недостаточность (нарушение биомеханики дыхания, увеличение сопротивления дыхательных путей, вентиляционно-перфузионных отношений, легочной циркуляции, изменение структуры альвеоло-капиллярной мембраны, тромбоэмболия и др.) [22, 33, 36].

Следует отметить, что дыхательная недостаточность, в том числе и скрытая дыхательная недостаточность – это сложная клиническая проблема, многие аспекты которой остаются спорными. Считается, что одним из объективных показателей дыхательной недостаточности является гипоксемия [37].

Обсуждая потенциальные механизмы возникновения гипоксии при COVID-19 следует учитывать непосредственное влияние вируса SARS-CoV-2 на его клеточный рецептор (АПФ2), который экспрессируется в сенсорных клетках каротидного тела, снижая чувствительность гломусных клеток к дефициту кислорода [38, 39]. Из этого следует, что одной из возможных причин гипоксемии у пациентов с COVID-19 может являться угнетение периферической хеморецепции [40–42]. Здесь возникает важный практический вопрос о количестве АПФ2 и ТСП2 в каротидном теле, достаточной для инвазии SARS-CoV-2 в клетки. Наличие АПФ2 в каротидном теле было обнаружено методом иммуноблоттинга [43, 44], но другие авторы на основании результатов иммуногистохимического исследования каротидного тела мыши предполагают лишь минимальную экспрессию в нем рецептора АПФ2 в отличие от его массивной экспрессии эпителиальными клетками легких, кишечника и почек [40]. Следовательно, вопрос о степени участия периферическо-

го звена регуляции дыхания в рефлекторных механизмах развития гипоксемии при COVID-19 пока окончательно не решен. Однако рефлекторная регуляция не исключает непосредственного влияния гуморальных сдвигов на дыхательный центр. Возможная нейроинвазия SARS-CoV-2 в ЦНС рассматривается в качестве причин возникновения гипоксемии, хотя точная локализация инфицированных структур в областях, ответственных за регуляцию дыхания и контролирующих дыхательные ощущения, пока еще остается не вполне определенной [41, 45–47].

Вместе с тем показано, что родственные коронавирусы SARS-CoV и MERS-CoV были обнаружены в дыхательных нейронах ствола мозга, что приводило к летальному исходу в результате развития тяжелой дыхательной недостаточности [48–50]. Вполне вероятно, что аналогичная структура и механизмы инфицирования, обусловленные нейротропизмом и обнаруженные для других коронавирусов, могут быть применены и для SARS-CoV-2 [41, 42, 51–53].

Повреждение эндотелия и поражение микроциркуляторного русла легких является существенным звеном патогенеза COVID-19, поскольку SARS-CoV-2 инфицирует эпителиальные клетки капилляров легких, экспрессирующие АПФ2 [54]. Было установлено, что в условиях острого воспалительного процесса и эндотелиального повреждения в результате дисбаланса между прокоагулянтом и фибринолитической активностью происходит образование внутрисосудистых микротромбов в мелких сосудах легких [55]. Усиленное тромбообразование было выявлено у пациентов с COVID-19, а результаты посмертных вскрытий обнаружили массивное повреждение микрокапилляров альвеол, отечность и утолщение альвеоло-капиллярной мембраны, окклюзию легочных капилляров, наличие крупных тромбов, вызывающих тромбоз легочной артерии [56]. Эти данные указывают на то, что при тяжелом течении COVID-19 тромбоэмболические образования являются наиболее частым осложнением, способствующим обструкции легочных сосудов, нарушению вентиляционно-перфузионных отношений и развитию гипоксемии [57]. Отложение фибрина и тромбина происходит в основном в легочном микроциркуляторном русле, являясь фактором, который способствует развитию острого респираторного дистресс-синдрома и коагулопатии у пациентов, умирающих от COVID-19. Поскольку переход кислорода из альвеолярного воздуха в кровь легочных микрососудов осуществляется путем диффузии через альвеоло-капиллярную мембрану, то ее утолщение и микрососудистые тромбы могут привести к снижению диффузионной способности для кислорода (D_{LO2}) и развитию артериальной гипоксемии. Показано, что при тяжелом течении ОРДС в результате увеличенной проницаемости эндотелиальных и альвеолярных эпителиальных барьеров капилляров легких возникает альвеолярный и интерстициальный отек, вызывая инфильтрацию жидкости богатой белком и иммунными клетками в паренхиму [58]. Накопление жидкости в альвеолах, нарушение синтеза сурфактанта, способствующего коллапсу альвеол, все это ухудшает эффективность газообмена между альвеолами и сосудистой сетью, что приводит к альвеолярной гипоксии и гипоксемии [59]. Следовательно, повреждение эндотелия микрососудистого русла и дисфункция части альвеол также являются факторами, положительно коррелирующими с развитием гипоксемии, особенно у тяжелых больных с поражениями нижних дыхательных путей.

Некоторые исследователи одним из возможных факторов тяжелой степени COVID-19 рассматривают оксидативный стресс [60]. Была установлена взаимосвязь между воспалением и окислительным стрессом [61], однако многие вопросы о степени участия окислительного стресса в цитокиновом шторме пока недостаточно изучены. Вместе с тем предполагается, что следствием COVID-19 может явиться дисфункция как внутриклеточных митохондрий, так и внеклеточных, на-

пример, митохондрий тромбоцитов, которые могут влиять на образование тромбозов [62].

С помощью компьютерного моделирования представлены пока еще предварительные данные о механизме влияния вируса SARS-CoV-2 непосредственно на гемовую группу гемоглобина [7, 63]. Выдвигается гипотеза, что вирус SARS-CoV-2 непосредственно с эритроцитами не взаимодействует, а воздействует посредством дополнительного рецептора CD147. Молекулярный анализ структуры SARS-CoV-2 показал, что белок ORF8 и поверхностный гликопротеин вируса могут связываться с порфирином, а белки ORF1ab, ORF10 и ORF3a – взаимодействовать с 1-бета цепью гемоглобина, приводя к диссоциации молекул железа и порфирина. Дисфункциональный гемоглобин, лишенный атомов железа, не способен осуществлять газотранспортную функцию (транспорт O_2 и CO_2), в результате снижается эффективность газообмена и усугубляется гипоксия [64, 65].

Что касается причин возникновения гипоксемии без проявления одышки, то не все авторы упоминают, что “тихая” гипоксемия может возникать не только при COVID-19, но и у пациентов с ателектазом, внутрилегочным или внутрисердечным шунтом [66]. Как известно, адекватность газообмена в первую очередь зависит от вентиляционно-перфузионных отношений, т.е. баланса между капиллярным кровотоком и легочной вентиляцией. Как справедливо указывает ряд авторов, ключевым фактором развития гипоксемии на ранней стадии инфекции SARS-CoV-2 является несоответствие вентиляционно-перфузионных отношений (V/Q) и наличие анатомических артерио-венозных анастомозов или альвеолярных шунтов в легких [67–71]. Шунтирование справа налево подразумевает прохождение части венозной крови по шунтам, минуя вентилируемые области легких. Таким образом, при увеличении фракции легочного шунта возникает гипоксемия в результате частичного сброса неоксигенированной венозной крови (венозное примешивание) в артериальное русло [69]. Внутрилегочный шунт справа налево был продемонстрирован исследователями при эхокардиографии с контрастным усилением у пациента с COVID-19 [72], шунтирование сопровождалось гипоксией и соответствующим увеличением вентиляции легких. Однако при наличии шунта гипервентиляция не увеличивала PaO_2, но снижала $PaCO_2$, поскольку у CO_2 диффузионная способность выше, чем у O_2. Следовательно, в этом случае может развиваться гипокапния без увеличения вентиляции, что объясняет отсутствие одышки при гипоксемии. В случае нарастания тяжести ОРДС при прогрессировании гипоксемии и нарастании $PaCO_2$, возможно, будет развиваться одышка с соответствующими проявлениями дыхательного дискомфорта.

В заключение следует отметить, что основное внимание обзорной статьи было направлено на анализ некоторых механизмов возникновения гипоксемии при ОРДС, вызванной новой коронавирусной инфекцией SARS-CoV-2. Описанные в статье факторы являются звеньями одной цепи и имеют решающее значение в развитии гипоксемии при COVID-19. Очевидно, что по степени значимости на первый план выступает нейроинвазия SARS-CoV-2 в периферические и центральные центры регуляции дыхания. Дальнейший ход развивающихся нарушений является результатом комплексного влияния повреждения эндотелия микроциркуляторного русла легких, массивного поражения альвеол, повреждения молекул гемоглобина и др. Однако, согласно мнению многих исследователей, ведущее значение в развитии гипоксемии при отсутствии одышки принадлежит внутрилегочному шунтированию. Проведение дальнейших исследований позволит выявить дополнительные механизмы развития гипоксемии и ее вовлечения в патогенез COVID-19.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет средств федерального бюджета, выделяемых на выполнение Государственного задания.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Cao Y, Hiyoshi A, Montgomery S* (2020) COVID-19 case-fatality rate and demographic and socioeconomic influencers: worldwide spatial regression analysis based on country-level. Data BMJ Open 10(11): e043560.
https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-043560
2. *Franks TJ, Chong PY, Chui P, Galvin JR, Lourens RM, Reid AH, Selbs E, Mcevoy PL, Hayden DL, Fukuoka J, Taubenberger JK, Travis WD* (2003) Lung pathology of severe acute respiratory syndrome (SARS): a study of 8 autopsy cases from Singapore. Hum Pathol 34: 743–748.
https://doi.org/10.1016/S0046-8177(03)00367-8
3. *Gilbert JA* (2018) Advancing towards precision medicine in ARDS. Lancet Respir Med 6: 494–495.
https://doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30156-5
4. *Li S, Fu B, Meshram CD* (2019) Innate immune and inflammatory responses to respiratory viruses. Mediators Inflamm 1–2.
https://doi.org/10.1155/2019/3146065
5. *Azkur AK, Akdis M, Azkur D, Sokolowska M, Van De Veen W, Bruggen MC, O'Mahony L, Gao Y, Nadeau K, Akdis AC* (2020) Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. Allergy 75: 1564–1581.
https://doi.org/10.1111/all.14364
6. *Behrens EM, Koretzky GA* (2017) Review: Cytokine storm syndrome: Looking toward the precision medicine era. Arthritis & Rheumatology 69(6): 1135–1143.
https://doi.org/10.1002/art.40071
7. *Liu W, Hualan L* (2020) COVID-19: Attacks the 1-Beta chain of hemoglobin and captures the porphyrin to inhibit human heme metabolism. ChemRxiv Epub ahead of print.
https://doi.org/10.26434/chemrxiv.11938173.v9
8. *Sun X, Wang T, Cai D, Hu Z, Chen J, Liao H, Zhi L, Wei H, Zhang Z, Qiu Y, Wang J, Wang A* (2020) Cytokine storm intervention in the early stages of COVID-19 pneumonia. Cytokine Growth Factor Rev 53: 38–42.
https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2020.04.002
9. *Zhang H, Penninger JM, Li Y, Zhong N, Slutsky AS* (2020) Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. Intensive Care Med 46(4): 586–590.
https://doi.org/10.1007/s00134-020-05985-9
10. *Abdin SM, Elgendy SM, Alyammahi SK, Alhamad DW, Omar HA* (2020) Tackling the cytokine storm in COVID-19, challenges and hopes. Life Sie 257: 118054.
https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118054
11. *Xie J, Covassin N, Fan Z, Singh P, Gao W, Li G, Kara T, Somers VK* (2020) Association between hypoxemia and mortality in patients with COVID-19. Mayo Clin Proc 95: 1138–1147.
https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2020.04.006
12. *Shang J, Wan Y, Luo C, Ye G, Geng Q, Auerbach A. Li F* (2020) Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. Proc Natl Acad Sci U S A 117(21): 11727–11734.
https://doi.org/10.1073/pnas.2003138117
13. *Letko M., Marzi A., Munster V.* (2020) Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. Nat Microbiol 5: 562–569.
https://doi.org/10.1038/s41564-020-0688-y
14. *Wan Y, Shang J, Graham R, Baric RS, Li F* (2020) Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: An analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. J Virol 94: 00127-20.
https://doi.org/10.1128/JVI.00127-20
15. *Чучалин АГ* (2004) Тяжелый острый респираторный синдром. Терапевт архив 79(3): 5–11. [*Chuchalin AG* (2004) Severe acute respiratory syndrome. Therapeutic Archiv 79(3): 5–11. (In Russ)].
16. *Kuba K, Imai Y, Rao S, Gao H, Guo F, Guan B, Huan Y, Yang P, Zhang Y, Deng W, Bao L, Zhang B, Liu G, Wang Zh, Chappell M, Liu Y, Zheng D, Leibbrandt A, Wada T, Slutsky AS, Liu D, Qin C, Jiang C, Penninger JM* (2005) A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in

SARS coronavirus-induced lung injury. Nat Med 11(8): 875–879.
https://doi.org/10.1038/nm1267

17. *Cameron MJ, Bermejo-Martin JF, Danesh A, Muller MP, Kelvin DJ* (2008) Human immunopathogenesis of severe acute respiratory syndrome (SARS). Virus Res 133(1): 13–19.
https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.02.014
18. *Jiang Y, Xu J, Zhou C* (2005) Characterization of cytokine/chemokine profiles of severe acute respiratory syndrome. Am J Respir Crit Care Med 171(8): 850–857.
https://doi.org/10.1164/rccm.200407-857OC
19. *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* (2020) Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet 395: 497–506.
https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5
20. *Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, Haberecker M, Anermatt R, Zinkernagel A, Mehra MR, Schuepbach RA, Ruschitzka F* (2020) Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. Lancet 395: 1417–1418.
https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30937-5
21. *Bhattacharya S, Agarwal S, Shrimali N, Guchhai P* (2021) Interplay between hypoxia and inflammation contributes to the progression and severity of respiratory viral diseases. Mol Aspects Med 19: 101000.
https://doi.org/10.1016/j.mam.2021.101000
22. *Tobin MJ* (2020) Basing respiratory management of coronavirus on physiological principles. Am J Respir Crit Care Med 201(11): 1319–1320.
https://doi.org/10.1164/rccm.202004-1076ED
23. *Dhont S, Eric Derom E, Braeckel EV, Depuydt P, Lambrecht BN* (2020) The pathophysiology of "happy" hypoxemia in COVID-19. Respirat Res 21: 198.
https://doi.org/10.1016/j.mam.2021.101000
24. *Bein T, Grasso S, Moerer O, Quintel M, Guerin C, Deja M, Brondani M, Mehta S* (2016) The standard of care of patients with ARDS: ventilatory settings and rescue therapies for refractory hypoxemia. Intensive Care Med 42: 699–711.
https://doi.org/10.1007/s00134-016-4325-4
25. *Wilkerson RG, Adler JD, Shah NG, Brown R* (2020) Silent hypoxia: a harbinger of clinical deterioration in patients with COVID-19. Am J Emerg Med 38(10): 2243.
https://doi.org/10.1016/j.ajem.2020.05.044
26. *Levitan R* (2020) The infection that's silently killing coronavirus patients. The New York Times Apr 20.
27. *Philip K, Bennett B, Fuller S, Lonergan B, McFadyen C, Burns J, Tidswell R, Vlachou A* (2020) Working accuracy of pulse oximetry in COVID-19 patients stepping down from intensive care: a clinical evaluation. BMJ Open Respir Res 7(1): 000778.
https://doi.org/10.1136/bmjresp-2020-000778
28. *Roe PG, Jones JG* (1993) Analysis of factors which affect the relationship between inspired oxygen partial pressure and arterial oxygen saturation. Br J Anaesth 71: 488–494.
https://doi.org/10.1093/bja/71.4.488
29. *Hamilton C, Steinlechner B, Gruber E, Simon P, Wollenek G* (2004) The oxygen dissociation curve: quantifying the shift. Perfusion 19: 141–144.
https://doi.org/10.1191/0267659104pf734oa
30. *Woyke S, Rauch S, Strohle M, Gatterer H* (2021) Modulation of Hb-O_2 affinity to improve hypoxemia in COVID-19 patients. Clin Nutr 40: 38–39.
https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.04.036
31. *Ottestad W, Seim M, Mæhlen JO* (2020) COVID-19 with silent hypoxemia. Tidsskr Den Nor Laegeforening 140.
https://doi.org/10.4045/tidsskr.20.0299
32. *Couzin-Frankel J* (2020) The mystery of the pandemic's "happy hypoxia". Science 368(6490): 455–456.
https://doi.org/10.1126/science.368.6490.455
33. *Gattinoni L, Chiumello D, Rossi S* (2020) COVID-19 pneumonia: ARDS or not? Crit Care 24: 154–154.
https://doi.org/10.1186/s13054-020-02880-z
34. *Simonson S, Baker T, Banzett R, Bishop T, Dempsey J, Feldman JL, Guyenet PG, Hodson EJ, Mitchell GS, Moya EA, Nokes BT, Orr JE, Owens RL, Poulin M, Rawling JM, Schmickl CN, Watters JJ, Younes M, Malhotra A* (2021) Silent hypoxaemia in COVID-19 patients. J Physiol 599(4): 1057–1065.
https://doi.org/10.1113/JP280769

35. *Bhatia P, Mohammed S* (2020) Severe Hypoxemia in Early COVID-19 Pneumonia. Am J Respir Crit Care Med 202(4): 621–622.
https://doi.org/10.1164/rccm.202004-1313LE
36. *Nicholls JM, Poon LL, Lee KC* (2003) Lung pathology of fatal severe acute respiratory syndrome. Lancet 361: 1773–1778.
https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13413-7
37. *Tang N, Li D, Wang X, Sun Z* (2020) Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. J Thromb Haemost 18: 844–847.
https://doi.org/10.1111/jth.14768
38. *Liu X, He L, Stensaas L, Dinger B, Fidone S* (2009) Adaptation to chronic hypoxia involves immune cell invasion and increased expression of inflammatory cytokines in rat carotid body. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 296: 158–166.
https://doi.org/10.1152/ajplung.90597.2008
39. *Fung ML* (2015) Expressions of angiotensin and cytokine receptors in the paracrine signaling of the carotid body in hypoxia and sleep apnea. Respir Physiol Neurobiol 209: 6–12.
https://doi.org/10.1016/j.resp.2014.09.014
40. *Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Kruger N, Herrler T, Erichsen S, Schiergens TS, Herrler G, Wu NH, Nitsche A, Muller MA, Drosten C, Pohlmann S* (2020) SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. Cell 181: 271–280.
https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052\
41. *Liu B, Li M, Zhou Z, Guan X, Xiang Y* (2020) Can we use interleukin-6 (IL-6) blockade for coronavirus disease 2019 (COVID-19)-induced cytokine release syndrome (CRS)? J Autoimmun 111: 102452.
https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102452
42. *Manganelli F, Vargas M, Iovino A, Iacovazzo C, Santoro L & Servillo G* (2020). Brainstem involvement and respiratory failure in COVID-19. Neurol Sci 41: 1663–1665.
https://doi.org/10.1007/s10072-020-04487-2
43. *Schultz HD* (2011). Angiotensin and carotid body chemo-reception in heart failure. Curr Opin Pharmacol 11: 144–149.
https://doi.org/10.1016/j.coph.2010.12.004
44. *Hariri LP, North CM, Shih AR, Israel RA, Maley JH, Villalba JA, Vinarsky V, Rubin J, Okin DA, Sclafani A, Alladina JW, Griffith JW, Gillette MA, Raz Y, Richards CJ, Wong AK, Ly A, Hung YP, Chivukula RR, Petri CR, Calhoun TF, Brenner LN, Hibbert KA, Medoff BD, Hardin CC, Stone JR, Mino-Kenudson M* (2021) Lung histopathology in COVID-19 as compared to SARS and H1N1 influenza: a systematic review. Chest 159: 73–84.
https://doi.org/10.1016/j.chest.2020.09.259
45. *Mao L, Jin H, Wang M, Hu Y, Chen S, He Q, Chang J, Hong C, Zhou Y, Wang D, Miao X, Li Y, Hu B* (2020) Neurologic manifestations of hospitalized patients with coronavirus disease 2019 in Wuhan, China. JAMA Neurol 77: 683–690.
https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.1127
46. *Moriguchi T, Harii N, Goto J, Harada D, Sugawara H, Takamino J, Ueno M, Sakata H, Kondo K, Myose N, Nakao A, Takeda M, Haro H, Inoue O, Suzuki-Inoue K, Kubokawa K, Ogihara S, Sasaki T, Kinouchi H, Kojin H, Ito M, Onishi H, Shimizu T, Sasaki Y, Enomoto N, Ishihara H, Furuya S, Yamamoto T, Shimada S* (2020) A first case of meningitis/encephalitis associated with SARS-Coronavirus-2. Int J Infect Dis 94: 55–58.
https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.062
47. *Paniz-Mondolfi A, Bryce C, Grimes Z, Gordon RE, Reidy J, Lednicky J, Sordillo EM, Fowkes M* (2020) Central nervous system involvement by severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2). J Med Virol 92: 699–702.
https://doi.org/10.1002/jmv.25915
48. *McCray PB Jr, Pewe L, Wohlford-Lenane C, Hickey M, Manzel L, Shi L, Netland J, Jia HP, Halabi C, Sigmund CD, Meyerholz DK, Kirby P, Look DC, Perlman S* (2007) Lethal infection of K18-hACE2 mice infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus. J Virol 81(2): 813–821.
https://doi.org/10.1128/JVI.02012-06
49. *Netland J, Meyerholz DK, Moore S, Cassell M, Perlman S* (2008). Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection causes neuronal death in the absence of encephalitis in mice transgenic for human ACE2. J Virol 82: 15: 7264–7275.
https://doi.org/10.1128/JVI.00737-08
50. *Li K, Wohlford-Lenane C, Perlman S, Zhao J, Jewell AK, Reznikov LR, Gibson-Corley KN, Meyerholz DK, McCray PB Jr* (2016) Middle east respiratory syndrome coronavirus causes multiple organ damage and lethal disease in mice transgenic for human dipeptidyl peptidase 4. J Infect Dis 213(5): 712–722.
https://doi.org/10.1093/infdis/jiv499

51. *Talbot PJ, Ekandé S, Cashman NR, Mounir S, Stewart JN* (1993) Neurotropism of human coronavirus 229E. Adv Exp Med Biol 342: 339–346.
https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2996-5_52
52. *Glass WG, Subbarao K, Murphy B, Murphy PM* (2004) Mechanisms of host defense following severe acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) pulmonary infection of mice. J Immunol 173: 4030–4039.
https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.6.4030
53. *Li YC, Bai WZ, Hirano N, Hayashida T, Hashikawa T* (2012) Coronavirus infection of rat dorsal root ganglia: ultrastructural characterization of viral replication, transfer, and the early response of satellite cells. Virus Res 163(2): 628–635.
https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.12.021
54. *Jia HP, Look DC, Shi L, Hickey M, Pewe L, Netland J, Farzan M, Wohlford-Lenane C, Perlman S, McCray PB Jr* (2005) ACE2 receptor expression and severe acute respiratory syndrome coronavirus infection depend on differentiation of human airway epithelia. J Virol 79(23): 14614–14621.
https://doi.org/10.1128/JVI.79.23.14614-14621.2005
55. *Klok FA, Kruip MJHA, van der Meer NJM, Arbous MS, Gommers DAMPJ, Kant KM, Kaptein FHJ, Paassen J, Stals MAM, Huisman MV, Endeman H* (2020) Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. Thromb Res 191: 145–147.
https://doi.org/10.1016/j.thromres.2020.04.013
56. *Wichmann D, Sperhake J-P, Lütgehetmann M, Steurer S, Edler C, Heinemann A, Heinrich F, Mushumba H, Kniep I, Schröder AN, Burdelski C, Heer G, Nierhaus A, Frings D, Pfefferle S, Becker H, Bredereke-Wiedling H, Weerth A, Paschen HR, Sheikhzadeh-Eggers S, Stang A, Schmiedel S, Bokemeyer C, Addo MM, Aepfelbacher M, Püschel K, Kluge S, Less S* (2020) Autopsy findings and venous thromboembolism in patients with COVID-19: a prospective cohort study. Ann Intern Med 173(4): 268–277.
https://doi.org/10.7326/M20-2003
57. *Eriksson O, Hultström M, Persson B, Lipcsey M, Ekdahl KN, Nilsson B, Frithiof R* (2020) Mannose-binding lectin is associated with thrombosis and coagulopathy in critically ill COVID-19 patients. Thrombosis and Haemostasis 120(12): 1720–1724.
https://doi.org/10.1055/s-0040-1715835
58. *Lee KY* (2017) Pneumonia, acute respiratory distress syndrome, and early immune-modulator therapy. Int J Mol Sci 18: 388.
https://doi.org/10.3390/ijms18020388
59. *Sarkar M, Niranjan N, Banyal PK* (2017) Mechanisms of hypoxemia. Lung India 34(1): 2–15.
https://doi.org/10.4103/0970-2113.197116
60. *Khomich OA, Kochetkov SN, Bartosch B, Ivanov AV* (2018) Redox biology of respiratory viral infections. Viruses 10(8): 392.
https://doi.org/10.3390/v10080392
61. *Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, Haverich A, Welte T, Laenger F, Vanstapel A, Werlein C, Stark H, Tzankov A, Li WW, Li VW, Mentzer SJ, Jonigk D* (2020). Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. N Engl J Med 383(2): 120–128.
https://doi.org/10.1056/NEJMoa2015432
62. *Cloonan SM, Choi AM* (2016) Mitochondria in lung disease. J Clin Invest 126(3): 809–820.
https://doi.org/10.1172/JCI81113
63. *Wenzhong L, Hualan L* (2020) COVID-19 Disease: ORF8 and surface glycoprotein inhibit heme metabolism by binding to porphyrin. ChemRxiv Preprint.
https://doi.org/10.26434/chemrxiv.11938173
64. *Cavezzi A, Troiani E, Corrao S* (2020) COVID-19: hemoglobin, iron, and hypoxia beyond inflammation. A narrative review. Clin Pract 10(2): 1271.
https://doi.org/10.4081/cp.2020.1271
65. *Cloonan SM, Choi AM* (2016) Mitochondria in lung disease. J Clin Invest 126(3): 809–820.
https://doi.org/10.1172/JCI81113
66. *Dassios T, Curley A, Morley C, Ross-Russell R* (2015) Using measurements of shunt and ventilation-to-perfusion ratio to quantify the severity of bronchopulmonary dysplasia. Neonatology 107(4): 283–288.
https://doi.org/10.1159/000376567
67. *D'Alonzo GE, Dantzker DR* (1983) Respiratory failure, mechanisms of abnormal gas exchange, and oxygen delivery. Med Clin North Am 67: 557–571.
https://doi.org/10.1016/S0025-7125(16)31189-0
68. *West JB* (2008) Respiratory physiology – the essentials. 9th ed. Baltimore: Lippincott Williams&Wilkins.
69. *Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, Haverich A, Welte T, Laenger F, Vanstapel A, Werlein C, Stark H, Tzankov A, Li WW, Li VW, Mentzer SJ, Jonigk D* (2020) Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in Covid-19. N Engl J Med 383: 120–128.
https://doi.org/10.1056 / NEJMoa2015432

70. *Nouri-Vaskeh M, Sharifi A, Khalili N, Zand R, Sharifi A* (2020) Dyspneic and non-dyspneic (silent) hypoxemia in COVID-19: possible neurological mechanism. Clin Neurol Neurosurg 198: 106217.
https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2020
71. *Wichmann D, Sperhake J-P, Lütgehetmann M, Steurer S, Edler C, Heinemann A, Heinrich F, Mushumba H, Kniep I, Schröder AN, Burdelski C, Heer G, Nierhaus A, Frings D, Pfefferle S, Becker H, Bredereke-Wiedling H, Weerth A, Paschen HR, Sheikhzadeh-Eggers S, Stang A, Schmiedel S, Bokemeyer C, Addo MM, Aepfelbacher M, Püschel K, Kluge S, Less S.* (2020) Autopsy findings and venous thromboembolism in patients with COVID-19: a prospective cohort study. Ann Intern Med 173 (4): 268–277.
https://doi.org/10.7326/M20-2003
72. *Mahjoub Y, Rodenstein DO, Jounieaux V* (2020) Severe Covid-19 disease: rather AVDS than ARDS? Crit Care 24: 327.
https://doi.org/10.1186/s13054-020-02972-w

Causes of Hypoxemia in COVID-19

Zh. A. Donina*

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

The global pandemic of a new coronavirus disease (COVID-19) has set tasks for healthcare professionals around the world related to the diagnosis, intensive study of the epidemiological and clinical features of the course of coronavirus infection, the development of prevention, therapeutic approaches to treatment methods and rehabilitation measures. But despite the progress made in studying the pathogenesis of COVID-19, many aspects that aggravate the severity of the disease and the high mortality of patients remain unclear. The main clinical manifestation of the new variant of SARS-CoV-2 viral infection is pneumonia with massive parenchymal lesion of the lung tissue, diffuse alveolar damage to the alveoli, thrombotic manifestations, violation of ventilation-perfusion relations, etc. However, the symptoms in patients hospitalized with COVID-pneumonia have significant differences: most of the disease proceeds with minimal manifestations, others develop severe respiratory failure complicated by the development of acute respiratory distress syndrome (ARDS) with rapidly progressive hypoxemia, leading to high mortality. Numerous publications of clinicians report that an extremely low level of saturation was registered in some patients with COVID-pneumonia without subjective signs of severe respiratory failure (shortness of breath, air “hunger”). As a result, a situation arises that has received the names “silent hypoxia”, “silent hypoxia”, “happy hypoxia”, contrary to the basics of physiology – severe hypoxemia, incompatible with life and the absence of sensations of respiratory discomfort. All this raises numerous questions from doctors, which has led to a wide discussion in scientific publications covering the pathogenesis of COVID-19. Respiratory failure is a complex clinical problem, many aspects of which remain controversial. However, according to the majority of authors, one of the objective indicators of a clinical sign of respiratory insufficiency, first of all, are changes in external respiration associated with hypoxemia. This review considers some possible causes of hypoxemia in COVID-19.

Keywords: coronavirus infection (SARS-CoV-2), cytokine storm, hypoxemia, acute respiratory failure

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2022, том 108, № 1, с. 13–23

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ОДНОСТОРОННЯЯ ХРОНИЧЕСКАЯ ИШЕМИЯ ОБЛАСТИ КАРОТИДНЫХ ТЕЛЕЦ ИЗМЕНЯЕТ АКТИВНОСТЬ СИМПАТИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

© 2022 г. М. А. Марков[1, *], М. П. Давыдова[1]

[1]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, Москва, Россия

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

Поступила в редакцию 13.09.2021 г.
После доработки 27.09.2021 г.
Принята к публикации 27.09.2021 г.

Хорошо известно, что активация хеморецепторов каротидных телец, являющихся сенсорами уровня кислорода в плазме крови, может приводить к активации симпатической нервной системы, а хроническая активация каротидных телец вследствие гипоксии способствует развитию различных заболеваний сердечно-сосудистой системы. В литературе показано, что двусторонняя активация каротидных телец снижает чувствительность хронотропного барорефлекса, при этом в случае последующей двусторонней абляции его чувствительность восстанавливается. В настоящей работе показано, что в случае односторонней хронической ишемизации каротидных телец при перевязке наружной сонной артерии у крыс происходит снижение чувствительности хронотропного барорефлекса, а в случае одностороннего удаления каротидных телец – увеличение чувствительности. На системном уровне в случае одностороннего удаления каротидных телец снижение активности симпатической нервной системы подтверждается также снижением уровня глюкозы. Полученные результаты показывают, что системные изменения в работе симпатической нервной системы происходят уже при односторонней гиперактивации или инактивации каротидных телец.

Ключевые слова: каротидные тельца, симпатическая нервная система, крысы, хронотропный барорефлекс

DOI: 10.31857/S0869813922010095

Активация хеморецепторов каротидных телец приводит к разнообразным существенным сдвигам в гемодинамике. Следствием длительного изменения состояния каротидных телец могут быть хронические заболевания сердечно-сосудистой системы, например, артериальная гипертензия [1]. Ранее нами было показано, что у пациентов с односторонней гемодинамически значимой атеросклеротической бляшкой (перекрывающей более 75% просвета сосуда) в области бифуркации общей сонной артерии чаще встречаются признаки легочной гипертензии [2]. Кроме того, у таких пациентов имеется тенденция к увеличению уровня глюкозы в плазме крови, что может говорить о повышении активности симпатической нервной системы при данном состоянии. Среди возможных причин можно выделить коморбидность данных пациентов (наличие заболеваний, которые могут приводить к развитию легочной гипертензии и повышению уровня глюкозы, таких как артериальная гипертензия, сахарный диабет, хроническая сердечная недостаточность),

ишемию головного мозга, которая может привести к активации симпатической нервной системы, ишемию рецепторов зоны каротидных телец. В связи с необходимостью дифференцировать данные причины были проведены соответствующие эксперименты на крысах, не страдающих сопутствующими заболеваниями.

Хорошо известно, что за счет каротидных телец может быстро изменяться состояние симпатической нервной системы. Они являются высокочувствительными сенсорами уровня кислорода в плазме крови и активируются при снижении его парциального давления. Подобные вегетативные рефлексы направлены на компенсацию состояния гипоксии, поэтому при активации каротидных телец повышается активность симпатической нервной системы: увеличивается частота сердечных сокращений (ЧСС) и частота дыхания. В литературе показано хроническое влияние гиперактивации и инактивации каротидных телец на состояние симпатической нервной системы. Alzahrani с соавт. в 2021 г. опубликовали исследование, показывающее роль хронической активации каротидных телец в модели ночного апноэ [3]. Экзогенная пароксизмальная гипоксия (8 циклов по 15 с с 5%-ным содержанием кислорода в воздухе каждый час по 8 ч в день в течение трех недель) вызывала активацию каротидных телец, что в свою очередь приводило к выбросу адреналина надпочечниками. В связи с тем, что на каротидных тельцах имеются β-адренорецепторы, выброс адреналина замыкал положительную обратную связь – активация каротидных телец происходила не вследствие гипоксии, а вследствие действия симпатической нервной системы. Моделирование ночного апноэ на фоне пропранолола (β-адреноблокатора) снижало активность симпатической нервной системы и выраженно уменьшало фоновую частоту импульсации от изолированных каротидных телец.

Влияние активации каротидных телец продемонстрировано также в статье Del Rio с соавт. [4]. В ней показано, что двустороннее селективное удаление каротидных телец снижает тяжесть течения хронической сердечной недостаточности, что подтверждает важную роль каротидных телец при заболеваниях, связанных с активацией симпатической нервной системы. Стоит отметить, что во всех случаях исследовались модели хронической гипоксии, при которых имеет место хроническая двусторонняя активация каротидных телец.

Sugito с соавт. проводили эксперименты на крысах, оценивая влияние односторонней гипоксии каротидных телец на состояние легочных артерий в остром эксперименте [5]. В условиях альвеолярной нормоксии крысам стимулировали каротидные тельца с одной стороны, вводя цианид натрия, который вызывает местную тканевую гипоксию. Это приводило к транзиторному значимому повышению легочного артериального давления. При этом такая же стимуляция каротидных телец после односторонней денервации (перерезки ветвей языкоглоточного нерва) не приводила к изменениям в легочных артериях, что доказывает их рефлекторную природу. Однако данный эксперимент иллюстрирует лишь острые эффекты от односторонней гиперактивации каротидных телец. В литературе не представлено данных о длительном влиянии односторонней ишемии каротидных телец на состояние симпатической нервной системы, что делает заявленную тему интересной и актуальной.

Целью настоящей работы явилась оценка системных эффектов – чувствительности барорефлекса и уровня глюкозы в плазме крови у крыс с хронической гиперактивацией и инактивацией каротидных телец.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Лабораторные животные

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принци-

пам Базельской декларации и рекомендациям биоэтической комиссии ФФМ МГУ им. М.В. Ломоносова. Исследование проводили на самцах белых беспородных крыс (n = 25) массой 150–200 г на время операции в области каротидных телец, 300–400 г во время эксперимента *in vivo*. Животных содержали в условиях вивария с регулируемым режимом освещения (по 12 ч светлого и темного времени в сутки) и со свободным доступом к воде и стандартному корму для грызунов. Крыс рандомизировали по массе в следующие группы: интактный контроль (ИК, n = 9), перевязка наружной сонной артерии (НСА, n = 8), удаление каротидных телец (УКТ, n = 8).

Протокол операции

Крыс наркотизировали хлоралгидратом в дозе 400 мг/кг. Препарат в концентрации 50 мг/мл вводили внутрибрюшинно. Разрез выполняли на шее в месте проекции левой общей сонной артерии, параллельно трахее. Выделяли общую сонную артерию и продвигались в сторону бифуркации сонной артерии для выделения наружной сонной артерии. Затем операция могла идти разными путями в зависимости от экспериментальной группы:

1-й вариант – крысы с перевязанной наружной сонной артерией (группа НСА): выполняли перевязывание наружной сонной артерии сразу после ее отхождения от общей сонной артерии и выше области каротидных телец, а также всех веточек, отходящих от нее между двумя лигатурами. Таким образом, каротидные тельца, оставаясь физически интактными, попадали в условия ишемии.

2-й вариант – крысы с удаленными каротидными тельцами (группа УКТ): выполняли перевязывание наружной сонной артерии так же, как и в первом случае, включая все веточки, отходящие от нее между двумя лигатурами, затем сосудистыми ножницами удаляли область наружной сонной артерии, заключенную между лигатурами.

Измерение гемодинамических параметров и оценка чувствительности барорефлекса

Определение чувствительности барорефлекса проводили на бодрствующих крысах. За сутки до эксперимента крысам ставили два катетера – венозный для введения веществ и артериальный для измерения гемодинамических параметров. Для этого крыс наркотизировали хлоралгидратом (доза 400 мкг/кг, внутрибрюшинно), выделяли бедренную артерию, а также правую наружную яремную вену. В бедренную артерию катетер проводили так, что его кончик находился в брюшном отделе аорты. Свободные концы катетеров проводили под кожей, выводили на холке и закрепляли.

Во время эксперимента свободный конец артериального катетера присоединяли к датчику давления (тензодатчик STATHAM, США), а венозного – к инсулиновым шприцам, содержащим растворы. С помощью аналогово-цифрового преобразователя сигнал регистрировали на компьютере, использовали частоту оцифровки 100 Гц. По волнам пульсового давления автоматически высчитывалась ЧСС.

В качестве веществ для оценки кардиобарорефлекса использовали донор оксида азота нитропруссид натрия (SNP), а также α_1-адреномиметик фенилэфрин.

Во избежание тромбоза артериального и венозного катетеров вводили раствор гепарина натрия – 20 мкл, 50 МЕ/мл (компания ОАО “Синтез”, Россия, 5000 МЕ/мл). Промышленный препарат разводили 0.9%-ным раствором NaCl.

После присоединения катетеров крысы адаптировались к условиям эксперимента. Через час отмечали уровень артериального давления и ЧСС как начальный уровень до введения препаратов. После этого вводили раствор вазодилататора – SNP (1.5 мкг/мл, на 0.9%-ном растворе NaCl, в объеме 50 мкл) и отмечали значения максимального снижения артериального давления и максимального увеличения

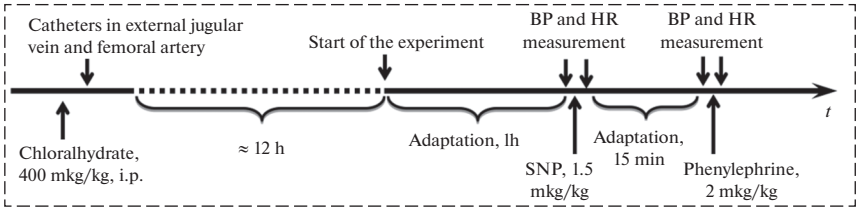


Рис. 1. Протокол эксперимента по определению чувствительности барорефлекса и измерению гемодинамических параметров.

ЧСС в результате срабатывания симпатического звена барорефлекса. После введения SNP ждали до восстановления исходных значений артериального давления и ЧСС. Через 15 мин от введения донора оксида азота снова отмечали уровень артериального давления и ЧСС. Затем вводили фенилэфрин (2 мкг/мл на 0.9%-ном растворе NaCl, в объеме 50 мкл) и регистрировали увеличение артериального давления в ответ на адреномиметик и рефлекторное снижение ЧСС вследствие активации парасимпатической нервной системы. Протокол эксперимента представлен на рис. 1. Чувствительность барорефлекса рассчитывали как отношение разниц среднего артериального давления и ЧСС до и после введения веществ ($S = |\Delta ЧСС|/|\Delta СрАД|$).

Измерение уровня глюкозы крови

Взятие крови для измерения уровня глюкозы проводили за сутки до операции по установке катетеров. До этого крыс лишали корма на 6 ч дневного времени, то есть на время наименьшей активности животных.

Измерение уровня глюкозы крови у крыс проводили с помощью глюкометра “OneTouch Select Plus, Lifescan Europe” (Швейцария). Бодрствующим крысам ножницами надрезали конец хвоста, чтобы взять кровь из русла хвостовой артерии. Каплю крови наносили на датчик глюкометра.

Статистическая обработка результатов

Для обработки данных использовали пакет программ STATISTICA 10 (Stat Soft Inc). Данные представлены в виде медиан и квартилей (верхнего и нижнего), так как распределение во всех группах не являлось нормальным. Для оценки распределения на нормальность использовали критерий Колмогорова–Смирнова. Для статистического анализа использовали тест Манна–Уитни для сравнения независимых групп. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты измерений гемодинамических параметров

Для оценки системных проявлений односторонней ишемизации и одностороннего удаления каротидных телец были проведены измерения среднего артериального давления, ЧСС и показателей барорефлекса. Медиана среднего артериального давления у интактных крыс составила 113.2 мм рт. ст. (нижний квартиль – 105.6 мм рт. ст., верхний квартиль – 120.2 мм рт. ст.), у оперированных с перевязанной наружной сонной артерией – 109.4 мм рт. ст. (нижний квартиль – 105.1 мм рт. ст., верхний квартиль – 114.4 мм рт. ст.), у крыс с удаленными каротидными тельцами – 109.1 мм рт. ст. (нижний квартиль – 104.9 мм рт. ст., верхний квартиль – 112.2 мм рт. ст.). Значимых отличий между данными группами обнаружено не было, хотя прослеживались некоторая тенденция к снижению СрАД у обеих групп оперированных крыс (рис. 2).

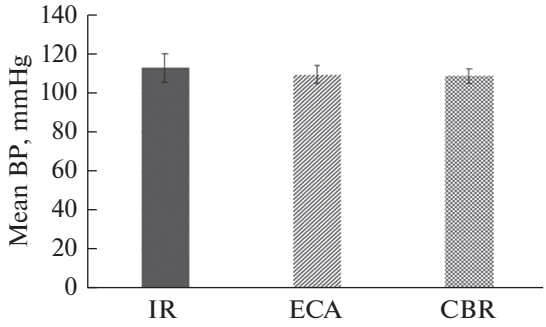


Рис. 2. Среднее артериальное давление у бодрствующих крыс в состоянии покоя: интактных крыс (IR), крыс с перевязкой наружной сонной артерии (ECA) и крыс с удаленными каротидными тельцами (CBR).

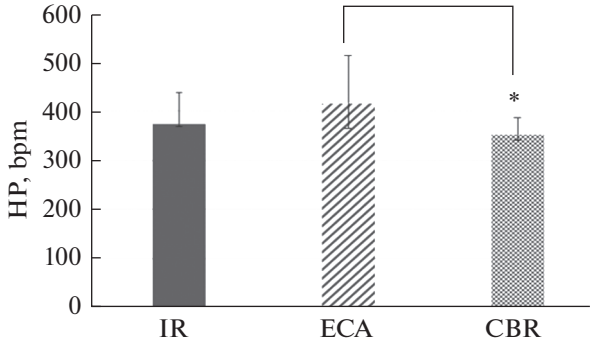


Рис. 3. Частота сердечных сокращений у интактных крыс (IR), крыс с перевязкой наружной сонной артерии (ECA) и крыс с удаленными каротидными тельцами (CBR) в состоянии покоя * – $p < 0.05$ по сравнению с группой ECA.

Медиана ЧСС у интактных крыс составила 374.0/мин (нижний квартиль – 370.0/мин, верхний квартиль – 435.0/мин), у крыс с перевязкой наружной сонной артерии – 416.0/мин (нижний квартиль – 365.5/мин, верхний квартиль – 464.4/мин), в группе с удаленными каротидными тельцами – 351.8/мин (нижний квартиль – 341.5/мин, верхний квартиль – 377.6/мин). Значимых отличий по ЧСС между интактным контролем и оперированными группами также обнаружено не было, хотя имелась некоторая тенденция к повышению ЧСС в группе с перевязкой наружной сонной артерии и тенденция к понижению ЧСС в группе с удаленными каротидными тельцами, так что имеет место статистически значимая разница между группой с перевязкой наружной сонной артерии и группой с удалением каротидных телец (рис. 3).

Таким образом, основные гемодинамические параметры большого круга кровообращения у оперированных крыс практически не изменились по сравнению с контролем.

После введения донора оксида азота среднее артериальное давление в группе интактных крыс упало в среднем на 13.45%, а ЧСС возросла на 12.40%. Медиана чувствительности барорефлекса *S* для нитропруссида натрия в этой группе соста-

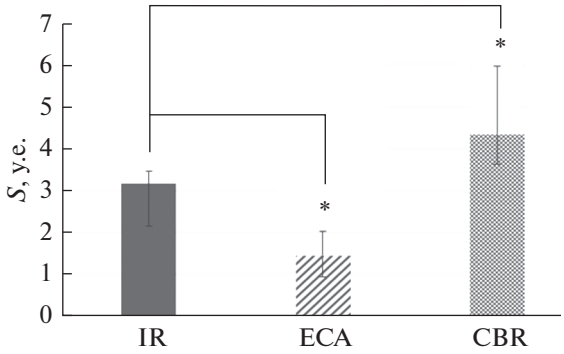


Рис. 4. Чувствительность барорефлекса S при введении нитропруссида натрия у интактных крыс (IR), крыс с перевязкой наружной сонной артерии (ECA) и крыс с удалением каротидных телец (CBR). * – $p < 0.05$ по сравнению с группой IR.

вила 3.16 (нижний квартиль – 2.15, верхний квартиль – 3.47). В группе с перевязкой наружной сонной артерии давление упало в среднем на 21.45%, а ЧСС возросла на 9.61%. Медиана чувствительности барорефлекса *S* в этом случае составила 1.45 (нижний квартиль – 0.94, верхний квартиль – 2.03). Разница в чувствительности барорефлекса по SNP в этих двух группах оказалась значимой ($p < 0.05$), то есть ответ в виде изменения ЧСС на снижение артериального давления в интактной группе был более выражен, чем в группе с перевязкой наружной сонной артерии. В группе с удалением каротидных телец среднее артериальное давление упало в среднем на 14.14%, а ЧСС выросло в среднем на 19.20%. Медиана чувствительности барорефлекса в этой группе составила 1.03 (нижний квартиль – 0.44, верхний квартиль – 2.32). Разница в чувствительности барорефлекса между этой группой и группой интактного контроля также оказалась значимой ($p < 0.05$), то есть ответ в виде изменения ЧСС на падение давления в интактной группе был менее выражен, чем в группе с удалением каротидных телец (рис. 4).

После введения α_1-адреномиметика фенилэфрина среднее артериальное давление в группе интактных крыс возросло в среднем на 19.41%, а ЧСС упала на 7.20%. Медиана чувствительности барорефлекса по фенилэфрину в этой группе составила 0.95 (нижний квартиль – 0.75, верхний квартиль – 2.60). В группе с перевязкой наружной сонной артерии давление возросло в среднем на 13.36%, а ЧСС упала на 4.77%. Медиана чувствительности барорефлекса в данной группе составила 1.48 (нижний квартиль – 0.10, верхний квартиль – 3.38). В группе с удалением каротидных телец среднее артериальное давление после введения фенилэфрина в среднем возросло на 32.85%, а ЧСС упала на 13.07%. Медиана чувствительности барорефлекса по фенилэфрину в данной группе составила 1.03 (нижний квартиль – 0.44, верхний квартиль – 2.32). Разница в чувствительности барорефлекса по фенилэфрину между оперированными группами и контрольной группой оказалась незначимой, то есть изменение ЧСС в результате роста давления практически одинаково в интактной группе и группах с удалением каротидных телец или их ишемизацией (рис. 5).

Таким образом, изменения чувствительности хронотропного барорефлекса были обнаружены только при увеличении ЧСС в ответ на навязанное снижение артериального давления.

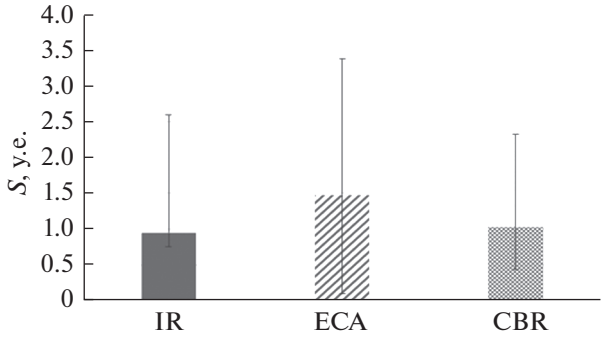


Рис. 5. Чувствительность барорефлекса *S* при введении фенилэфрина у интактных крыс (IR), крыс с перевязкой наружной сонной артерии (ECA) и крыс с удаленными каротидными тельцами (CBR).

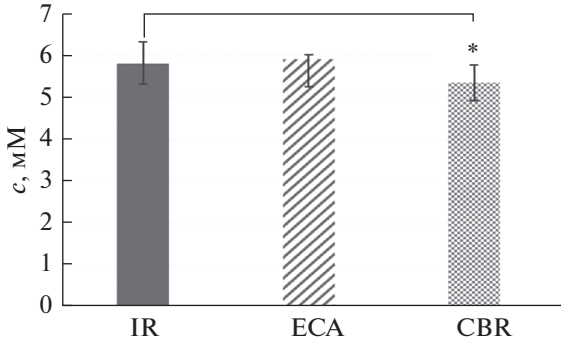


Рис. 6. Уровень глюкозы натощак в плазме крови интактных крыс (IR), крыс с перевязкой наружной сонной артерии (ECA) и крыс с удаленными каротидными тельцами (CBR). * – $p < 0.05$ по сравнению с группой IR.

Результаты измерения уровня глюкозы крови

Еще один системный эффект, сопряженный с односторонним изменением активности каротидных телец, был выявлен при измерении уровня глюкозы. Медиана уровня глюкозы плазмы крови натощак у интактных крыс составила 5.8 ммоль/л (нижний квартиль – 5.3 ммоль/л, верхний квартиль – 6.3 ммоль/л), у крыс с перевязанной наружной сонной артерией – 5.9 ммоль/л (нижний квартиль – 5.3 ммоль/л, верхний квартиль – 6.0 ммоль/л), у крыс с удаленными каротидными тельцами – 5.4 ммоль/л (нижний квартиль – 4.9 ммоль/л, верхний квартиль – 5.8 ммоль/л). Результаты измерений в группе интактного контроля и группе с перевязкой наружной сонной артерии не отличались, однако были обнаружены статистически значимые различия между группой интактного контроля и группой с удаленными каротидными тельцами: уровень глюкозы в группе с удаленными каротидными тельцами значимо ниже, чем в группе интактного контроля (см. рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По нашим данным [6] односторонняя ишемизация каротидных телец у крыс может быть независимым фактором развития легочной гипертензии, что ставит во-

прос о том, какие механизмы лежат в основе данного процесса. Возможно, односторонняя ишемизация каротидных телец влечет за собой активацию симпатической нервной системы, что в свою очередь влияет на состояние легочных артерий. Крайне важно отметить, что речь идет лишь об одностороннем воздействии, то есть для реализации процесса достаточно эффектов, запускаемых унилатерально при интактной контрлатеральной бифуркации сонной артерии. В данной работе мы сконцентрировали внимание на обнаружении других возможных эффектов активации симпатической нервной системы при унилатеральном воздействии на каротидные тельца.

Опыты *in vivo* на бодрствующих крысах с оценкой барорефлекса показали, что в ответ на введение SNP симпатическая нервная система активируется значительно менее выражено в группе с перевязкой наружной сонной артерии, чем в контроле, что отражается в меньшей чувствительности симпатического компонента барорефлекса у оперированных крыс. При этом парасимпатический компонент сохраняется на уровне интактного контроля, поскольку изменений в ответе ЧСС на повышение артериального давления фенилэфрином выявлено не было. То есть в случае хронической ишемизации каротидных телец наблюдается подавление эффектов симпатической нервной системы в большом круге кровообращения. Возможно, наблюдаемый системный эффект связан со вторичными изменениями из-за хронической активации симпатической нервной системы. Возможно, на уровне большого круга кровообращения увеличивается интенсивность торможения эффектов симпатической нервной системы – например, за счет пресинаптических α_2-адренорецепторов постганглионарных нейронов. В наших экспериментах мы не рассматриваем возможность проявления эффектов ишемизации головного мозга или уменьшения возбуждения механорецепторов каротидного синуса, так как кровоток по внутренней сонной артерии оставался сохранным.

Наши результаты по изменению чувствительности барорефлекса согласуются с данными, полученными del Rio с соавт. [1]. Этой группой авторов было показано, что частые эпизоды гипоксии в течение месяца при моделировании сонного апноэ приводят к уменьшению чувствительности хронотропного барорефлекса в ответ на введение SNP. При этом последующая абляция каротидных телец восстанавливала чувствительность барорефлекса. Очень важно, что, как и в наших экспериментах, речь идет о хронической активации каротидных телец. Однако в указанных опытах подвергались влиянию каротидные тельца в области бифуркации обеих сонных артерий (и гипоксии, и абляции). В нашем же исследовании речь идет об одностороннем влиянии на каротидные тельца. Опираясь на данные del Rio с соавт., мы предполагаем, что и в нашем случае – при односторонней ишемизации каротидных телец – системные гемодинамические эффекты (изменения чувствительности барорефлекса) являются результатом именно активации каротидных телец на фоне выраженной гипоксии, которая является прямым следствием перевязки наружной сонной артерии, а не их возможной последующей инактивации из-за крайнего ограничения их кровоснабжения.

Уменьшение выраженности эффектов симпатической нервной системы, видимо, не отражается на формировании легочной артериальной гипертензии, так как возможно замыкание патологической обратной связи уже на уровне легочных артерий. Предполагается, что изначальная активация симпатической нервной системы приводит к увеличению тонуса легочных артерий и инициирует их ремоделирование. Данный эффект может реализовываться через различные типы адренорецепторов. В случае активации α_1-адренорецепторов увеличивается внутриклеточный уровень кальция и активируется кальцинейрин, мишенью которого является нуклеарный фактор активации Т-лимфоцитов, опосредующий снижение экспрессии калиевых потенциалзависимых каналов клеточной мембраны гладкомышечной

клетки. При этом также снижается реполяризация мембраны, что приводит к увеличению внутриклеточного уровня кальция, тем самым замыкается положительная обратная связь. Митогенный эффект ионов кальция усиливает ремоделирование легочных артерий [7]. Еще одним фактором, способным оказать влияние на формирование легочной гипертензии, является гипоксия-индуцированный фактор (HIF), который фосфорилируется протеинкиназой А, чья активность повышается при активации β-адренорецепторов. Механизм действия HIF в данном случае сходен с механизмом работы нуклеарного фактора активации Т-лимфоцитов [8, 9].

В группе с удалением каротидных телец наблюдается противоположный эффект. Чувствительность парасимпатического компонента барорефлекса вновь остается неизменной по сравнению с интактным контролем, однако чувствительность симпатического компонента барорефлекса оказывается значимо выше, чем в группе интактного контроля и гораздо выше, чем в группе с перевязкой наружной сонной артерии, и это говорит о том, что в хроническом эксперименте наблюдается большая, чем в норме чувствительность симпатической нервной системы к изменению давления в большом круге кровообращения. Таким образом, эффект одностороннего удаления каротидных телец также связан с симпатической нервной системой, но противоположен эффекту ишемизации каротидных телец в области бифуркации одной из сонных артерий.

Системные сдвиги активности симпатической нервной системы заметны и при оценке уровня глюкозы. Стоит отметить, что даже этот крайне зависимый от различных параметров показатель оказался существенно снижен в группе с удалением каротидных телец. В целом, оцениваемые нами системные эффекты нервного и гуморального характера говорят об уменьшении активности симпатической нервной системы при одностороннем удалении каротидных телец (хотя при этом увеличивается чувствительность эффекторного звена – сердца – к действию медиаторов симпатических нервных окончаний). С другой стороны, мы наблюдали некоторую тенденцию к увеличению уровня глюкозы в группе с ишемизацией каротидных телец, и это совпадает с нашим изначальным предположением об увеличении активности симпатической нервной системы в данной группе на основании результатов измерений гемодинамических параметров. На увеличение активности симпатической нервной системы в группе с ишемизацией каротидных телец указывает также и более высокий базовый уровень ЧСС (по сравнению с группой с удалением каротидных телец). Полученные результаты в группе с ишемизацией каротидных телец согласуются с таковыми у пациентов: в случае наличия бляшки в области бифуркации общей сонной артерии существует тенденция к увеличению уровня глюкозы в крови по сравнению с теми, у кого этой бляшки нет [2].

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнялась в рамках программы исследований патофизиологии легочной гипертензии, запланированных в МГУ им. М.В. Ломоносова.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея и планирование эксперимента (М.П.Д. и М.А.М.), сбор данных (М.А.М.), обработка данных (М.П.Д.), написание и редактирование манускрипта (М.А.М. и М.П.Д.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Del Rio R, Andrade DC, Lucero C, Arias P, Iturriaga R* (2016) Carotid body ablation abrogates hypertension and autonomic alterations induced by intermittent hypoxia in rats. Hypertension 68(2): 436–445.
https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07255
2. *Марков МА, Давыдова МП, Усачев ДЮ, Лукшин ВА, Балахонова ТВ, Родненков ОВ, Мартынюк ТВ* (2020) Легочная гипертензия у больных с гемодинамически значимым атеросклеротическим поражением сонной артерии: новые патофизиологические механизмы заболевания. Системные гипертензии 17(2): 61–64. [*Markov MA, Davydova MP, Usachev DU, Lukshin VA, Balakhonova TV, Rodnenkov OV, Martyniuk TV* Pulmonary hypertension in patients with hemodynamically significant atherosclerotic lesion of a common carotid artery: new pathophysiological mechanisms of the disease. Systemic Hypertension 17(2): 61–64. (In Russ)].
https://doi.org/10.26442/2075082X.2020.2.200221
3. *Alzahrani AA, Cao LL, Aldossary HS, Nathanael D, Fu J, Ray CJ, Brain KL, Kumar P, Coney AM, Holmes AP* (2021) β-Adrenoceptor blockade prevents carotid body hyperactivity and elevated vascular sympathetic nerve density induced by chronic intermittent hypoxia. Pflugers Arch 473(1): 37–51.
https://doi.org/10.1007/s00424-020-02492-0
4. *Del Rio R, Andrade DC, Marcus NJ, Schultz HD* (2015) Selective carotid body ablation in experimental heart failure: a new therapeutic tool to improve cardiorespiratory control. Exp Physiol 100(2): 136–142.
https://doi.org/10.1113/expphysiol.2014.079566
5. *Sugito K, Tatsumi K, Igari H, Kasahara Y, Tani T, Kimura H, Hayashi F, Kuriyama T* (1998) Role of carotid body in pressure response of pulmonary circulation in rats. Respir Physiol 111(3): 283–293.
https://doi.org/10.1016/S0034-5687(97)00126-6
6. *Давыдова МП, Марков МА, Тесаков ИП, Сафарова НБ* (2018) Односторонняя ишемия зоны каротидных телец у крыс приводит к развитию легочной гипертензии и изменяет активность симпатической нервной системы. Сб материалов междунар научно-практ конфер Кислород и свободные радикалы. Гродно. Изд-во ГрГМУ Беларусь 40–42. [*Davydova MP, Markov MA, Tesakov IP, Safarova NB* (2018) Unilateral ischemia of the carotid body zone in rats leads to the development of pulmonary hypertension and changes the activity of the sympathetic nervous system. Collection of materials internat scientific and pract conference Oxygen and free radicals. Grodno. GrSMU Publ House Belarus 40–42. (In Russ)].
7. *Bonnet S, Rochefort G, Sutendra G, Archer SL, Haromy A, Webster L, Hashimoto K, Bonnet SN, Michelakis ED* (2007) The nuclear factor of activated T cells in pulmonary arterial hypertension can be therapeutically targeted. Proc Natl Acad Sci U S A 104(27): 11418–11423.
https://doi.org/10.1073/pnas.0610467104
8. *Bullen JW, Tchernyshyov I, Holewinski RJ, DeVine L, Wu F, Venkatraman V, Kass DL, Cole RN, Van Eyk J, Semenza GL* (2016) Protein kinase A-dependent phosphorylation stimulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor 1. Sci Signal 9(430): ra56.
https://doi.org/10.1126/scisignal.aaf0583
9. *Bonnet S, Michelakis ED, Porter CJ, Andrade-Navarro MA, Thébaud B, Bonnet S, Haromy A, Harry G, Moudgil R, McMurtry MS, Weir EK, Archer SL* (2006) An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1alpha-Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension. Circulation 113(22): 2630–2641.
https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.609008

Unilateral Chronic Ischemia of the Carotid Bodies Changes the Activity of the Sympathic Nervous System

M. A. Markov[a], * and M. P. Davydova[a]

[a] *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Fundamental Medicine, Moscow, Russia*
**e-mail: mikhailmarkovffm@gmail.com*

It is well known that activation of carotid body chemoreceptors (sensors of oxygen level in blood plasma) can lead to the sympathetic nervous system activation. Chronic activation of carotid bodies due to hypoxia contributes to the development of various diseases of the cardiovascular system. It has been shown that bilateral activation of carotid bodies reduces the sensitivity of the chronotropic baroreflex, while in the case of subsequent bi-

lateral ablation, its sensitivity is restored. In this work, it is shown that in the case of unilateral chronic ischemia of carotid bodies by ligation of the external carotid artery in rats the sensitivity of the chronotropic baroreflex is decreased, and in the case of unilateral removal of carotid bodies, the sensitivity is increased. At the systemic level, in the case of unilateral removal of carotid bodies, a decrease in the activity of the sympathetic nervous system is confirmed as well by a decrease in glucose levels. The results obtained show that systemic changes in the activity of the sympathetic nervous system occur already with unilateral hyperactivation or inactivation of carotid bodies.

Keywords: carotid bodies, sympathetic nervous system, rats, chronotropic baroreflex

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2022, том 108, № 1, с. 24–35

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ И ВЫЧИСЛИТЕЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ОБШИРНЫХ МЫШЕЧНЫХ СИНЕРГИЙ ПРИ ЛОКОМОЦИЯХ УМЕРЕННОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ

© 2022 г. С. А. Моисеев[1, *], А. М. Пухов[1], Е. А. Михайлова[1], Р. М. Городничев[1]

[1]Великолукская государственная академия физической культуры и спорта, г. Великие Луки, Россия

** E-mail: sergey_moiseev@vlgafc.ru*

Поступила в редакцию 10.09.2021 г.
После доработки 08.10.2021 г.
Принята к публикации 08.10.2021 г.

Современные подходы к изучению двигательных синергий, как правило, включают рассмотрение синергетических эффектов на одном, реже двух уровнях организации нервной системы, и их взаимодействие в контексте решения разнообразных двигательных задач, в том числе локомоций. Однако даже при рассмотрении схожих по биомеханической структуре движений наблюдаются расхождения в некоторых аспектах изучения мышечных синергий, что объясняют применением разных методологических и вычислительных подходов, не учитывающих специфику рассматриваемых двигательных актов. Цель исследования заключалась в поиске оптимальных параметров предварительной обработки электромиографических сигналов и оценке их влияния на результаты извлечения обширных мышечных синергий в процессе локомоций умеренной интенсивности. Исследования выполнены на 10-ти спринтерах мужского пола, которые выполняли бег с умеренной интенсивностью на тредбане. Регистрировали электромиограммы 16-ти поверхностных скелетных мышц туловища, верхних и нижних конечностей. Мышечные синергии извлекали с помощью методов матричной факторизации с применением различных процедур предобработки исходных сигналов. Установлено, что лучшие результаты по извлечению синергий дает применение полосового фильтра в диапазоне 20–450 Гц с использованием после выпрямления дополнительной фильтрации 20 Гц. Количество извлекаемых синергий из разных периодов цикла бегового шага оказалось больше при использовании метода главных компонент и меньше при факторном анализе, а по показателю объясняемой дисперсии оба метода давали лучшие результаты, чем при рассмотрении целого цикла бегового шага. Количество синергий пропорционально снижалось по мере уменьшения количества исходных данных, а качество извлечения синергий снижалось при уменьшении количества анализируемых мышц. Результаты реконструкции исходных электромиографических сигналов методами факторизации данных оказываются более эффективными при рассмотрении различных периодов в сравнении с целым циклом бегового шага. Показатели извлечения мышечных синергий чувствительны к исходному набору электромиограмм, включенных в анализ.

Ключевые слова: мышечные синергии, локомоции, факторный анализ, метод главных компонент, беговой шаг

DOI: 10.31857/S0869813922010101

Современные подходы к изучению двигательных синергий, как правило, включают рассмотрение синергетических эффектов на одном, реже двух уровнях организации нервной системы и их взаимодействие в контексте решения разнообразных двигательных задач, причем, вопрос интеграции разных уровней центральной нервной системы в формировании и координации синергий зачастую упускается. Рассматриваемые произвольные движения человека при изучении синергий чаще всего включают локомоторные модели, задачи постурального контроля и некоторые естественные произвольные движения, выполняемые верхними конечностями. Как правило, для выявления синергетических паттернов взаимодействия скелетных мышц применяют алгоритмы факторизации данных, однако получаемые при их использовании результаты существенно расходятся в некоторых аспектах даже при исследовании схожих по биомеханической структуре двигательных актов [1–4]. Это связывают с тем, что применяются разные методологические и вычислительные подходы, не учитывающие специфику рассматриваемых движений и подчас не имеющие строгой стандартизации [5, 6]. В связи с этим методологическая основа и некоторые вычислительные аспекты изучения синергетических эффектов нуждаются в уточнении и дополнении. Кроме того, такие сведения будут способствовать более глубокому пониманию нейронных механизмов, лежащих в основе управления произвольными движениями человека, и могут быть полезны при решении прикладных вопросов совершенствования специализированных двигательных навыков в спорте. Исходя из этого, цель работы заключалась в поиске оптимальных параметров предварительной обработки электромиографических сигналов и оценке их влияния на результаты извлечения обширных мышечных синергий в процессе локомоций умеренной интенсивности.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании приняли участие 10 испытуемых мужского пола, специализирующихся в спринтерском беге. Эксперименты выполнены на базе Научно-исследовательского института проблем спорта и оздоровительной физической культуры ФГБОУ ВО “ВЛГАФК” в лаборатории физиологии нервной и мышечной систем. Все исследования проведены с соблюдением требований и принципов биомедицинской этики, сформулированными в Хельсинской декларации 1964 г., и одобрены биоэтическим комитетом Великолукской государственной академии физической культуры и спорта. Каждый участник представил добровольное письменное информированное согласие на участие в исследованиях.

Испытуемые выполняли бег на беговой дорожке HP Cosmos (Австрия) с интенсивностью, определяемой диапазоном сердечных сокращений от 140 до 150 уд./мин. Посредством 16-канальной телеметрической системы ME6000 и программного обеспечения MegaWin (MegaElectronics LTD, Финляндия) регистрировали электромиограммы (ЭМГ) 16-ти поверхностных билатеральных мышц туловища, верхних и нижних конечностей: передней большеберцовой, икроножной (медиальная головка), прямой бедра, двуглавой бедра, передней части дельтовидной, выпрямляющей позвоночник (уровень L2), прямой живота (верхняя часть), большой ягодичной. Электромиограф располагался на поясе испытуемого. Регистрацию ЭМГ осуществляли накожными одноразовыми самоклеющимися электродами с токопроводящим гелем с активной площадью контакта 2.5 см^2, 36 × 45 мм (Swaromed, Австрия). Электроды накладывались биполярно, при этом активный располагался в области проекции двигательной точки исследуемой мышцы, а референтный прикреплялся по ходу ее волокон с межэлектродным расстоянием 2 см [7]. Для подавления шумов и повышения чистоты записи ЭМГ предусматривался дополнительный электрод заземления на каждой мышце. Расположение отводящих электродов при регистра-

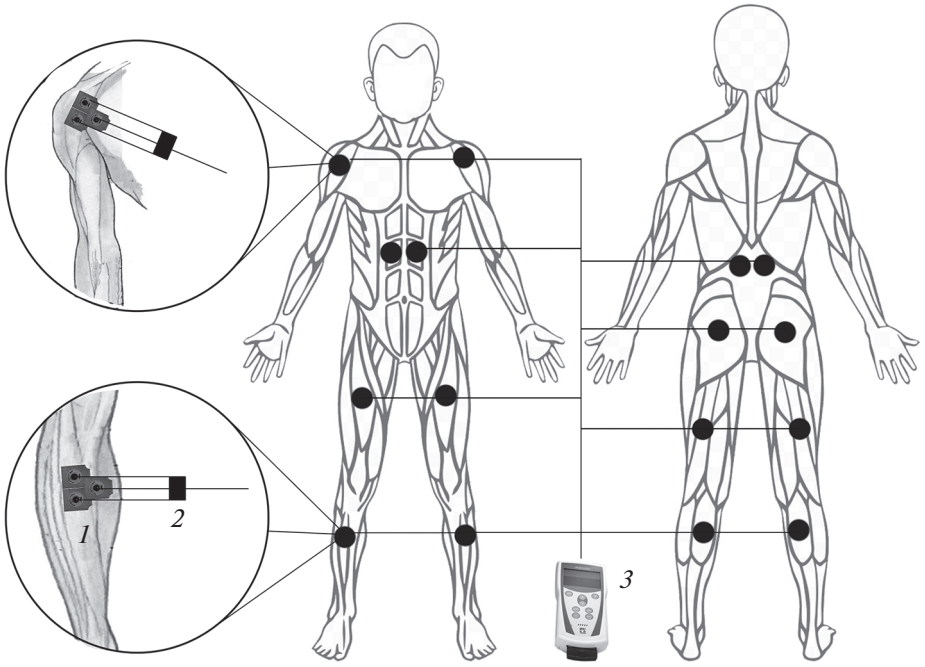


Рис. 1. Схематическое расположение отводящих электродов при регистрации ЭМГ в условиях бега по тредбану с умеренной интенсивностью. *1* – отводящие электроды, *2* – предусилитель, *3* – электромиограф.

ции ЭМГ представлено на рис. 1. ЭМГ-сигналы усиливали биоусилителем (ME 6000) с полосой пропускания частот от 10 до 10000 Гц и оцифровывали с частотой 2000 Гц. Зарегистрированные интерференционные ЭМГ обрабатывались полосовым фильтром с полосой пропускания 25–250 Гц (25–300, 25–450 Гц), силой подавления 60 дБ, затем выпрямлялись с интервалом усреднения 0.002 с и повторно применяли фильтр низких частот (ФНЧ) 80 или 20 Гц, используя программное обеспечение MegaWin. Обработанные ЭМГ экспортировали в систему Statistica (StatSoft, Inc., version 10) для дальнейшего анализа.

Для определения граничных моментов периодов бегового шага использовали систему 3D-видеозахвата “Qualisys” (Qualisys, Швеция), синхронизированную с биомонитором. Она включала 8 высокоскоростных камер Oqus, располагаемых по периметру вокруг испытуемого. Частота кадров видеозахвата составляла 500 Гц. Для регистрации перемещения сегментов тела использовали светоотражающие маркеры, закрепленные на антропометрических точках тела, совпадающих с осями вращения в суставах. Периоды опоры и переноса определялись моментами постановки конечной антропометрической точки правой нижней конечности на ленту тредбана и ее отрыва. Первичную обработку видеоряда осуществляли в программной среде Qualisys Track Manager. Оцифрованные данные, содержащие координаты антропометрических точек сегментов тела в трехмерном пространстве, и маркеры, определяющие граничные моменты периодов бегового шага, экспортировались в систему Statistica.

В системе Statistica формировали матрицу исходных данных (X), размерностью ($I \times J$), где I – нормированное число точек целого цикла бегового шага или его отдельных периодов, а J – число независимых переменных (вариационных рядов

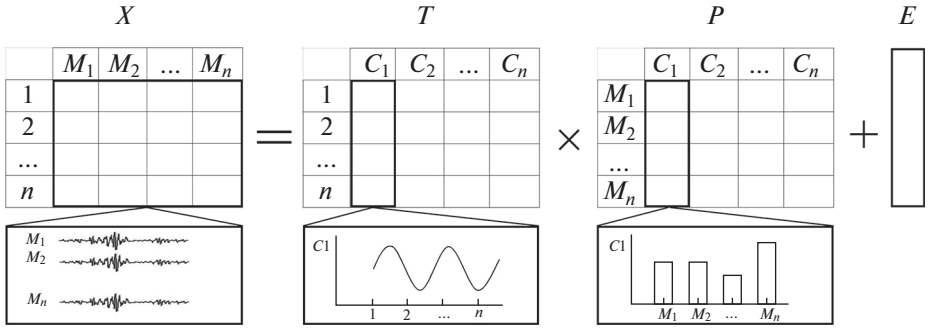


Рис. 2. Схема разложения исходной матрицы методами определения главных компонент. X – исходная матрица, T – матрица счетов, P – матрица нагрузок, E – матрица остатков. M – ЭМГ одной из мышц, C – главный компонент, 1, 2, ... n – значение в момент времени.

ЭМГ и координат антропометрических точек сегментов тела). Координаты точек не использовались в процессе извлечения синергий, а применялись только для соотнесения данных ЭМГ с периодами бегового шага. В общей сложности в анализ были включены данные 150 полных циклов. Методы снижения размерности данных используют новые, формальные переменные, являющиеся линейной комбинацией исходных переменных, с помощью которых исходная матрица X разлагается на произведение двух матриц: $X = T \times P + E$, где T – матрица счетов (“scores”), P – матрица нагрузок (“loadings”), E – матрица остатков (рис. 2). Матрица нагрузок несет информацию о взаимосвязи или независимости переменных относительно новых, формальных переменных, полученных в процессе разложения матриц – “векторы синергии”. Отношение определенной мышцы к выявленной синергии определяли по коэффициенту взаимосвязи, превышающему 0.7.

Матрица счетов (коэффициенты мышечной активации) определяет временную организацию выявленных мышечных синергий. Количество новых компонент (факторов) вычисляется алгоритмами факторного анализа (FA) и метода главных компонент (PCA), а доля объясняемой дисперсии каждым компонентом указывает на качество реконструкции исходных данных. Рассматривали факторы (компоненты), имеющие собственные значения больше единицы и описывающие не менее 10% общей дисперсии. Факторы (компоненты), отвечающие таким требованиям, определяли количество выявленных мышечных синергий в целом цикле бегового шага и его отдельных периодах. Сравнение коэффициентов мышечной активации и векторов синергии при использовании разных методов извлечения синергий осуществляли с помощью анализа значений кросскорреляционных функций с учетом смещения максимума, где 1 – полное соответствие, 0 – отсутствие взаимосвязи.

Математико-статистическая обработка данных выполнена в Statistica 10.0 и включала расчет среднего арифметического (M), ошибки среднего арифметического (m), коэффициента вариации (CV). Для оценки достоверности различий при сравнении параметров в разных условиях использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с Post-Hoc анализом по критерию Newman–Keuls. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исходя из цели работы, были проанализированы параметры компонент при использовании различных методов их извлечения. Установлено, что фильтрация ис-

Таблица 1. Статистические параметры извлекаемых компонент (синергий) при различных режимах фильтрации исходных ЭМГ-сигналов ($n = 150$)

Параметры фильтрации	Стат. параметры	PCA		FA	
		кол-во извлекаемых компонент (ед.)	доля дисперсии (%)	кол-во извлекаемых компонент (ед.)	доля дисперсии (%)
25–250 Гц	$M \pm m$	2.90 ± 0.10	44.70 ± 1.49	5.10 ± 0.10	61.40 ± 0.65
	CV	10.90	10.55	6.20	3.36
25–300 Гц	$M \pm m$	2.80 ± 0.13	43.60 ± 1.84	5.00 ± 0.00	60.20 ± 0.76
	CV	15.06	13.34	0	3.98
25–450 Гц	$M \pm m$	2.80 ± 0.13	43.80 ± 1.87	5.00 ± 0.00	60.70 ± 0.86
	CV	15.06	13.52	0	4.46
25–450 Гц +ФНЧ 80 Гц	$M \pm m$	3.50 ± 0.17	58.10 ± 1.93*	4.90 ± 0.10	68.50 ± 1.21
	CV	15.06	10.53	6.45	5.60
25–450 Гц +ФНЧ 20 Гц	$M \pm m$	4.90 ± 0.41	80.60 ± 2.36*	5.00 ± 0.00	82.90 ± 0.59*
	CV	26.26	9.25	0	2.24

* – достоверность различий относительно данных без повторной фильтрации после выпрямления ЭМГ, $p < 0.05$.

ходных ЭМГ в диапазоне 25–250 (300, 450) Гц существенно не влияла на количество компонент и долю объясняемой дисперсии, однако их величины существенно отличались при использовании разных методов извлечения (табл. 1). Так, методом главных компонент извлекались не более 2.9 компонент (синергий), а доля дисперсии находилась в диапазоне 43.6–44.7%. Факторный анализ показывал 5 синергий с долей дисперсии около 60%. Повторная обработка после усреднения фильтром низких частот 80 Гц достоверно повышала оба показателя при использовании PCA, а при FA существенно не изменилась ($p > 0.05$). Аналогично, с применением ФНЧ 20 Гц возрастало количество извлекаемых компонент PCA и практически не менялось при FA. Доля объясняемой дисперсии в обоих случаях достоверно возрастала и достигала 80% (табл. 1). Таким образом, применение полосового фильтра 25–450 Гц с дополнительной фильтрацией ФНЧ 20 Гц после выпрямления показывало наилучшие результаты по количеству извлекаемых компонент и доли объясняемой дисперсии при использовании как PCA, так и FA.

На рис. 3 представлены образцы ЭМГ поверхностных скелетных мышц в процессе локомоций. В результате применения к исходным данным фильтра 25–450 Гц с повторной фильтрацией ФНЧ 20 Гц электромиограммы фактически представляли собой концентрированные пики активности, однако такая обработка существенно не влияла на среднюю амплитуду ЭМГ. Например, величина ЭМГ-активности передней большеберцовой мышцы правой нижней конечности до фильтрации составляла 71.66 ± 0.82 мкВ, а икроножной медиальной – 85.53 ± 1.58 мкВ. После обработки изменения средней амплитуды ЭМГ названных мышц не превышали 6% ($p > 0.05$). Достоверных различий средней амплитуды ЭМГ в полном цикле беговой шага, а также в периодах опоры и переноса отдельно при использовании различных параметров фильтрации исходных ЭМГ-сигналов зарегистрировано не было.

В различных периодах беговой шага извлеченные мышечные синергии имели некоторые отличия в сравнении их со структурой целого цикла беговой шага. Так, метод главных компонент показывал 6.5 в периоде опоры и 6.2 компонент в периоде переноса (табл. 2). Доля дисперсии в этом случае превышала 90%. Методом факторного анализа извлекалось не более четырех компонент с долей объясняемой дисперсии менее 88%.

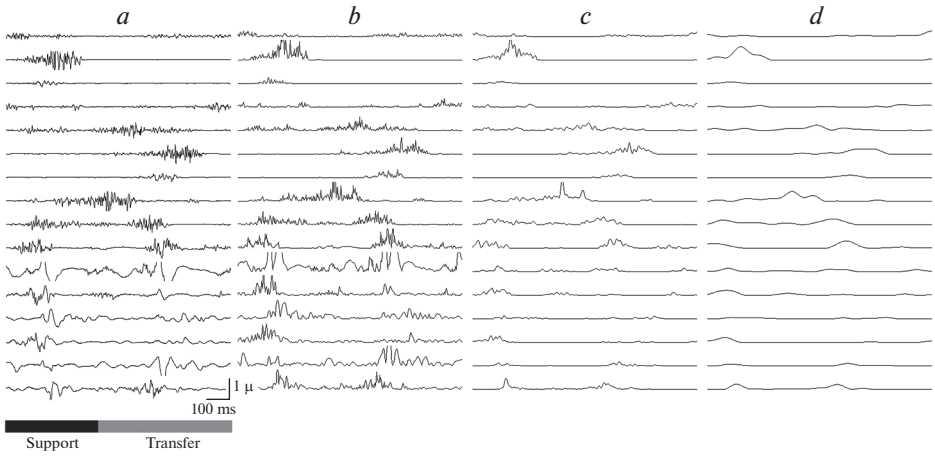


Рис. 3. Образцы ЭМГ скелетных мышц туловища, верхних и нижних конечностей при выполнении локомоций умеренной интенсивности в различных периодах бегового шага. (*a*) – интерференционная, (*b*) – выпрямленная, (*c*) – фильтрованная полосовым фильтром 25–450 Гц, (*d*) – фильтрованная полосовым фильтром 25–450 Гц + повторная фильтрация ФНЧ 20 Гц.

Таким образом, количество извлекаемых синергий из разных периодов цикла бегового шага оказывалось больше при использовании PCA и меньше при FA, однако по показателю объясняемой дисперсии оба метода давали лучшие результаты, чем при рассмотрении целого цикла бегового шага. Следует также отметить очень низкие показатели вариативности дисперсии, что указывает на высокую плотность данных при их межиндивидуальном рассмотрении. Количество извлекаемых синергий оказывалось более вариативным, CV здесь достигали 16.62%, однако они также оценивались как низкие.

Исходя из цели работы, были проанализированы результаты извлечения мышечных синергий из разных наборов исходных данных ЭМГ. Показано, что качество извлечения синергий при достижении порога в 11 мышц снижается. Так, количество синергий пропорционально снижалось по мере уменьшения количества исходных данных при использовании обоих методов анализа (рис. 4*a*). По показателю доли объясняемой дисперсии результаты оказались неоднозначными. Факторный анализ демонстрировал стабильные показатели независимо от количества исходных ЭМГ-сигналов, а качество извлечения мышечных синергий снижалось при уменьшении количества анализируемых мышц (рис. 2*b*).

Таблица 2. Статистические параметры извлекаемых компонент (синергий) в различных периодах бегового шага ($n = 150$)

Периоды бегового шага	Стат. параметры	PCA		FA	
		кол-во извлекаемых компонент (ед.)	доля дисперсии (%)	кол-во извлекаемых компонент (ед.)	доля дисперсии (%)
Опора	$M \pm m$	6.50 ± 0.34	96.00 ± 1.00	3.70 ± 0.21	87.8 ± 0.80
	CV	16.62	3.29	18.24	2.88
Перенос	$M \pm m$	6.20 ± 0.33	91.60 ± 1.40	4.20 ± 0.20	84.00 ± 0.87
	CV	16.66	4.83	15.06	3.27

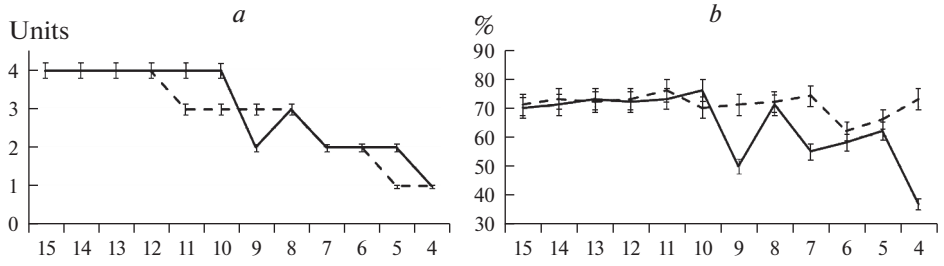


Рис. 4. Количество извлекаемых мышечных синергий (*a*) и доля дисперсии (*b*) с различным набором исходных ЭМГ сигналов и при использовании разных методов извлечения мышечных синергий. По оси абсцисс – количество мышц. Сплошная линия – результаты при использовании факторного анализа, пунктирная линия – результаты при использовании метода главных компонент.

Дальнейший анализ был сконцентрирован на рассмотрении различий пространственно-временной структуры мышечных синергий, выявляемых при использовании разных методов их извлечения. Следует отметить, что первая компонента при использовании обоих методов объясняла большую часть общей дисперсии, поэтому в работе будет представлены данные о структуре первой синергии. Установлено, что активность первой мышечной синергии снижалась в первой четверти периода опоры, затем возрастала и снова снижалась к завершению периода (рис. 5*a*). При использовании разных методов извлечения мышечных синергий была установлена высокая взаимосвязь их коэффициентов мышечной активации ($r_{max} = 0.84 \pm 0.05$). Пространственная структура первой извлеченной мышечной синергии включала ЭМГ-активность дельтовидных мышц и большой ягодичной мышцы правой стороны, причем, она сохранялась при использовании и факторного анализа и метода главных компонент (рис. 3*b*). В последнем случае была выявлена дополнительная мышца, входящая в структуру этой же синергии – прямая бедра правой нижней конечности. Также было установлено высокое соответствие пространственной структуры данной синергии в периоде опоры при использовании FA и PCA.

ЭМГ-активность дельтовидной мышцы правой верхней конечности и большой ягодичной мышцы левой нижней конечности определяла характерные паттерны временной структуры синергии в периоде переноса (рис. 5). Так, было выявлено три пика активности синергии в первых двух и последней четвертях периода. Также была выявлена дополнительная мышца методом главных компонент, входящая в структуру синергии – прямая бедра левой нижней конечности. В целом коэффициенты мышечной активации и векторы синергии демонстрировали высокую степень соответствия при использовании различных методов факторизации данных.

При рассмотрении структуры целого цикла бегового шага было выявлено пять пиков активности синергии, обусловленные, преимущественно, активностью дельтовидных мышц обеих верхних конечностей (рис. 5). Следует отметить, что использование PCA в данном случае давало несколько лучшие результаты, чем FA в плане определения пространственной структуры извлеченных мышечных синергий. Тем не менее, коэффициенты кросскорреляционных функций оценивались как высокие при анализе соответствия коэффициентов мышечной активации и векторов синергии – 0.92 ± 0.02 и 0.83 ± 0.26 соответственно.

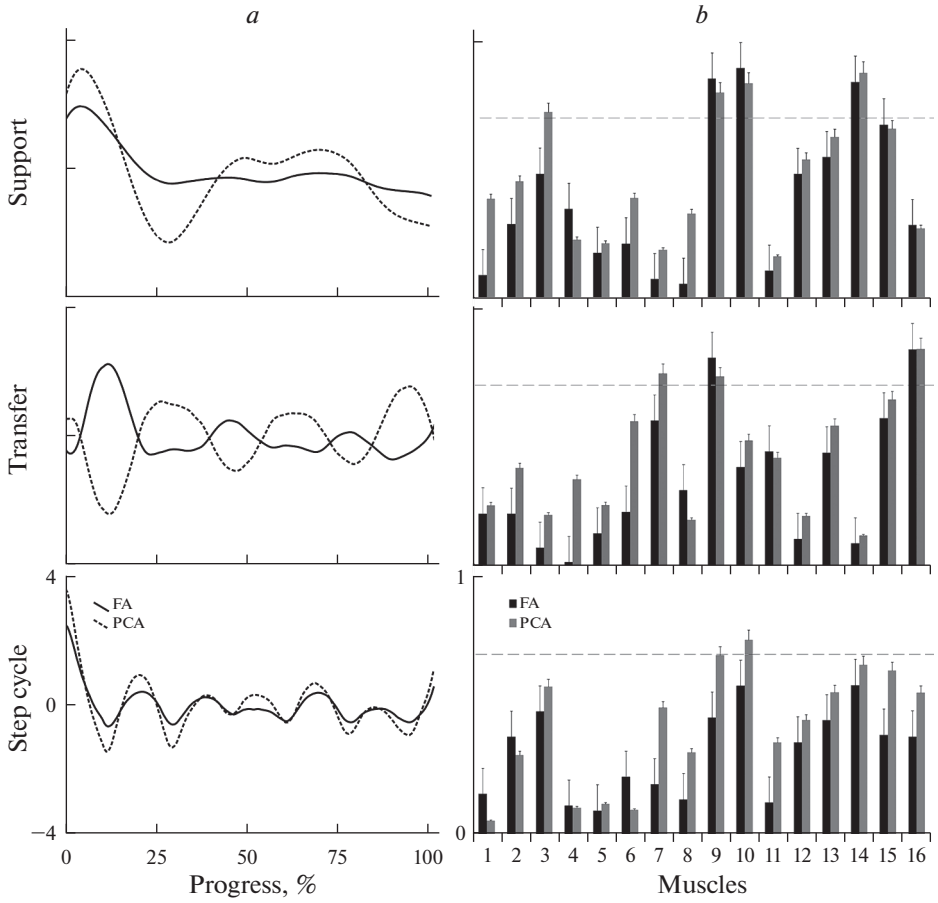


Рис. 5. Пространственно-временная структура мышечной синергии при использовании разных методов их извлечения в процессе локомоций умеренной интенсивности. По оси абсцисс на панели *a* – коэффициенты активации синергии (у. е.), на панели *b* – векторы синергии (у. е.). 1 – передняя большеберцовая правая, 2 – икроножная правая, 3 – прямая бедра правая, 4 – двуглавая бедра правая, 5 – передняя большеберцовая левая, 6 – икроножная левая, 7 – прямая бедра левая, 8 – двуглавая бедра левая, 9 – дельтовидная правая, 10 – дельтовидная левая, 11 – выпрямляющая позвоночник правая, 12 – выпрямляющая позвоночник левая, 13 – прямая живота правая, 14 – большая ягодичная правая, 15 – прямая живота левая, 16 – большая ягодичная левая.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Применяемые в нашей работе методы факторизации данных являются широко используемыми для извлечения мышечных синергий. При этом приводятся доказательства в пользу того, что получаемые результаты отражают реальные аспекты организации паттернов активации скелетных мышц, лежащие в основе двигательного поведения человека, а не являются вычислительным артефактом [1, 8, 9]. Однако применяются различные параметры предварительной обработки данных, включающие фильтрацию в диапазоне от 25 до 850 Гц, с последующей фильтрацией или без нее. Нам удалось приблизиться к результатам, описанным в работах ряда авторов по изучению локомоторной активности разной интенсивности, а именно,

количество извлекаемых мышечных синергий достигало в наших исследованиях пяти при уровне объясняемой дисперсии около 80%, в литературных данных, как правило, приводят порог 90%, однако есть работы, где ее порог устанавливается и на более низком уровне [9–11]. Ряд авторов применяют метод неотрицательной матричной факторизации как наиболее эффективный, на их взгляд, метод при работе с положительными значениями вариационных рядов данных ЭМГ [5]. Наряду с этими исследованиями приводятся и другие данные, свидетельствующие о не меньшей эффективности использования факторного анализа и других методов снижения размерности данных. Тем не менее, использование разных методов при изучении схожих по биомеханической структуре движений может давать несколько различающиеся результаты. Есть данные, что даже несущественные различия в позиционировании отводящих электродов при регистрации ЭМГ могут влиять на сходство синергетических паттернов мышечных активаций.

Количество извлекаемых мышечных синергий может быть критерием, указывающим на нейромышечную стратегию центральной нервной системы, предусматривающую достижение оптимальных параметров моторного выхода для обеспечения стабильности конечного результата движения [12, 13]. Большее количество синергий может свидетельствовать о более сложной стратегии управления, вследствие включения в управляющую систему значительного количества управляемых элементов – синергий [11, 12, 14]. Логично предположить, что целый беговой шаг по своей координационной структуре может быть значительно сложнее, чем движения, составляющие структуру его отдельных периодов, однако в таком случае количество синергий, задействованных в их реализации, должно быть несколько меньше. Результаты наших исследований показывают обратное, оказывается, что управление движением на уровне подзадач, т.е. в отдельных периодах движения, характеризуется не меньшей сложностью, на что указывает количество извлекаемых мышечных синергий и величина объясняемой дисперсии, достигающая описанной в литературе пороговой величины – 90%.

Известно, что центральная нервная система не генерирует каждый раз новые мышечные синергии, а гибко комбинирует существующий набор синергий в соответствии с изменяющимися условиями выполнения двигательной задачи, постулируется, что множество мышечных синергий могут быть активированы одновременно, и каждая мышца может быть представлена в паттернах нескольких синергий [15, 16]. Исходя из этого, мышечные синергии, извлекаемые из одного набора исходных ЭМГ-данных, в структуре цикла бегового шага не являются результатом сложения синергетических эффектов, наблюдаемых в отдельных периодах цикла, а вероятно, являются частью двигательной программы, направленной на поддержание оптимальных параметров локомоций при заданной интенсивности работы.

Возможные причины расхождений в результатах при рассмотрении схожих по биомеханической структуре движений заключаются в применении различных процедур предварительной обработки ЭМГ данных (фильтрации, нормализации и др.), использовании разных методов извлечения синергетических эффектов, вариативности исходного набора ЭМГ, включенных в анализ. Выбор скелетных мышц для анализа является непростой задачей, поскольку синергетические эффекты не могут быть выявлены непосредственно в ходе эксперимента, а становятся доступны после применения процедур математической обработки зарегистрированных сигналов. На наш взгляд, вопрос количества ЭМГ, включаемых в анализ при извлечении мышечных синергий, является скорее поисковой задачей, но чаще их состав определяется логическим путем или на основе анализа турн-амплитудных характеристик электромиограмм. Наши данные свидетельствуют, что включение в анализ менее одиннадцати ЭМГ снижает количество мышечных синергий и эффективность их извлечения.

Анализ данных литературы показывает, что при изучении локомоторной активности нижних конечностей регистрируют электрическую активность поверхностных мышц одной, реже двух ног, крайне редко в анализ включают мышцы спины [13, 16–18]. Тот факт, что при таком существенном варьировании скелетных мышц в разных исследованиях выявляются от 4 до 6 синергий позволяет предположить, что синергетические паттерны взаимодействия скелетных мышц могут быть обнаружены в любом наборе исходных ЭМГ данных. Более важным является вопрос установления оптимальных границ, в рамках которых результатам можно дать физиологическую интерпретацию. Так, выявляются синергии, состоящие из двух или одной мышцы, что нередко встречается при использовании подхода к изучению мышечных синергий методами сокращения размерности данных, что противоречит самой концепции синергизма, как механизма снижения вычислительной нагрузки на центральную нервную систему посредством объединения управляемых элементов (мышц) в модули с меньшей размерностью. В одной из работ было показано, что характерные синергетические паттерны могут быть обнаружены в активности отдельных двигательных единиц *m. flexor digitorum superficialis* при помощи PCA [19]. Таким образом, выбор скелетных мышц и вопрос их количества в процессе изучения синергетических эффектов скорее определяется целями и задачами конкретного исследования.

Сравнение коэффициентов мышечной активации и векторов синергий в нашем исследовании показывает высокое их сходство при использовании разных методов извлечения мышечных синергий, но PCA выявляет большее количество мышц, определяющих пространственную их организацию. Таким образом, оба метода могут быть использованы для выявления синергетических эффектов при локомоциях умеренной интенсивности, однако метод главных компонент дает несколько лучшие результаты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, применяемый в работе методологический подход, включающий рассмотрение синергетических эффектов мышц туловища, верхних и нижних конечностей, позволяет эффективно выявлять мышечные синергии в структуре цикла бегового шага. Повышение качества реконструкции исходных ЭМГ-сигналов может быть достигнуто применением полосового фильтра с полосой пропускания 20–450 Гц с использованием после выпрямления дополнительной фильтрации 20 Гц. Такая предобработка существенно не влияет на величину средней амплитуды ЭМГ, но достоверно повышает качество реконструкции исходных данных.

Извлечение мышечных синергий методами факторизации данных оказывается более эффективным при рассмотрении различных периодов в сравнении с целым циклом бегового шага. Количество извлекаемых мышечных синергий пропорционально снижается по мере уменьшения числа исходных ЭМГ-сигналов при использовании FA и PCA, что необходимо учитывать при определении минимального количества электромиограмм, включаемых в анализ.

Выявлено высокое соответствие коэффициентов мышечной активации и векторов мышечной синергии при использовании FA и PCA, однако векторы синергии, определяемые методом главных компонент, представлены бóльшим количеством скелетных мышц при рассмотрении целого цикла бегового шага и его отдельных периодов. Это указывает на целесообразность применения PCA для анализа пространственной структуры мышечных синергий при локомоциях умеренной интенсивности.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Финансирование осуществлено в рамках плановой работы ФГБОУ ВО Великолукская государственная академия физической культуры и спорта.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

С.А.М. – планирование, организация и проведение экспериментов, регистрация и анализ полученных данных, подготовка текста рукописи; Е.А.М. – регистрация и анализ полученных данных, подготовка текста и рисунков рукописи, редактирование текста; А.М.П. – участие в организации и проведении экспериментов, предварительная обработка полученных данных, обзор публикаций по теме исследования; Р.М.Г. – общий контроль экспериментов, участие в подготовке рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tresch M, Cheung V, d'Avella A* (2006) Matrix factorization algorithms for the identification of muscle synergies: evaluation on simulated and experimental data sets. J Neurophysiol 195 (4): 2199–2212.
https://doi.org/10.1152/jn.00222.2005
2. *Escalona M, Bourbonnais D, Goyette M, Le Flem D, Duclos C, Gagnon D* (2021) Effects of varying overground walking speeds on lower-extremity muscle synergies in healthy individuals. Motor Control 25(2): 234–251.
https://doi.org/10.1123/mc.2020-0008
3. *Kerkman J, Bekius A, Boonstra T* (2020) Muscle Synergies and Coherence Networks Reflect Different Modes of Coordination During Walking. Front Physiol 11: 751.
https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00751
4. *Mileti I, Serra A, Wolf N, Munoz-Martel V, Ekizos A, Palermo E, Arampatzis A, Santuz A* (2020) Muscle activation patterns are more constrained and regular in treadmill than in overground human locomotion. Front Bioeng Biotechnol 8: 581619.
https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.581619
5. *Rabbi M, Pizzolato C, Lloyd D, Carty C, Devaprakash D, Diamond L* (2020) Non-negative matrix factorization is the most appropriate method for extraction of muscle synergies in walking and running. Sci Rep 10(1): 8266.
https://doi.org/10.1038/s41598-020-65257-w
6. *Turpin N, Uriac S, Dalleau G* (2021) How to improve the muscle synergy analysis methodology? Eur J Appl Physiol 121(4): 1009–1025.
https://doi.org/10.1007/s00421-021-04604-9
7. *Altenburger K, Bumke O, Foerster O* (1937) Allgemeine Neurologie. Handbuch der Neurologie. Berlin.
8. *Cheung V, Cheung B, Zhang J, Chan Z, Ha S, Chen C, Cheung R* (2020) Plasticity of muscle synergies through fractionation and merging during development and training of human runners. Nat Commun 11(1): 4356.
https://doi.org/10.1038/s41467-020-18210-4
9. *Lambert-Shirzad N, Van der Loos N* (2017) On identifying kinematic and muscle synergies: a comparison of matrix factorization methods using experimental data from the healthy population. J Neurophysiol 117(1): 290–302.
https://doi.org/10.1152/jn.00435.2016
10. *Gui K, Zhang D* (2016) Influence of locomotion speed on biomechanical subtask and muscle synergy. J Electromyogr Kinesiol 30: 209–215.
https://doi.org/10.1016/j.jelekin.2016.07.010
11. *Hajiloo B, Anbarian M, Esmaeili H, Mirzapour M* (2020) The effects of fatigue on synergy of selected lower limb muscles during running. J Biomech 16: 103–109.
https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2020.109692
12. *Santuz A, Brüll L, Ekizos A* (2020) Neuromotor Dynamics of Human Locomotion in Challenging Settings. Science 23(1): 100796.
https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.100796

13. *Chia Bejarano N, Pedrocchi A, Nardone A, Schieppati M, Baccinelli W, Monticone M, Ferrigno G, Ferrante S* (2017) Tuning of muscle synergies during walking along rectilinear and curvilinear trajectories in humans. Ann Biomed Eng 45: 1204–1218.
https://doi.org/10.1007/s10439-017-1802-z
14. *Santuz A, Ekizos A, Kunimasa Y* (2020) Lower complexity of motor primitives ensures robust control of high-speed human locomotion. Heliyon 6(10): e05377.
https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05377
15. *Amundsen HS, Van Acker G, Luchies C, Cheney P* (2018) Muscle synergies obtained from comprehensive mapping of the cortical forelimb representation using stimulus triggered averaging of EMG activity. J Neurosci 38(41): 8759–8771.
https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2519-17.2018
16. *Nishida K, Hagio S, Kibushi B, Moritani T, Kouzaki M* (2017) Comparison of muscle synergies for running between different foot strike patterns. PLoS One 12(2): e0171535.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171535
17. *Saito A, Tomita A, Ando R* (2018) Muscle synergies are consistent across level and uphill treadmill running. Sci Rep 8: 5979.
https://doi.org/10.1038/s41598-018-24332-z
18. *Barroso F, Torricelli D, Moreno J, Taylor J, Gomez-Soriano J, Bravo-Esteban E, Piazza S, Santos C, Pons J* (2014) Shared muscle synergies in human walking and cycling. J Neurophysiol 112(8): 1984–1998.
https://doi.org/10.1152/jn.00220.2014
19. *Madarshahian S, Letizi J, Latash ML* (2021) Synergic control of a single muscle: The example of flexor digitorum superficialis. J Physiol 599(4): 1261–1279.
https://doi.org/10.1113/JP280555

Methodological and Computational Aspects of Extracting Extensive Muscle Synergies in Moderate-Intensity Locomotions

S. A. Moiseev[a], *, A. M. Pukhov[a], E. A. Mikhailova[a], and R. M. Gorodnichev[a]

[a] *Velikiye Luki State Academy of Physical Education and Sports, Velikiye Luki, Russia*
**e-mail: sergey_moiseev@vlgafc.ru*

Modern approaches to the motor synergies study, generally, include synergistic effects consideration at one or two nervous system organization levels. These methods research effects interaction in the context of solving various motor tasks, including locomotion. However, even when considering similar in biomechanical structure movements, there are differences in some study of muscle synergies aspects, which is result of different methodological and computational approaches that do not take into account considered motor acts specifics. The study goal was to find the optimal parameters for the electromyographic signals pre-processing and to evaluate their impact to the extended muscle synergies extracting results during moderate-intensity locomotions. 10 male short distance runners took part in study. The subjects ran with moderate intensity on a treadmill. Electromyograms of 16 superficial skeletal muscles of the trunk, upper and lower extremities were recorded. Muscle synergies were extracted using matrix factorization methods using various preprocessing procedures of the initial signals. It was revealed that the best results for extended muscle synergies extraction are obtained by using a bandpass filter in the range of 20–450 Hz with additional 20 Hz filter using after electromiogramm rectification. The number of extracted synergies from different periods of the running step cycle is greater when using the principal component analysis (PCA) method and less when using factor analysis, and in terms of the explained variance, both methods give better results than entire running step cycle analysis. The synergies number decreases proportionally as the amount of source data decreases. The quality of synergy extraction decreases as the number of analyzed muscles decreases. The original EMG signals reconstruction results by the data factorization methods are more effective when considering different phases in comparison with the whole running step cycle. The muscle synergy extraction rates are sensitive to the original set of EMG signals included in the analysis

Keywords: muscle synergy, locomotion, factor analysis, principal component analysis, running step

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2022, том 108, № 1, с. 36–58

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ЭТОСУКСИМИД УЛУЧШАЕТ КОГНИТИВНУЮ ГИБКОСТЬ ПРИ РЕВЕРСИВНОМ ОБУЧЕНИИ У КРЫС ЛИНИИ WAG/R_{IJ} С АБСАНС-ЭПИЛЕПСИЕЙ И КОМОРБИДНОЙ ДЕПРЕССИЕЙ

© 2022 г. Е. А. Федосова[1, *], А. Б. Шацкова[1], К. Ю. Саркисова[1]

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

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

Поступила в редакцию 08.07.2021 г.
После доработки 07.10.2021 г.
Принята к публикации 08.10.2021 г.

Крысы линии WAG/Rij являются валидной моделью абсанс-эпилепсии с коморбидной депрессией. Известно, что абсанс-эпилепсия, наряду с симптомами депрессии, сопровождается когнитивными нарушениями, такими как дефицит внимания и когнитивной пластичности, являющейся важнейшим показателем исполнительных функций. Цель настоящей работы – выяснить, имеются ли нарушения когнитивной пластичности у крыс линии WAG/Rij и связаны ли они с абсанс-эпилепсией и коморбидной депрессией. Для выявления различий в когнитивной пластичности сопоставляли обучение (прямая задача) и переучивание (обратная задача) в сложном лабиринте при пищевом подкреплении у крыс линии WAG/Rij в возрасте 2-х мес., когда симптомы абсанс-эпилепсии и коморбидной депрессии отсутствуют, и в возрасте 6-ти месяцев, когда патологический фенотип полностью выражен. Пищевую мотивацию оценивали в тесте “Novelty Suppressed Feeding” (NSF). Этосуксимид (300 мг/кг/день, 17 дней) использовали для подавления симптомов абсанс-эпилепсии и коморбидной депрессии у крыс линии WAG/Rij. Крысы Wistar служили контролем. Обнаружено, что в возрасте 6-ти мес. крысы линии WAG/Rij медленнее выполняют прямую и обратную задачи, делают больше ошибок и проявляют пониженную пищевую мотивацию в тесте NSF (больше латентный период подхода к пище в незнакомом открытом поле и меньше количество съеденной пищи в домашней клетке) по сравнению с крысами Wistar. В возрасте 2-х мес. крысы линии WAG/Rij не отличались от крыс Wistar ни по одному из показателей. Этосуксимид улучшал реверсивное обучение, уменьшал число ошибок и увеличивал пищевую мотивацию только у 6-месячных крыс линии WAG/Rij. Этосуксимид не влиял на реверсивное обучение у крыс Вистар. У 6-месячных крыс линии WAG/Rij обнаружена положительная корреляция ($r = 0.66$, $p < 0.05$) между количеством пищи, съеденной в домашней клетке (показатель пищевой мотивации), и скоростью достижения критерия обученности при выполнении обратной задачи (показатель когнитивной пластичности). Результаты свидетельствуют о том, что выявленные нарушения когнитивной пластичности у крыс линии WAG/Rij могут быть следствием пониженной пищевой мотивации как одного из симптомов депрессии, коморбидной абсанс-эпилепсии.

Ключевые слова: абсанс-эпилепсия, крысы линии WAG/Rij, коморбидная депрессия, пищевая мотивация, реверсивное обучение, когнитивная гибкость

DOI: 10.31857/S086981392201006X

Крысы линии WAG/Rij являются валидной генетической моделью депрессии, ассоциированной с абсанс-эпилепсией [1–5]. Поведенческие особенности крыс линии WAG/Rij, такие как пониженное потребление и предпочтение сахарозы, повышенный уровень иммобильности в тесте вынужденного плавания [1, 2], пониженный уровень исследовательской мотивации в тестах распознавания нового объекта [6, 7] и открытого поля [2, 3], пониженное внимание в тестах распознавания нового объекта и социального распознавания [6, 7], имеют феноменологическое сходство с симптомами депрессии человека: ангедония, ощущение беспомощности, “безнадежности”, утрата интереса [1], неспособность к концентрации внимания и принятию решений [6, 7]. Депрессивно-подобные симптомы в поведении были обнаружены также у другой генетической модели абсанс-эпилепсии – у крыс линии GAERS [8].

Клинические данные свидетельствуют о том, что пациенты с детской абсанс-эпилепсией по сравнению со здоровыми детьми демонстрируют помимо симптомов депрессии когнитивные нарушения, среди которых авторы особо выделяют нарушения исполнительных функций (executive function) и направленного внимания (executive attention) [9]. В последние годы когнитивному аспекту депрессии уделяется особое внимание, так как коррекция когнитивных расстройств имеет первостепенное значение для нормализации повседневного функционирования пациентов и восстановления нарушенной трудоспособности при достижении ремиссии [10].

Данные о когнитивных функциях у экспериментальных моделей абсанс-эпилепсии немногочисленны и противоречивы. Одни исследования свидетельствуют об отсутствии дефицита обучения и памяти в тесте пассивного избегания и в водном лабиринте Морриса у 5-месячных крыс линии WAG/Rij по сравнению с крысами Wistar. Нарушения когнитивных функций в этих тестах были выявлены у крыс линии WAG/Rij только в возрасте 13-ти мес. по сравнению с крысами Wistar аналогичного возраста [11]. Не были обнаружены также нарушения рабочей памяти в радиальном 8-лучевом лабиринте у крыс линии WAG/Rij по сравнению с тремя инбредными линиями крыс (BN/Cpb, ACI и G/Cpb), у которых не наблюдается пик-волновая активность на ЭЭГ – основного симптома абсанс-эпилепсии [12]. Однако в другом тесте (платформа с отверстиями) у крыс линии WAG/Rij и G/Cpb, у которых встречаются абсансные пик-волновые разряды (ПВР) на ЭЭГ, по сравнению с крысами линии BN/Cpb и ACI, у которых ПВР практически отсутствуют, были выявлены нарушения долгосрочной памяти [12]. В других работах у 5–6-месячных крыс линии WAG/Rij были обнаружены нарушения воспроизведения следа памяти после выработки условного рефлекса пассивного избегания [1, 13], сохранность выработанного рефлекса активного избегания у них также была хуже по сравнению с крысами Wistar аналогичного возраста [13]. В нашей предыдущей работе у крыс линии WAG/Rij по сравнению с крысами Wistar были показаны нарушения эпизодической памяти в тестах распознавания нового объекта [6, 7] и социального распознавания [6], которые могут быть связаны с пониженной исследовательской мотивацией – одним из симптомов депрессии, коморбидной абсанс-эпилепсии [7].

Исполнительные функции, дефицит которых чаще всего демонстрируют пациенты с детской абсанс-эпилепсией [9], включают в себя способность планировать, принимать решения и поддерживать на необходимом уровне скорость обработки информации [14]. Вследствие этого может снижаться темп практически всех когнитивных процессов, особенно в тех ситуациях, когда требуется изменить привычную схему деятельности [14, 15]. Существенной частью исполнительных функций является когнитивная гибкость (cognitive flexibility) — способность переключаться с одного вида деятельности на другой. Высокий уровень когнитивной

гибкости обеспечивает человеку и животным эффективную адаптацию к постоянно меняющимся условиям окружающей среды [16]. Для оценки когнитивной гибкости часто используют различные вариации тестов, которые предусматривают обучение – выработку животным какой-либо реакции и его последующее переучивание (реверсивное обучение, reversal learning) – переделка этой реакции на альтернативную, чаще всего противоположную исходной [16].

Как у людей [17], так и у животных, – приматов [18, 19] и крыс [20], показано, что выполнение прямой и обратной задачи в тестах на обучение с переучиванием ассоциировано с активностью орбитофронтальной и медиальной префронтальной коры головного мозга [18]. Орбитофронтальная кора получает большое число сигналов от нейронов прилежащего ядра, дорзо-медиального стриатума и миндалины [21]. Нейротоксическое поражение дорсомедиального стриатума у крыс вызывает нарушение процесса переучивания [22]. Аналогичные манипуляции с прилежащим ядром также вызывают дефицит реверсивного обучения: сходные нарушения при выполнении пространственной задачи у обезьян [23] за исключением тех видов данной методики, которые предусматривают использование визуальных стимулов [23], а также нарушение вероятностного реверсивного обучения у крыс [24]. Связи ядра базолатерального комплекса миндалины с дорсомедиальным стриатумом и с прилежащим ядром отвечают за выбор действий, позволяющих получить вознаграждение при реверсивном обучении с положительным подкреплением и избежать наказания при использовании методик с отрицательным подкреплением соответственно [25]. Взаимодействие миндалины с орбитофронтальной корой имеет решающее значение для эмоциональной оценки ожидаемых результатов или последствий [20, 24].

Первые одиночные пик-волновые разряды (ПВР) у крыс линии WAG/Rij появляются примерно в возрасте 2–3 мес. К 5–6-месячному возрасту число и длительность ПВР увеличиваются [26, 27], и по мере усиления пик-волновой активности у этих животных формируется и усиливается депрессивно-подобное поведение [1–3, 5]. В одной из предыдущих работ [28] было проведено исследование обучения с переучиванием в сложном лабиринте с пищевым подкреплением у 6-месячных крыс линии WAG/Rij по сравнению с крысами Wistar аналогичного возраста. Показано, что крысы линии WAG/Rij медленнее обучаются и переучиваются, медленнее достигают пищевого подкрепления при выполнении как прямой, так и обратной задачи и делают больше ошибок в сложном лабиринте по сравнению с крысами Wistar, у которых отсутствуют ПВР и депрессивно-подобные симптомы поведения [28].

Настоящая работа посвящена проверке предположения о том, что дефицит исполнительных когнитивных функций у крыс линии WAG/Rij в тесте реверсивного обучения в сложном лабиринте мог бы быть следствием депрессии, коморбидной абсанс-эпилепсии, а именно – пониженной пищевой мотивации как одного из проявлений депрессивно-подобного поведения. Для этого было проведено обучение с переучиванием (реверсивное обучение) в сложном лабиринте в соответствии с ранее использованной методикой [28]. Оценку пищевой мотивации проводили в тесте на тревожность и пищевую мотивацию “Novelty Suppressed Feeding” (NSF) [29]. В данной работе крыс линии WAG/Rij сравнивали с крысами Wistar в возрасте 2-х мес., когда симптомы абсанс-эпилепсии и депрессии еще отчетливо не проявляются [13, 26, 27], и в возрасте 6-ти мес., когда патологический фенотип полностью выражен [1–7]. Предполагалось, что в возрасте 2-х мес., когда у крыс линии WAG/Rij отсутствуют ПВР на ЭЭГ [26, 27] и симптомы депрессии [13], различия в реверсивном обучении в сложном лабиринте, а также в уровне пищевой мотивации в тесте NSF, у крыс линии WAG/Rij по сравнению с крысами Wistar еще не будут проявляться. С целью подавления симптомов абсанс-эпилепсии и коморбидной депрессии у 6-месячных крыс линии WAG/Rij использовали этосуксимид. Предпола-

галось, что подавление ПВР, вызываемое этосуксимидом, устранит симптомы депрессии, повысит пищевую мотивацию, что приведет к улучшению реверсивного обучения в сложном лабиринте у крыс линии WAG/Rij.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

Работа выполнена на 26-ти крысах-самцах линии WAG/Rij и 23-х крысах-самцах Wistar. Всех животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде по 4–5 особей в клетке (70 × 40 × 40) в условиях естественного цикла день–ночь (день около 10 ч). Данное исследование проведено в соответствии с международными правилами содержания и обращения с животными (Директива Европейского сообщества от 22 сентября 2010 г. – Directive 2010/63/EU) и принципами, изложенными в положениях Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН о работе с экспериментальными животными.

Схема эксперимента

Экспериментальные животные были разделены на 6 групп: крысы линии WAG/Rij в возрасте 2-х (n = 9) и 6-ти мес. (n = 17), а также крысы Wistar в возрасте 2-х (n = 8) и 6-ти мес. (n = 15). Как 6-месячных крыс линии WAG/Rij, так и крыс Wistar аналогичного возраста, делили случайным образом на две группы: экспериментальную (WAG/Rij – n = 8; Wistar – n = 7) и контрольную (WAG/Rij – n = 9; Wistar – n = 8). Животные экспериментальной группы потребляли в течение 17 дней антиабсансный препарат этосуксимид, который был добавлен в поилки с питьевой водой, животные контрольной группы потребляли только воду. Эффект этосуксимида на когнитивную пластичность и пищевую мотивацию оценивали у крыс линии WAG/Rij только в возрасте 6-ти мес., когда пик-волновая активность и симптомы депрессии полностью выражены [1–3, 5]. 2-месячные животные данной линии не потребляли этосуксимид, поскольку у крыс линии WAG/Rij в этом возрасте симптомы патологии отсутствуют [13, 26, 27], так же, как и у “нормальных” крыс Wistar. Показано, что препарат оказывает антидепрессантное влияние (уменьшение времени иммобильности в тесте вынужденного плавания) только у 5-месячных крыс линии WAG/Rij, когда ПВР хорошо выражены. У крыс, у которых пик-волновая активность отсутствовала (крысы линии WAG/Rij 21-дневного возраста, а также крысы Wistar 21-дневного и 5-месячного возраста), этосуксимид не оказывал антидепрессантного влияния [30]. Данные экспериментальных исследований, свидетельствующих о том, что этосуксимид не обладает собственным антидепрессантным эффектом, не связанным с его антиабсансной активностью [5, 30], подтверждаются данными клиники. У пациентов с депрессивным расстройством ни после однократного перорального приема препарата, ни после его приема в течение 2-х недель не наблюдали значимого снижения показателей депрессии по сравнению с плацебо [31]. Чтобы убедиться в том, что этосуксимид не может воздействовать на исполнительные функции и пищевую мотивацию безотносительно его влияния на пик-волновую активность и поведенческие симптомы депрессии, его предъявляли крысам Wistar, у которых отсутствовала какая-либо патология, по той же схеме, что и крысам линии WAG/Rij.

Этосуксимид

(Suxilep, JENAPHARM, GmbH&Co, KG, Jena, Германия) – антиабсансный препарат первого выбора, который подавляет как пик-волновую активность, так и симптомы коморбидной депрессии [5]. Оптимальный способ для поддержания по-

стоянной концентрации этого вещества в крови – пероральное потребление крысами этосуксимида, который добавляли в поилки с питьевой водой. Это позволяло эффективно блокировать ПВР в течение всего периода потребления данного препарата. Доза этосуксимида составляла 300 мг/кг/день, это было достаточно для того, чтобы подавить пик-волновую активность и при этом не вызвать нежелательные побочные эффекты: гипофагия, летаргия, атаксия [5, 32]. Животные потребляли этосуксимид на протяжении 17-ти дней, в течение которых производили еженедельный контроль массы тела (взвешивание) для коррекции дозы препарата в соответствии с возможными изменениями веса. Поилки с питьевой водой и этосуксимидом меняли 3 раза в неделю [5].

Поведенческие тесты

В данной работе использована схема эксперимента, которая применялась в одной из предыдущих работ [28] (рис. 1). Для оценки когнитивной гибкости и выявления различий в поведении между крысами линии WAG/Rij и крысами Wistar в возрасте 2-х и 6-ти мес., а также между контрольной и экспериментальной группами 6-месячных крыс Wistar и крыс линии WAG/Rij мы использовали тест обучения с переучиванием в сложном лабиринте и тест на тревожность и пищевую мотивацию (NSF). Процедура тестирования в сумме составляла 15 дней: 24 ч – пищевая депривация, 8 сут – обучение в тесте обучения с переучиванием в сложном лабиринте с пищевым подкреплением, 3-е сут – переучивание в тесте обучения с переучиванием в сложном лабиринте с пищевым подкреплением, 24 ч – перерыв, 24 ч – пищевая депривация, затем – тест на тревожность и пищевую мотивацию.

Тест обучения с переучиванием в сложном лабиринте с пищевым подкреплением. Данную методику использовали для оценки способности животных к формированию навыка (обучение; прямая задача) и его последующей переделке (переучивание; обратная задача). Экспериментальная установка “сложный лабиринт” представляет собой квадратную камеру размером 60 × 60 × 25 см, которая была разделена на 6 равных по ширине коридоров прозрачными перегородками (5 штук). Каждая из перегородок была снабжена небольшим отверстием прямоугольной формы, которое могло находиться либо в крайнем правом положении – на 10 см от правой стенки лабиринта, либо в крайнем левом – на 10 см от левой стенки. За перегородкой с одним вариантом расположения отверстия следовала перегородка с противоположным вариантом расположения. Такое устройство “сложного лабиринта” позволяло оценить способность животного к решению пространственной задачи – пройти от первого, стартового, отсека лабиринта до шестого, “целевого”, по этой, единственно возможной зигзагообразной траектории. В целевом отсеке животному предъявляли пищевое подкрепление – один стандартный сахарозный шарик (sugar dustless precision pellets), 45 мг (“BioServ”, Frenchtown, NJ, США). С целью угашения ориентировочно-исследовательской реакции и для установления первичной ассоциации между обстановкой лабиринта и получением в нем пищевого подкрепления, крыс адаптировали к условиям эксперимента. С этой целью после однодневной пищевой депривации крыс на 15 мин помещали в “сложный лабиринт”, во всех отсеках которого были равномерно разложены сахарозные шарики. Далее на протяжении всего времени тестирования в сложном лабиринте с пищевым подкреплением крысам давали корм в домашней клетке один раз в день после окончания опыта. Количество корма было не ограничено, но животные могли потреблять его только в течение 10 мин, вода присутствовала в клетке постоянно. Массу тела крыс контролировали с тем, чтобы в ходе пищевой депривации их масса снизилась не более, чем на 20% от исходной, что является необходимым, когда животных подвергают пищевой депривации.

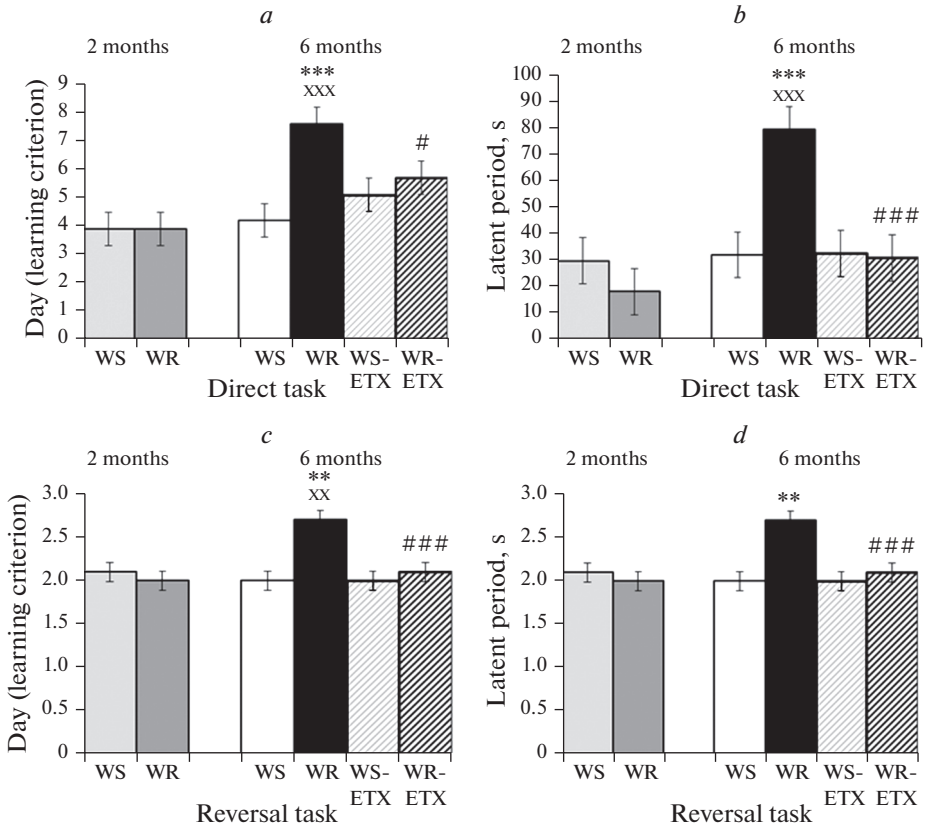


Рис. 1. День достижения критерия обученности при выполнении прямой (*a*) и обратной (*c*) задачи в сложном лабиринте и латентный период взятия пищевого подкрепления при выполнении прямой (*b*) и обратной (*d*) задачи**.** WS – крысы Wistar, потреблявшие воду (контрольная группа), WR – крысы линии WAG/Rij, потреблявшие воду (контрольная группа), WS-ETX – 6-месячные крысы Wistar, потреблявшие ETX (экспериментальная группа), WR-ETX – 6-месячные крысы линии WAG/Rij, потреблявшие ETX (экспериментальная группа). ETX – этосуксимид (300 мг/кг/день, в течение 17 дней). $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$ – у 6-месячных WR по сравнению с WS того же возраста. $^{xx}p < 0.01$, $^{xxx}p < 0.001$ – у 6-месячных крыс по сравнению с 2-месячными. $^{\#}p < 0.05$, $^{\#\#\#}p < 0.001$ - у экспериментальной группы WR по сравнению с контрольной.

Полное прохождение лабиринта по траектории, заданной расположениями отверстий в перегородках, в течение 3-х мин называли “правильной реакцией”. Ежедневно крыс сажали в лабиринт 5 раз подряд по 3 мин до достижения критерия обученности: воспроизведение крысой 4-х правильных реакций из 5-ти попыток при условии, что она смогла повторить этот результат на следующий день. После достижения критерия обученности перегородки лабиринта переворачивали зеркально, таким образом, что отверстие, которое было в крайнем правом положении, становилось в крайнее левое положение и наоборот. Пищевое подкрепление попрежнему находилось в “целевом” отсеке лабиринта. Животных переучивали (reversal learning) с уже привычного способа прохождения лабиринта по зигзагообразной траектории на иной навык – по пространственно зеркальной траектории. Крысы выполняли обратную задачу до достижения того же критерия обученности.

После посадки животного в стартовый, ближайший к экспериментатору, отсек камеры регистрировали следующие показатели:

1) день достижения критерия обученности (скорость обучения) – порядковый номер того дня, когда крыса впервые выполнила 4 правильных реакций из 5-ти попыток и смогла повторить этот результат на следующий день;

2) среднее время реакции – латентный период достижения и взятия подкрепления. Оба показателя оценивали отдельно для прямой (обучение) и обратной (переучивание) задачи.

3) число ошибок – отклонения от "правильной" траектории движения, когда крыса после прохождения отверстия в перегородке в очередной отсек камеры сворачивает в "неправильную" сторону;

4) число стоек и коротких эпизодов груминга.

Тест на тревожность и пищевую мотивацию (novelty suppressed feeding test, NSF). Тест NSF направлен на оценку баланса уровня пищевой мотивации и мотивации страха (тревоги) животных [29, 33]. Крыс на 10 мин помещали в новое незнакомое "Открытое поле" ($d = 80$ см), в центре которого находилось пищевое подкрепление – 1 сахарозный шарик, уже знакомый животному по предыдущему тесту (обучение с переучиванием в сложном лабиринте с пищевым подкреплением). Регистрировали латентный период нахождения и поедания пищевого подкрепления в "Открытом поле".

После изъятия крысы из незнакомого "Открытого поля" ее на 10 мин возвращали в домашнюю клетку, в которой находилось заранее взвешенное количество привычного для нее корма. Регистрировали количество корма в граммах, съеденное в домашней клетке [28, 29, 33].

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета статистических программ STATISTICA 6.0. Для каждого исследуемого показателя определяли наличие выбросов по критерию Граббса (Grubb's test). Если экстремальные значения не выходили за пределы, допустимые для нормального распределения, то применяли дисперсионный анализ (ANOVA). Результаты ANOVA контролировали с использованием непараметрического аналога ANOVA – Kruskal–Wallis H test (one-way ANOVA by ranks) и критерия Манна–Уиттни (Mann–Whitney U test). Для оценки значимости факторов "возраст" и "линия крыс" использовали двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA). Для оценки значимости факторов "линия крыс" и "этосуксимид" у 6-месячных крыс линии WAG/Rij и крыс Wistar также использовали двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA). Определение различий между средними значениями показателей проводили по post-hoc критерию Ньюмена–Кеулса (Newman–Keuls test). Связь между показателями оценивали по коэффициенту корреляции Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Тест сложного лабиринта с пищевым подкреплением

Тестирование в сложном лабиринте включало в себя выполнение прямой (обучение) и обратной (переучивание) задач.

Для показателя "день достижения критерия обученности" при выполнении прямой задачи показана высокая значимость факторов "возраст" ($F(1, 30) = 35.2$, $p < 0.001$) и "линия крыс" ($F(1, 30) = 23.7$, $p < 0.001$). По данным двухфакторного дисперсионного анализа по этому показателю между крысами Wistar и крысами линии WAG/Rij отсутствовали различия в возрасте 2-х мес. ($F(1, 15) = 0.001$, $p = 0.98$). По

данным однофакторного дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса, межлинейные различия у 2-месячных животных также отсутствуют (H(1, 17) = 1.32, $p = 0.25$). Однако в возрасте 6-ти мес. скорость обучения у контрольных крыс линии WAG/Rij была значимо меньше по сравнению с контрольными крысами Wistar (F(1, 15) = 44.1, $p < 0.001$). Однофакторный дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса подтверждает наличие значимых межлинейных различий по этому показателю в возрасте 6-ти мес. (H(1, 17) = 11.9, $p < 0.001$) (рис. 1*a*). Как 2-месячные крысы Wistar (3.9 ± 0.4 дня), так и 2-месячные крысы линии WAG/Rij (3.9 ± 0.3 дня) быстрее достигают критерия обученности при выполнении прямой задачи, чем 6-месячные крысы Wistar (4.2 ± 0.3 дня) и 6-месячные крысы линии WAG/Rij, которые не потребляли этосуксимид (7.6 ± 0.3 дня) соответственно (рис. 1*a*). Различия по данному показателю между 2- и 6-месячными контрольными крысами линии WAG/Rij достигали уровня статистической значимости (F(1, 16) = 106.2, $p < 0.001$); H(1, 18) = 14.2, $p < 0.001$) и оставались на уровне тенденции между 2- и 6-месячными контрольными крысами Wistar (F(1, 14) = 0.39, $p = 0.54$); H(1, 16) =1.11, $p = 0.32$) (рис. 1*a*).

Согласно однофакторному ANOVA, у крыс линии WAG/Rij, которые принимали этосуксимид, скорость обучения была больше по сравнению с контрольными животными той же линии (F (1, 15) = 6.9, $p = 0.02$), потреблявшими воду. Данные дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса (H(2, 20) = 9.02, $p = 0.01$) подтверждают данные ANOVA. В отличие от межлинейных различий по этому показателю между контрольными группами животных (7.5 ± 0.4 день, WAG/Rij; 4.2 ± 0.4 день, Wistar), различия между экспериментальными крысами линии WAG/Rij (5.7 ± 0.4 день) и Wistar (5.1 ± 0.5 день), которые потребляли этосуксимид, были незначимыми (F(1, 13) = 0.59, $p = 0.46$); H(1, 15) = 0.69, $p = 0.41$) (рис. 1*a*). При обучении день достижения критерия обученности у экспериментальной группы крыс линии WAG/Rij не отличался от данного показателя у контрольной группы крыс Wistar (F(1, 14) = 1.09, $p = 0.26$); H(1, 15) = 0.69, $p = 0.41$). Препарат не оказывал значимого влияния на день достижения критерия обученности у крыс Wistar (F(1, 13) = 2.37, $p = 0.15$); (H(1, 15) = 1.92, $p = 0.16$) (рис. 1*a*).

Для среднего времени реакции значимым по данным двухфакторного дисперсионного анализа являлись оба фактора – “возраст” (F (1, 30) = 57.2, $p < 0.001$) и “линия крыс” (F (1, 30) = 18.1, $p < 0.001$). Статистически значимых отличий данного показателя не было установлено у 2-месячных крыс линии WAG/Rij по сравнению с крысами Wistar аналогичного возраста (F(1, 15) = 3.8, $p = 0.07$) (рис.1*b*). В возрасте 6-ти месяцев наблюдали статистически значимые различия между крысами линии WAG/Rij и крысами Wistar (F(1, 15) = 66.4, $p < 0.001$): показатель “латентный период взятия подкрепления” был больше у крыс линии WAG/Rij (79.1 ± 4.0 с), чем у крыс Wistar (32.1 ± 4.2 с) (рис. 1*b*). У 2-месячных крыс Wistar (29.9 ± 4.2 с) и 2-месячных крыс линии WAG/Rij (18.3 ± 4.0 с) среднее время реакции было меньше, чем у 6-месячных крыс Wistar (32.1 ± 4.2 с) и 6-месячных крыс линии WAG/Rij (79.1 ± 4.0 с) соответственно (рис. 1*b*). Различия по данному показателю между 2-месячными и 6-месячными животными достигали уровня статистической значимости только у крыс линии WAG/Rij (F(1, 16) = 185.7, $p < 0.001$), но не у крыс Wistar (F(1, 14) = 0.09, $p = 0.77$) (рис. 1*b*).

У крыс линии WAG/Rij с этосуксимидом (31.0 ± 4.1 с) по сравнению с контрольными животными той же линии (79.1 ± 4.0 с) показатель “латентный период взятия подкрепления” был меньше (F (1, 15) = 51.5, $p < 0.001$). В отличие от существенных различий по данному показателю между крысами линии WAG/Rij и крысами Wistar, потреблявшими воду, значимых различий между крысами линии WAG/Rij (31.0 ± 4.1 с) и крысами Wistar (32.7 ± 4.4 с), потреблявшими этосуксимид, не наблюдали (F (1, 13) = = 0.19, $p = 0.67$) (рис.1*b*). Препарат не оказывал значимого влияния на среднее время реакции у крыс Wistar (F (1, 13) = 0.36, $p = 0.56$) (рис. 1*b*).

При выполнении обратной задачи, то есть при переделке навыка отыскания подкрепления в сложном лабиринте, животные демонстрировали похожий на прямую задачу паттерн поведения. Для дня достижения критерия обученности показана высокая значимость обоих факторов – “возраст” ($F(1, 30) = 6.5$, $p < 0.05$) и “линия крыс” ($F(1, 30) = 6.4$, $p < 0.05$). По данным однофакторного дисперсионного анализа по данному показателю между крысами линии WAG/Rij и крысами Wistar различия в возрасте 2-х месяцев отсутствуют ($F(1, 15) = 1.13$, $p = 0.30$). Отсутствие межлинейных различий по показателю “день достижения критерия обученности” у 2-месячных животных подтверждает однофакторный дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса ($H(1, 17) = 1.12$, $p = 0.29$). Однако в возрасте 6-ти месяцев скорость переучивания у крыс линии WAG/Rij была значимо меньше по сравнению с крысами Wistar согласно данным однофакторного дисперсионного анализа ($F(1, 15) = 10.3$, $p < 0.01$). Односторонний дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса также свидетельствует о межлинейных различиях по данному показателю в возрасте 6-ти месяцев ($H(1, 17) = 5.81$, $p < 0.05$) (рис. 1*c*). 2-месячные крысы линии WAG/Rij (2.0 ± 0.1 день) переучивались быстрее, чем 6-месячные крысы линии WAG/Rij (2.7 ± 0.2 день), и различия по показателю “день достижения критерия обученности” между 2-месячными и 6-месячными животными данной линии достигали уровня статистической значимости ($F(1, 16) = 8.0$, $p = 0.01$); ($H(1, 18) = 6.43$, $p < 0.001$) (рис. 1*c*). Между 2-месячными (2.1 ± 0.1) и 6-месячными крысами Wistar (2.0 ± 0.1) не было значимых отличий по этому показателю ($F(1, 14) = 1.00$, $p = 0.33$); ($H(1, 16) = 1.00$, $p = 0.32$) (рис. 1*c*).

При выполнении обратной задачи крысы линии WAG/Rij, которые потребляли этосуксимид, переучивались быстрее, чем крысы линии WAG/Rij, которые потребляли воду ($F(1, 15) = 23.2$, $p < 0.001$) (рис. 1*c*). Данные однофакторного дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса подтверждают различия между экспериментальной и контрольной группой крыс линии WAG/Rij ($H(2, 20) = 9.01$, $p < 0.05$). Не наблюдали значимых различий у крыс линии WAG/Rij с этосуксимидом по сравнению с аналогичной группой крыс Wistar ($F(1, 13) = 0.24$, $p = 0.63$); ($H(2, 20) = 9.02$, $p = 0.01$) (рис. 1*c*). При переучивании день достижения критерия обученности у экспериментальной группы крыс линии WAG/Rij не отличался от данного показателя у контрольной группы крыс Wistar ($F(1, 14) = 1.09$, $p = 0.26$); $H(1, 15) = 0.25$, $p = 0.62$). Прием препарата не оказал значимого влияния на день достижения критерия обученности у экспериментальной группы крыс Wistar по сравнению с контрольной ($F(1, 13) = 1.16$, $p = 0.30$); $H(1, 15) = 1.14$, $p = 0.28$) (рис. 1*c*).

Двухфакторный дисперсионный анализ показал, что факторы “линия крыс” ($F(1, 30) = 0.162$, $p > 0.05$) и “возраст” ($F(1, 30) = 3.2$, $p > 0.05$) не оказывали статистически значимого влияния на латентный период взятия подкрепления при переучивании. Статистически значимых различий по данному показателю не было обнаружено у крыс линии WAG/Rij (26.8 ± 7.2 с) по сравнению с крысами Wistar (27.4 ± 7.7 с) в возрасте 2 мес. ($F(1, 15) = 0.001$, $p = 0.97$) (рис. 1*d*). Различий по среднему времени реакции не было обнаружено также у 6-месячных животных по сравнению с 2-месячными: ($F(1, 16) = 1.90$, $p = 0.19$) – для крыс линии WAG/Rij, ($F(1, 14) = 2.11$, $p = 0.17$) – для крыс Wistar (рис. 1*d*). При этом в возрасте 6-ти месяцев, по данным двухфакторного дисперсионного анализа, этот показатель у контрольной группы крыс линии WAG/Rij по сравнению с контрольной группой крыс Wistar был больше. Однако это различие проявлялось на уровне тенденции, не достигая уровня статистической значимости, и post hoc сравнение по критерию Ньюмана–Кеулса подтвердило отсутствие статистической значимости ($p = 0.07$). Однако однофакторный дисперсионный анализ выявил факт наличия статистической значимости, и латентный период взятия подкрепления у контрольной группы крыс линии

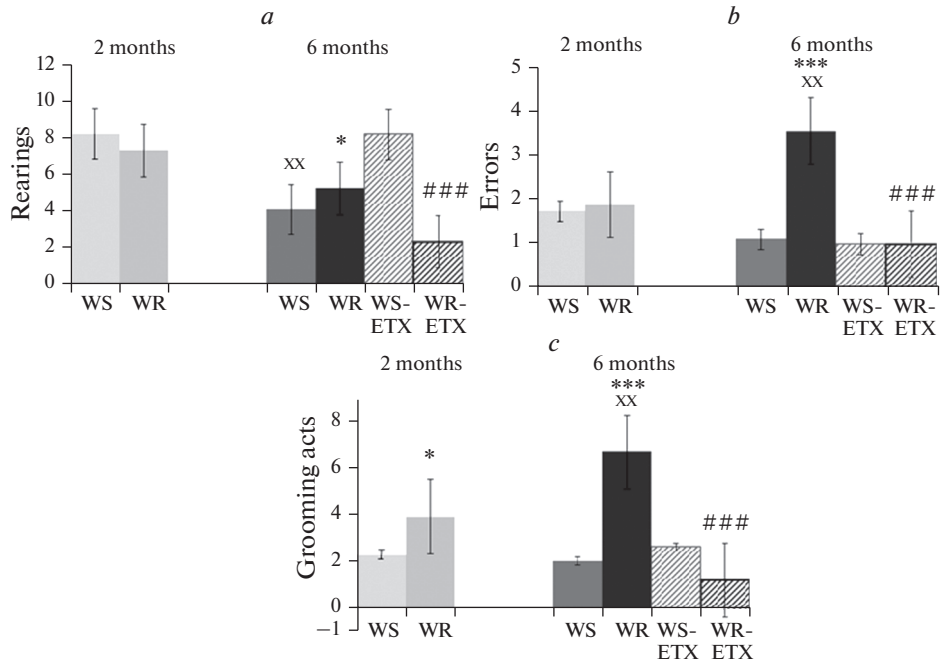


Рис. 2. Число стоек (*a*), ошибок (*b*) и коротких эпизодов груминга (*c*) в сложном лабиринте. WS – крысы Wistar, потреблявшие воду (контрольная группа), WR – крысы линии WAG/Rij, потреблявшие воду (контрольная группа), WS-ETX – 6-месячные крысы Wistar, потреблявшие ETX (экспериментальная группа), WR-ETX – 6-месячные крысы линии WAG/Rij, потреблявшие ETX (экспериментальная группа). ETX – этосуксимид (300 мг/кг/день, в течение 17 дней). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ – у 6-месячных WR по сравнению с WS того же возраста. ^{xx} $p < 0.01$ – у 6-месячных крыс по сравнению с 2-месячными. $^{###}p < 0.001$ – у экспериментальной группы WR по сравнению с контрольной.

WAG/Rij (43.9 ± 7.2 с) по сравнению с контрольной группой крыс Wistar (16.4 ± 7.7 с) был значимо больше ($F(1, 15) = 50.7$, $p < 0.01$) (рис. 1*d*).

При переделке навыка отыскания подкрепления в сложном лабиринте (обратная задача) у крыс линии WAG/Rij, которые потребляли этосуксимид, среднее время реакции было меньше по сравнению с контрольной группой ($F (1, 15) = 71.2$, $p < 0.001$) (рис. 1*d*). В отличие от значимых различий по данному показателю между крысами линии WAG/Rij (43.9 ± 7.3 с) и Wistar (16.4 ± 7.7 с), потреблявших воду, различия между крысами линии WAG/Rij (16.7 ± 2.3 с) и Wistar (16.4±7.7 с), потреблявших этосуксимид, значимые различия отсутствовали ($F (1, 13) = 0.31$, $p = 0.59$) (рис. 1*d*). Препарат не оказал значимого влияния на скорость выполнения обратной задачи у крыс Wistar ($F (1, 13) = 0.40$, $p = 0.53$) (рис. 1*d*).

Латентный период взятия пищевого подкрепления определяется общим временем, которое крысы проводят в экспериментальной установке “сложный лабиринт”. С общим временем, которое крысы проводят в лабиринте, связаны такие показатели, как число стоек и число ошибок, которые могут говорить об “отвлечении” животных от решения задачи – получение пищевого подкрепления в целевом отсеке лабиринта. Число ошибок ($F(1, 15) = 0.08$, $p = 0.77$) и число стоек ($F(1, 15) = 0.40$, $p = 0.54$) были практически одинаковыми у крыс линии WAG/Rij и крыс Wistar в возрасте 2-х мес., так же как и латентный период взятия подкрепления (прямая и обратная задачи) (рис. 2*a*, *b*). По данным однофакторного дисперсион-

ного анализа Краскела–Уоллиса также отсутствуют межлинейные различия у 2-месячных животных по числу ошибок (H(1, 17) = 0.04, p = 0.83). Однако в возрасте 6-ти мес. как число ошибок (F(1, 15) = 41.3, p < 0.001), так и число стоек (F(1, 15) = 15.1, p < 0.01) у крыс линии WAG/Rij были больше по сравнению с крысами Wistar аналогичного возраста (рис. 2*a*, *b*). Однофакторный дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса подтверждает межлинейные различия по числу стоек в возрасте 6-ти месяцев (H(1, 17) =11.89, p < 0.001). У крыс линии WAG/Rij число стоек в возрасте 6-ти мес. статистически значимо не отличалось от данного показателя в возрасте 2-х мес. (F(1, 16) = 0.43, p = 0.52 (рис. 2*a*). У крыс Wistar в возрасте 6-ти мес. число стоек было меньше, чем в 2-месячном возрасте (F(1, 14) = 13.2, p = 0.003) (рис. 2*a*). Число ошибок у 6-месячных крыс линии WAG/Rij было больше по сравнению с 2-месячными животными той же линии (F(1, 16) = 13.2, p < 0.01); (H(1, 18) = 7.65, p < 0.01) (рис. 2*b*). У крыс Wistar число ошибок было меньше в возрасте 6-ти мес. по сравнению с 2-месячным возрастом, однако это различие не достигало уровня статистической значимости (F(1, 14) = 2.61, p = 0.13); (H(1, 16) =1.97, p = 0.16) (рис. 2 *b*). У крыс Wistar не наблюдали возрастных различий по числу стоек (F(1, 14) = 2.61, p = 0.13).

У крыс линии WAG/Rij с этосуксимидом число стоек было значимо меньше по сравнению с контрольной группой (F (1, 15) = 79.2, p < 0.001); по сравнению с крысами Wistar, которые потребляли этосуксимид, у экспериментальной группы крыс линии WAG/Rij отличий не было (F (1, 13) = 0.55, p = 0.52) (рис. 2*a*). Между группами крыс Wistar, которые потребляли антиабсансный препарат, и крысами Wistar, которые потребляли воду, различий по числу стоек не обнаружено (F (1, 13) = 0.74, p = 0.41) (рис. 2*a*).

У группы крыс линии WAG/Rij, которые потребляли этосуксимид, число ошибок в сложном лабиринте было меньше по сравнению с контрольными животными той же линии (F (1, 15) = 33.9, p < 0.001). Данные однофакторного дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса подтверждают различия между экспериментальной и контрольной группой крыс линии WAG/Rij (H(2, 20) = 13.06, p < 0.01). В отличие от различий между контрольными группами крыс линии WAG/Rij и крыс Wistar различия между экспериментальными группами крыс линии WAG/Rij и крыс Wistar, отсутствовали (F (1, 13) = 0.16, p = 0.70); (H(1, 15) =0.11, p = 0.72) (рис. 2*b*). Препарат не оказывал значимого влияния на число ошибок у крыс Wistar (F (1, 13) = 0.91, p = 0.40); H(1, 15) = 0.17, p = 0.68) (рис. 2*b*).

Число коротких эпизодов груминга у крыс линии WAG/Rij было значимо больше, чем у крыс Wistar как в возрасте 2-х месяцев (F(1, 15) = 5.62, p = 0.03), так и в возрасте 6-ти мес. (F(1, 15) = 42.4, p < 0.001) (рис. 2*c*). Число коротких эпизодов груминга у 6-месячных крыс линии WAG/Rij было больше, чем у 2-месячных животных этой линии (F(1, 16) = 12.2, p < 0.01) (рис. 2*c*). У крыс Wistar возрастных различий по данному показателю не выявлено (F(1, 14) = 0.21, p = 0.65) (рис. 2*c*).

У крыс линии WAG/Rij, которые принимали этосуксимид, число коротких эпизодов груминга было значимо меньше (F (1, 15) = 52.7, p < 0.001), чем у животных той же линии, потреблявших воду (рис. 2*c*). Между крысами линии WAG/Rij и крысами Wistar, потреблявшими этосуксимид, значимые различия по данному показателю отсутствовали (F (1, 13) = 0.83, p = 0.38) (рис. 2*c*). Препарат не оказывал значимого влияния на число коротких эпизодов груминга у крыс Wistar (F (1, 13) = 0.91, p = 0.40) (рис. 2*c*).

Среднее время реакции (латентный период взятия подкрепления) при обучении у крыс линии WAG/Rij положительно коррелировало с числом стоек (r = 0.67, p < 0.05) (рис. 3*a*) и числом ошибок (r = 0.76, p < 0.05) (рис. 2*b*). При переучивании также были обнаружены значимые положительные корреляции между средним

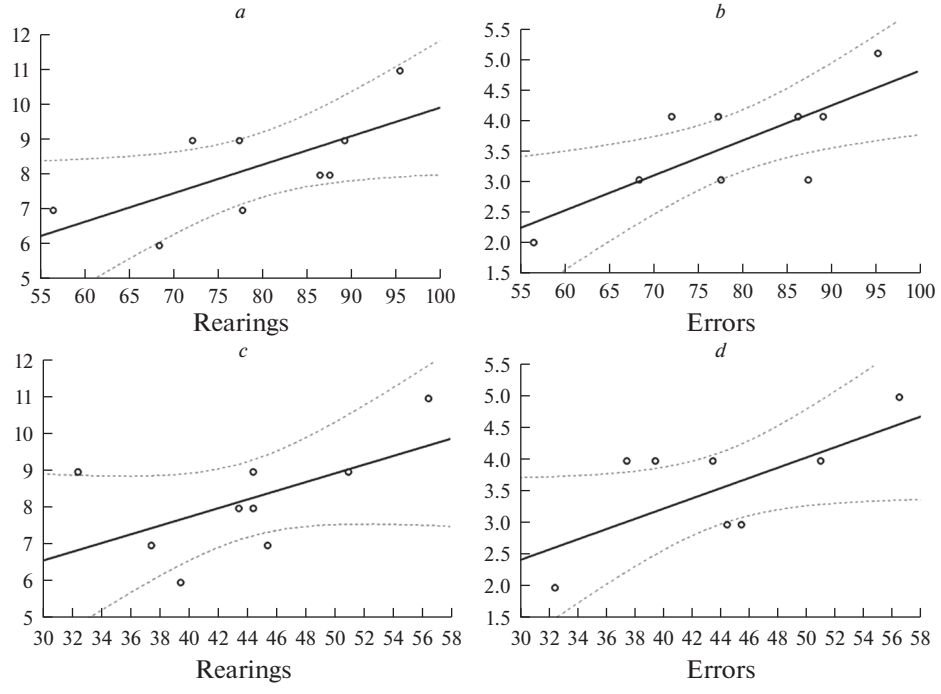


Рис. 3. Связь между латентным периодом взятия пищевого подкрепления и числом стоек и ошибок в сложном лабиринте. По оси абсцисс – латентный период взятия подкрепления при обучении (*a*, *b*) и переучивании (*c*, *d*), по оси ординат – число стоек (*a*, *c*) и ошибок (*b*, *d*). Коэффициенты корреляции Пирсона: (*a*) – $r = 0.67$, $p < 0.05$. (*b*) – $r = 0.76$, $p < 0.05$. (*c*) – $r = 0.58$, $p < 0.05$. (*d*) – $r = 0.65$, $p < 0.05$.

временем реакции и числом стоек ($r = 0.58$, $p < 0.05$) (рис. 3*c*) и числом ошибок ($r = 0.65$, $p < 0.05$) (рис. 3*d*).

Тест на тревожность и пищевую мотивацию

Латентный период нахождения пищи в условиях новой обстановки является показателем, отражающим конфликт пищевой и оборонительной мотивации животных. Для этого показателя значимым по данным двухфакторного дисперсионного анализа являлся фактор “возраст” ($F (1, 30) = 7.52$, $p = 0.01$), незначимым – фактор “линия крыс” ($F (1, 30) = 3.03$, $p = 0.09$). В возрасте 2-х мес. у крыс линии WAG/Rij данный показатель (186.6 ± 32.3 с) статистически значимо не отличался от аналогичного показателя у крыс Wistar (172.6 ± 34.3 с) ($F(1, 15) = 0.04$, $p = 0.84$) (рис. 4*a*). В возрасте 6-ти мес. латентный период нахождения пищевого подкрепления у крыс линии WAG/Rij (139.2 ± 32.3 с) был больше по сравнению с крысами Wistar аналогичного возраста (36.4 ± 34.3 с) ($F(1, 15) = 78.1$, $p < 0.001$) (рис. 4*a*). Данный показатель у 6-месячных крыс линии Wistar был меньше, чем у 2-месячных крыс этой же линии ($F(1, 14)=16.8$, $p < 0.01$) (рис. 4*a*). У крыс линии WAG/Rij различий между 6-месячными и 2-месячными животными по латентному периоду нахождения пищевого подкрепления не обнаружено ($F(1, 16) = 0.71$, $p = 0.41$) (рис. 4*a*).

У крыс линии WAG/Rij, которые потребляли этосуксимид (28.9 ± 7.5 с), латентный период достижения пищевого подкрепления был меньше ($F (1, 15) = 97.3$, $p < 0.001$),

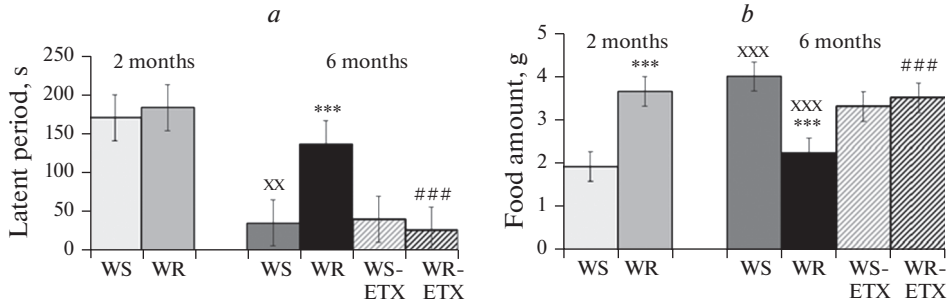


Рис. 4. Латентный период подхода к пище в незнакомом открытом поле (*a*) и количество пищи, съеденное в домашней клетке (*b*) в тесте NSF. WS - крысы Wistar, потреблявшие воду (контрольная группа), WR – крысы линии WAG/Rij, потреблявшие воду (контрольная группа), WS-ETX – 6-месячные крысы Wistar, потреблявшие ETX (экспериментальная группа), WR-ETX – 6-месячные крысы линии WAG/Rij, потреблявшие ETX (экспериментальная группа). *** $p < 0.001$ – у WR по сравнению с WS. ^{xx} $p < 0.01$, $^{xxx}p < 0.001$ – у 6-месячных крыс по сравнению с 2-месячными. $^{###}$ $p < 0.001$ – у опытной группы WR по сравнению с контрольной.

чем у животных той же линии, которые потребляли воду, и не отличался от такового у экспериментальной группы крыс Wistar (42.1 ± 8.0 с) (F (1, 13) = 2.11, $p = 0.17$) (рис. 4*a*). Между группами крыс Wistar, которые потребляли препарат, и крысами Wistar, потреблявшими воду, различий по латентному периоду взятия подкрепления не выявлено (F (1, 13) = 0.34, $p = 057$) (рис. 4*a*).

Количество корма, съеденное в домашней клетке, отражает собственно пищевую мотивацию животных. Для веса съеденного корма по данным двухфакторного дисперсионного анализа незначимыми являются как фактор “возраст” (F (1, 30) = = 2.59, $p = 0.12$), так и фактор “линия крыс” (F (1, 30) = 0.004, $p = 0.95$). Примечательно, что в возрасте 2-х месяцев этот показатель у крыс линии WAG/Rij (3.7 ± 0.2 г) был больше по сравнению с крысами Wistar аналогичного возраста (1.9 ± 0.2 г) (F(1, 15) = 30.5, $p < 0.001$) (рис. 4*b*). В возрасте 6 месяцев, напротив, количество корма, съеденное в домашней клетке, у крыс линии WAG/Rij (2.3 ± 0.2 г) было меньше по сравнению с крысами Wistar аналогичного возраста (4.0 ± 0.2 г) (F(1, 15) = = 41.8, $p < 0.001$) (рис. 4*b*). Вес съеденного корма у 6-месячных крыс Wistar был больше, чем у 2-месячных животных той же линии (F(1, 14) = 42.1, $p < 0.001$). И, напротив, данный показатель у 6-месячных крыс линии WAG/Rij был меньше, чем у 2-месячных крыс той же линии (F(1, 16) = 27.6, $p < 0.001$) (рис. 4*b*).

У крыс линии WAG/Rij, которые принимали этосуксимид (3.5 ± 0.2 г), вес съеденного пищевого подкрепления был больше (F (1, 15) = 21.9, $p < 0.001$), чем у контрольных животных той же линии (2.3 ± 0.2 г) (рис. 4*b*). Отличий от крыс Wistar, которые принимали этосуксимид (F (1, 13) = 0.43, $p = 0.52$), не обнаружено. Между экспериментальной (3.3 ± 0.2 г) и контрольной (4.0 ± 0.2 г) группами крыс Wistar различий по данному показателю также не выявлено (F (1, 13) = 2.11, $p = 0.07$) (рис. 4*b*).

Обнаружены значимые отрицательные корреляции между средним временем реакции (латентным периодом взятия пищевого подкрепления) при выполнении обратной задачи в сложном лабиринте и количеством пищи, потребляемой в домашней клетке в тесте NSF ($r = 0.83$, $p < 0.05$) (рис. 5*a*). Установлена положительная корреляция между днем достижения критерия обученности при выполнении прямой задачи в сложном лабиринте и латентным периодом нахождения пищи в тесте NSF ($r = 0.46$, $p < 0.05$) (рис. 5*b*).

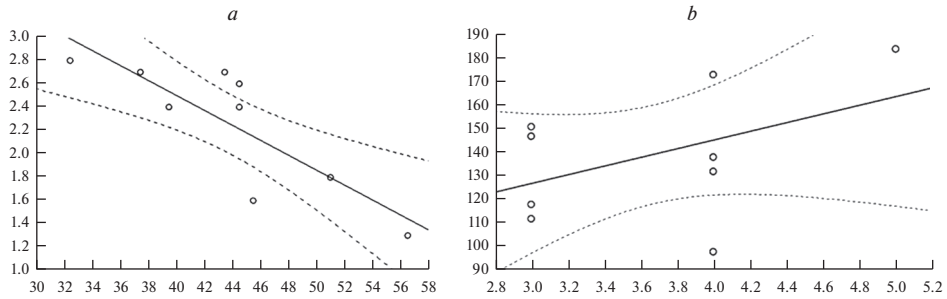


Рис. 5. (*a*) – связь между латентным периодом взятия подкрепления при выполнении обратной задачи в сложном лабиринте и количеством пищи, потребляемой в домашней клетке в тесте NSF. По оси абсцисс – латентный период взятия пищевого подкрепления при переучивании, по оси ординат – количество пищи, потребляемой в домашней клетке. (*b*) – связь между днем достижения критерия обученности при выполнении прямой задачи в сложном лабиринте и латентным периодом подхода к пище в условиях новой обстановки в тесте NSF. По оси абсцисс – день достижения критерия обученности при выполнении прямой задачи в сложном лабиринте, по оси ординат – латентный период подхода к пище в незнакомом открытом поле. Коэффициенты корреляции Пирсона: (*a*) – $r = 0.83$, $p < 0.05$. (*b*) – $r = 0.46$, $p < 0.05$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При выполнении прямой и обратной задачи в сложном лабиринте крысы линии WAG/Rij в возрасте 2-х мес. не отличались от крыс Wistar аналогичного возраста ни по дню достижения критерия обученности, ни по латентному периоду достижения целевого отсека камеры. Эти данные согласуется с данными, полученными в нашей предыдущей работе. Так, в тесте распознавания нового объекта у 2-месячных крыс линии WAG/Rij по сравнению с крысами Wistar аналогичного возраста нарушения эпизодической памяти отсутствовали: индекс распознавания нового объекта у крыс линии WAG/Rij значимо не отличался от аналогичного показателя у крыс Wistar [6, 7]. В возрасте 2-х месяцев у крыс линии WAG/Rij еще отсутствуют выраженные ПВР на ЭЭГ [26, 27]. Кроме того, ранее было показано, что в тесте принудительного плавания значимых различий по длительности иммобильности между 2-месячными крысами линии WAG/Rij и Wistar не выявлено, что говорит об отсутствии симптомов депрессии в поведении у крыс линии WAG/Rij в возрасте 2-х месяцев [13]. Таким образом, в том возрасте, когда у крыс линии WAG/Rij еще нет симптомов абсанс-эпилепсии [26, 27] и коморбидной депрессии [13], отсутствуют нарушения эпизодической памяти [6, 7], а также нарушения обучения и когнитивной гибкости, о чем свидетельствуют данные настоящей работы.

В настоящей работе нами получены данные, указывающие на наличие дефицита обучения и когнитивной гибкости, коморбидного депрессивно-подобного поведения, у 6-месячных крыс линии WAG/Rij. В этом возрасте при обучении навыку отыскания подкрепления в сложном лабиринте (прямая задача) крысы линии WAG/Rij в 1.8 раз медленнее достигали критерия обученности, чем крысы Wistar (рис. 1*a*). Время реакции (латентный период взятия подкрепления) при этом было в 2.5 раза больше у 6-месячных крыс линии WAG/Rij по сравнению с контрольными крысами Wistar (рис. 1*b*). С переделкой навыка (обратная задача) крысы линии WAG/Rij также справились хуже, чем крысы Wistar: крысы линии WAG/Rij в 1.4 раз медленнее достигали критерия обученности (рис. 1*c*) и в 2.7 раз дольше выполняли пищедобывательную реакцию по сравнению с крысами Wistar (рис. 1*d*). Эти данные согласуются с результатами, полученными ранее в аналогичных условиях эксперимента. Так, скорость обучения при выполнении прямой и обратной задачи в

“сложном лабиринте” была значимо меньше, а время реакции, напротив, было значимо больше у крыс опытной группы (WAG/Rij) по сравнению с контрольной (Wistar) [28].

Сходные с крысами линии WAG/Rij нарушения исполнительных функций были обнаружены при инструментальном научении крыс линии GAERS распознаванию зрительных стимулов с пищевым подкреплением [34]. После того, как животные обучились прямой задаче – получать пищевое подкрепление в ответ на определенный визуальный стимул, начиналась фаза реверсивного обучения (переделки навыка), когда “правильный” и “неправильный” стимулы менялись местами. Было показано, что крысы линии GAERS медленнее обучались как прямой (только самцы), так и обратной задаче (и самцы, и самки) по сравнению с контролем (животные, у которых отсутствовали ПВР). Так, животным с абсансными ПВР требовалось больше времени на адаптацию к условиям эксперимента, они делали больше ошибок в тесте по сравнению с контролем [34]. Таким образом, можно говорить о том, что дефицит когнитивной гибкости, который демонстрируют крысы линии GAERS [34] и крысы линии WAG/Rij является характерной особенностью экспериментальных моделей абсанс-эпилепсии.

Обучение животных прямой и обратной задаче по данной методике также проводилось на каинатной модели височной эпилепсии у крыс Wistar. Однако даже по сравнению с крысами линии GAERS, животные, которые подвергались воздействию каиновой кислоты, менее успешно обучались как инструментальному навыку (прямая задача), так и его переделке (обратная задача); 60% из них вообще не достигали критерия обученности даже при обучении исходному навыку. Успех обучения (прямая задача) зависит от способности животного ассоциировать стимул с пищевым вознаграждением и помнить об этом в течение нескольких экспериментальных дней, успех переучивания (обратная задача) зависит от способности животного к торможению ранее выработанной реакции и быстрому научению новому инструментальному навыку [35].

У крыс линии WAG/Rij, которые потребляли этосуксимид, скорость достижения критерия обученности была больше (рис. 1*a*, *c*), а латентный период достижения целевого отсека камеры был меньше (рис. 1*b*, *d*) как при обучении навыку отыскания подкрепления в сложном лабиринте (прямая задача), так и при выполнении этой задачи в условиях зеркально перевернутых перегородок с отверстиями (обратная задача) по сравнению с контрольными животными той же линии. Другими словами, данный антиабсансный препарат улучшает выполнение как прямой, так и обратной задачи у крыс линии WAG/Rij. Это говорит о том, что этосуксимид положительно влияет на обучение и память, а также улучшает когнитивную гибкость – важный компонент исполнительных функций. Эти данные согласуются с результатами наших предыдущих работ, в которых было показано, что этосуксимид улучшает как кратковременную, так и долговременную эпизодическую память в тесте распознавания нового объекта [6, 7].

Такой показатель, как время реакции (латентный период взятия подкрепления), отражает скорость воспроизведения выученной реакции и определяется общим временем, которое крысы проводят в сложном лабиринте. С общим временем, проведенным животным в сложном лабиринте, связано число стоек и число ошибок. Они являются косвенным показателем внимания (избирательная направленность на достижение пищевого подкрепления, расположенного в целевом отсеке камеры) и могут говорить об “отвлечении” животных от выполнения задачи. Другими словами, чем больше латентный период взятия подкрепления – общее время, за которое крысы проходят лабиринт, тем больше они успевают выполнить стоек и тем больше совершают ошибок. Подобное предположение подтверждается корреляционным анализом: среднее время реакции при обучении у крыс линии

WAG/Rij положительно коррелировало с числом стоек ($r = 0.67$, $p < 0.05$) (рис. 3*a*) и числом ошибок ($r = 0.76$, $p < 0.05$) (рис. 3*b*). При переучивании также были обнаружены значимые положительные корреляции между средним временем реакции и числом стоек ($r = 0.58$, $p < 0.05$) (рис. 3*c*), а также числом ошибок ($r = 0.65$, $p < 0.05$) (рис. 3*d*).

В данной работе было установлено отсутствие отличий числа стоек и ошибок в лабиринте между крысами линии WAG/Rij и крысами Wistar в возрасте 2-х мес. (рис. 2*a*, *b*). Это указывает на нормальное воспроизведение выученной реакции у крыс линии WAG/Rij в том возрасте, когда отсутствуют выраженная пик-волновая активность и признаки депрессивно-подобного поведения [13, 26, 27]. В возрасте 6-ти мес., когда пик-волновая активность и депрессивно-подобная симптоматика отчетливо выражена [1–5], число стоек и число ошибок было больше у крыс линии WAG/Rij по сравнению с крысами Wistar, у которых отсутствовала какая-либо патология (рис. 2*a*, *b*). Возможно, что большее по сравнению с “нормальными” крысами Wistar число “отвлечений” у крыс линии WAG/Rij может рассматриваться как показатель пониженной способности к концентрации внимания.

Прием этосуксимида значимо уменьшал как число стоек, так и число ошибок у крыс линии WAG/Rij по сравнению с животными той же линии, которые получали воду без препарата (рис. 2*a*, *b*). Это указывает на то, что антиабсансный препарат, по всей видимости, уменьшал отвлекаемость при решении задачи, то есть улучшал внимание у крыс линии WAG/Rij. Следствием уменьшения отвлекаемости при выполнении пищедобывательной реакции, вероятнее всего, стало уменьшение общего времени, проведенного животными в сложном лабиринте, и действительно, латентный период взятия подкрепления у экспериментальной группы крыс линии WAG/Rij был меньше по сравнению с контрольной группой (рис. 1*c*, *d*).

В ранее проведенном исследовании в аналогичных условиях эксперимента – “сложный лабиринт с пищевым подкреплением” – число ошибок и число стоек также были значимо больше у крыс линии WAG/Rij по сравнению с крысами Wistar [28]. С этими данными согласуются результаты ранее проведенных нами исследований распознавания нового объекта [6, 7] и социального распознавания [7] у крыс линии WAG/Rij. Число посещений пустой части арены и полный пройденный путь во время предъявления объектов для распознавания рассматривались нами как показатели “отвлечения” от исследования объектов, что было интерпретировано как дефицит внимания – направленной активности животного на исследование предъявляемых объектов. В тесте распознавания нового объекта и социального распознавания также было установлено отсутствие избирательной направленности на исследование незнакомого объекта у крыс линии WAG/Rij по сравнению с крысами Wistar, независимо от природы объекта – одушевленный (тест социального распознавания) или неодушевленный (тест распознавания нового объекта). Это также указывает на дефицит внимания у крыс линии WAG/Rij, который, возможно, является одним из поведенческих симптомов депрессии, обусловленный дисфункцией префронтальной коры [36].

Мы предполагаем, что пониженная способность к концентрации внимания (дефицит внимания) у крыс линии WAG/Rij по сравнению с крысами Wistar может быть связан с низким уровнем пищевой мотивации. Чтобы проверить эту гипотезу, мы провели тест NSF на тревожность и пищевую мотивацию. Вес съеденного корма – количество корма, съеденного в домашней клетке, характеризует именно уровень пищевой мотивации [28, 29, 33]. Установлено, что в 2 мес. вес съеденного корма у крыс линии WAG/Rij был больше по сравнению с крысами Wistar, в то время как в 6 мес. данный показатель, напротив, был меньше у крыс линии WAG/Rij по сравнению с крысами Wistar (рис. 4*b*). В возрасте 6-ти мес. более низкое по сравнению с “нормальными” крысами потребление пищи в домашней клетке у крыс ли-

нии WAG/Rij отражает низкий уровень пищевой мотивации. Данные корреляционного анализа подтверждают важность вклада уровня пищевой мотивации в успешное выполнение прямой и обратной задачи в сложном лабиринте. Так, обнаружены значимые отрицательные корреляции между средним временем реакции при выполнении обратной задачи в сложном лабиринте и количеством пищи, потребляемой в домашней клетке в тесте NSF ($r = 0.83$, $p < 0.05$) (рис. 5*a*).

Помещение животного в новое для него "Открытое поле" приводит к конфликту двух мотиваций: пищевой мотивации, которая актуализируется на фоне пищевой депривации, предшествующей проведению теста NSF, и мотивации страха (тревоги), вызываемой умеренным стрессогенным воздействием открытого незнакомого и хорошо освещенного пространства, в центре которого расположено пищевое подкрепление. Скорость, с которой животное достигнет этого пищевого подкрепления, зависит от того, какая из мотиваций является преобладающей: пищевая мотивация или страх, и она оценивается в данном тесте по показателю "латентный период нахождения пищи в условиях новой обстановки" [28, 29, 33]. В возрасте 2-х мес. по данному показателю у крыс линии WAG/Rij по сравнению с крысами Wistar не было различий. Однако в возрасте 6-ти мес. латентный период достижения пищевого подкрепления у крыс линии WAG/Rij был больше по сравнению с крысами Wistar аналогичного возраста (рис. 4*a*). Это свидетельствует либо о сдвиге мотивационного фона у крыс линии WAG/Rij в сторону мотивации страха (что означает повышенную тревожность), либо о пониженной пищевой мотивации, которая является одним из проявлений депрессивного состояния.

На повышенную тревожность во время выполнения задач в сложном лабиринте и тесте NSF указывает повышенное число коротких эпизодов груминга при обучении в сложном лабиринте (рис. 2*c*). Принято считать, что короткие (неполные) реакции груминга отражают уровень тревожности [37]. Однако различий между 6-месячными крысами линии WAG/Rij и крысами Wistar аналогичного возраста в уровне тревожности не было обнаружено ни в одном из тестов, оценивающих тревожность, – свето-темнового выбора, социального взаимодействия и приподнятого крестообразного лабиринта [1]. Повышенный по сравнению с крысами Wistar уровень тревожности в тестах свето-темнового выбора и приподнятого крестообразного лабиринта проявляли только крысы линии WAG/Rij, чувствительные к аудиогенным припадкам [1, 38]. Повышенный уровень тревожности в тестах на тревожность, таких как тест "Свето-темновой выбор" и тест "Открытое поле", был установлен также у крыс линии WAG/Rij по сравнению с крысами Wistar только в возрасте 2-х мес. [13].

На пониженную пищевую мотивацию у крыс линии WAG/Rij указывают: 1) более низкое по сравнению с крысами Wistar количество корма, съеденного в домашней клетке (рис. 4*b*); 2) отрицательные корреляции между средним временем реакции при реверсивном обучении в сложном лабиринте и количеством пищи, потребляемой в домашней клетке в тесте NSF (рис. 5*a*). Интересно также, что нами была обнаружена положительная корреляция между латентным периодом нахождения пищи в тесте NSF и днем достижения критерия обученности при выполнении прямой задачи в сложном лабиринте ($r = 0.46$, $p < 0.05$) (рис. 5*b*). Таким образом, чем ниже уровень пищевой мотивации, тем хуже животные обучаются в сложном лабиринте. Существенно, что в возрасте 2-х мес. у крыс линии WAG/Rij наблюдали более высокое по сравнению с контролем потребление пищи в домашней клетке. Это, вероятно, отражает высокий уровень тревожности 2-месячных животных данной линии, что подтверждают ранее полученные данные [13].

Количество пищи, потребленной в домашней клетке, было больше (рис. 5*b*), в то время как латентный период ее нахождения в "Открытом поле" был меньше (рис. 5*a*) у экспериментальной группы крыс линии WAG/Rij, потреблявших это-

суксимид, по сравнению с контрольной группой крыс той же линии. У крыс линии WAG/Rij, которые потребляли этосуксимид, число коротких эпизодов груминга было значимо меньше, чем у животных той же линии, которые потребляли воду без препарата (рис. 2*c*). Это указывает на то, что этосуксимид увеличивал уровень пищевой мотивации у крыс линии WAG/Rij, то есть способствовал сдвигу мотивационного фона у крыс линии WAG/Rij в сторону преобладания пищевой мотивации над мотивацией страха.

Отсутствие влияния этосуксимида на обучение, переучивание, внимание и пищевую мотивацию у "нормальных" крыс Wistar (рис. 1, 2, 4) может свидетельствовать о том, что данный препарат не обладает собственным влиянием на эти показатели, и он улучшает их у крыс линии WAG/Rij только через подавление пик-волновой активности.

Как у пациентов с эпилепсией, так и у больных депрессией, наблюдают гипофункцию дофаминергической системы мозга, которая играет ключевую роль в механизмах подкрепления, обучения и памяти [39]. Депрессивно-подобное поведение, характерное для крыс линии WAG/Rij (пониженная исследовательская активность в тесте открытого поля, повышенная иммобильность в тесте вынужденного плавания, пониженное потребление и предпочтение раствора сахарозы) [1–3, 5], имеет дофамин-зависимый характер, что подтверждено фармакологическим анализом [2].

Реверсивное обучение в сложном лабиринте, использованное в данной работе, является дофамин-зависимым процессом. С одной стороны, дофамин опосредует синаптическую пластичность в тех областях мозга, которые вовлечены в реверсивное обучение (орбитофронтальная кора, стриатум, прилежащее ядро и миндалина) [40]. Обучение и переучивание навыка выполнения пространственной задачи с положительным подкреплением применялось нами для оценки когнитивной гибкости (cognitive flexibility) – ключевого компонента исполнительных функций. Когнитивная гибкость проявляется в данном случае в том, насколько быстро животное способно затормозить навык прохождения сложного лабиринта по определенной траектории, заданной расположением отверстий в перегородках, и насколько быстро животное способно приобрести навык проходить этот лабиринт по новой траектории, заданной зеркально перевернутыми перегородками с отверстиями. Ожидание вознаграждения, пищевого подкрепления, с которым животное познакомилось во время выполнения прямой задачи, и его прогнозирование являются ключевыми факторами успешной переделки навыка прохождения сложного лабиринта, то есть выполнения обратной задачи. С помощью компьютерного анализа было обнаружено, что фазное выделение дофамина отображает несоответствие между ожидаемым и полученным результатом вознаграждения (ошибки прогнозирования вознаграждения (ОПВ), reward prediction errors (RPE)). Показано, что оптогенетическое возбуждение дофаминовых нейронов в вентральной области покрышки (ventral tegmental area, VTA) или компактной части (pars compacta) черной субстанции (Substantia nigra) (pcSn) среднего мозга улучшает эффективность пространственного реверсивного обучения [41, 42]. Результаты наблюдений за пациентами с синдромом дефицита внимания и гиперактивности, принимавшими метилфенидат (Риталин), показывают, что они лучше справляются с задачами на реверсивное обучение [43]. Напротив, фармакологическое истощение дофамина в стриатуме мармозеток приводило к грубым нарушениям выполнения обратной задачи при переделке навыка [44]. Методом быстрой циклической вольтамперометрии было зарегистрировано увеличение фазового выделения дофамина в прилежащем ядре (nucleus accumbens, NAcc) у крыс в ответ на предъявление неожиданного вознаграждения (положительная ошибка прогнозирования, positive prediction error) [45] Кроме этого, снижение уровня дофамина в NAcc у крыс вызывало нару-

шение реверсивного обучения [46]. Таким образом, из изложенного материала можно сделать вывод о том, что ключевую роль в контроле реверсивного обучения играют подкорковые структуры мозга, являющиеся частью мезо-кортико-лимбической дофаминергической системы. Так, фармакологическое истощение дофамина в орбитофронтальной коре не оказывает влияния на когнитивную гибкость у мармозеток [47]. Результаты, полученные в данной работе, – дефицит когнитивной гибкости и пищевой мотивации, повышенная “отвлекаемость” у 6-месячных крыс линии WAG/Rij, хорошо укладываются в существующие представления о недостаточности мезо-кортико-лимбической дофаминергической системы мозга крыс линии WAG/Rij [1, 2, 48]. В возрасте 2-х мес., когда фенотипические проявления абсанс-эпилепсии [26, 27] и депрессии [13] у крыс линии WAG/Rij отсутствуют, снижение уровня дофамина было выявлено только в префронтальной коре [13]. Вероятно, этих изменений было недостаточно, чтобы вызвать нарушения когнитивной гибкости, выявленное в настоящей работе, и эпизодической памяти, показанное в наших предыдущих работах [6, 7]. В возрасте 6-ти мес., когда пик-волновая активность и симптомы депрессии хорошо выражены, гипофункция мезо-кортико-лимбической дофаминергической системы мозга усиливается, что проявляется дефицитом дофамина в стриатуме и прилежащем ядре [48]. Вероятнее всего, что эти изменения у крыс линии WAG/Rij проявляются симптомами депрессии [1–3, 5], а также нарушениями обучения и когнитивной гибкости, установленными в данной работе, и эпизодической памяти, показанными в наших предыдущих работах [6, 7].

Таким образом, данные, полученные в настоящей работе, позволяют предположить наиболее вероятный сценарий развития дефицита когнитивной гибкости – ключевого компонента исполнительных когнитивных функций при реверсивном обучении в сложном лабиринте у крыс линии WAG/Rij. Нарушения когнитивной гибкости могут быть следствием пониженной пищевой мотивации как одного из симптомов депрессии, коморбидной абсанс-эпилепсии и обусловленной дефицитом мезо-кортико-лимбической дофаминергической системы, которая проявляется у крыс линии WAG/Rij в возрасте 6-ти мес.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации на 2019–2021 гг.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (К.Ю.С.); постановка экспериментов, сбор данных (К.Ю.С., Е.А.Ф., А.Б.Ш.); обработка данных (Е.А.Ф.); написание и редактирование рукописи (Е.А.Ф., К.Ю.С.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sarkisova K, van Luijtelaar G* (2011) The WAG/Rij strain: a genetic animal model of absence epilepsy with comorbidity of depression. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 35(4): 854–876.
https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.11.010
2. *Sarkisova KYu, Kulikov MA, Midzianovskaia IS, Folomkina AA* (2007) Dopamine-dependent character of depressive-like behavior in WAG/Rij rats with genetic absence epilepsy. Zh Vyssh

Nerv Deiat Im IP Pavlova 57(1): 91–102.
https://doi.org/10.1007/s11055-008-0017-z

3. *Sarkisova KY, Midzyanovskaya IS, Kulikov MA* (2003) Depressive-like behavioral alterations and c-fos expression in the dopaminergic brain regions in WAG/Rij rats with genetic absence epilepsy. Behav Brain Res 144: 211–226.
https://doi.org/10.1016/s0166-4328(03)00090-1
4. *van Luijtelaar G, Zobeiri M* (2014) Progress and outlooks in a genetic absence epilepsy model (WAG/Rij). Curr Med Chem 21(6): 704–721.
https://doi.org/10.2174/0929867320666131119152913
5. *Sarkisova KYu, Kuznetsova GD, Kulikov MA, van Luijtelaar G* (2010) Spike–wave discharges are necessary for the expression of behavioral depression-like symptoms. Epilepsia 51: 146–160.
https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02260.x
6. *Leo A, Citraro R, Tallarico M, Iannone M, Fedosova E, Nesci V, De Sarro G, Sarkisova K, Russo E* (2019) Cognitive impairment in the WAG/Rij rat absence model is secondary to absence seizures and depressive-like behavior. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 94: 109652.
https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.109652
7. *Fedosova EA, Shatskova AB, Sarkisova KY* (2021) Ethosuximide increases exploratory motivation and improves episodic memory in the novel object recognition test in WAG/Rij rats with genetic absence epilepsy. Neurosci Behav Physiol 51(4): 501 – 512.
https://doi.org/10.1007/s11055-021-01097-z
8. *Jones NC, Salzberg MR, Kumar G, Couper A, Morris MJ, O'Brien TJ* (2008) Elevated anxiety and depression-like behavior in a rat model of genetic generalized epilepsy, suggesting common causation. Exp Neurol 209: 254–260.
https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.09.026
9. *Cheng D, Yan X, Gao Z, Xu K, Zhou X, Chen Q* (2017) Common and distinctive patterns of cognitive dysfunction in children with benign epilepsy syndromes. Pediatr Neurol 72: 36–41.
https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2016.12.005
10. *Conradi HJ, Ormel J, de Jonge P* (2011) Presence of individual (residual) symptoms during depressive episodes and periods of remission: a 3-year prospective study. Psychol Med 41(6): 1165–1174.
https://doi.org/10.1017/S0033291710001911
11. *Karson A, Utkan T, Balc F, Arıcıoglu F, Ates N* (2012) Age-dependent decline in learning and memory performances of WAG/Rij rat model of absence epilepsy. Behav Brain Funct 8: 51.
https://doi.org/10.1186/1744-9081-8-51
12. *Inoue M, Peeters BWMM, van Luijtelaar ELJM, Vossen JMH, Coenen AML* (1990) Spontaneous occurrence of spike-wave discharges in five inbred strains of rats. Physiology and Behavior 48(1): 199–201.
https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90285-c
13. *Fedosova EA, Sarkisova KYu, Kudrin VS, Narkevich VB, Bazyan AS* (2015) Behavioral and Neurochemical Characteristics of Two Months Old WAG/Rij Rats with Genetic Absence Epilepsy. Int J Clin Exp Neurol 3(2): 32–44.
https://doi.org/10.12691/ijcen-3-2-2
14. *Hammar A, Ardal G* (2009) Cognitive functioning in major depression – a summary. Front Hum Neurosci 3: 26.
https://doi.org/10.3389/neuro.09.026.2009
15. *Yang T, Zhao G, Mao R, Huang J, Xu X, Su Y, Zhu N, Zhou R, Lin X, Xia W, Wang F, Liu R, Wang X, Huang Z, Wang Y, Hu Y, Cao L, Yuan S, Wang Z, Lam RW, Chen J, Fang Y* (2018) The association of duration and severity of disease with executive function: Differences between drug-naïve patients with bipolar and unipolar depression. J Affective Disorders 238: 412–417.
https://doi.org/10.1016/j.jad.2018.05.051
16. *Izquierdo A, Brigman J, Radke A, Rudebeck P, Holmes A* (2016) The neural basis of reversal learning: An updated perspective. Neuroscience 345: 12–26.
https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.03.021
17. *Ghahremani DG, Monterosso J, Jentsch JD, Bilder RM, Poldrack RA* (2010) Neural components underlying behavioral flexibility in human reversal learning. Cereb Cortex 20: 1843–1852.
https://doi.org/10.1093/cercor/bhp247
18. *Machado CJ, Bachevalier J* (2007) The effects of selective amygdala, orbital frontal cortex or hippocampal formation lesions on reward assessment in nonhuman primates. Eur J Neurosci 25: 2885–2904.
https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05525.x
19. *Chudasama Y, Daniels TE, Gorrin DP, Rhodes SE, Rudebeck PH, Murray EA* (2013) The role of the anterior cingulate cortex in choices based on reward value and reward contingency. Cereb

Cortex 23: 2884–2898.
https://doi.org/10.1093/cercor/bhs266

20. *Churchwell JC, Morris AM, Heurtelou NM, Kesner RP* (2009) Interactions between the prefrontal cortex and amygdala during delay discounting and reversal. Behav Neurosci 123: 1185–1196.
https://doi.org/10.1037/a0017734
21. *Volkow ND, Fowler JS* (2000) Addiction, a Disease of Compulsion and Drive: Involvement of the Orbitofrontal Cortex. Cereb Cortex 10 (3): 318–325.
https://doi.org/10.1093/cercor/10.3.318
22. *Braun S, Hauber W* (2011) The dorsomedial striatum mediates flexible choice behavior in spatial tasks. Behav Brain Res 220 (2): 288–293.
https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.02.008
23. *Stern CE, Passingham RE* (1995) The nucleus accumbens in monkeys (Macaca fascicularis). Exp Brain Res 106: 239–247.
https://doi.org/10.1007/BF00241119
24. *Dalton GL, Phillips AG, Floresco SB* (2014) Preferential Involvement by Nucleus Accumbens Shell in Mediating Probabilistic Learning and Reversal Shifts. J Neurosci 34(13): 4618–4626.
https://doi.org/10.1007/s00213-011-2246-z
25. *Wassum KM, Izquierdo A* (2015) The basolateral amygdala in reward learning and addiction. Neurosci Biobehav Rev 57: 271–283.
https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.08.017
26. *Coenen AM, van Luijtelaar EL* (1987) The WAG/Rij rat model for absence epilepsy: age and sex factors. Epilepsy Res 1: 297.
https://doi.org/10.1016/0920-1211(87)90005-2
27. *Gabova AV, Sarkisova KYu, Fedosova EA, Shatskova AB, Morozov AA* (2020) Developmental Changes in Peak-Wave Discharges in WAG/Rij Rats with Genetic Absence Epilepsy. Neurosci Behav Physiol 50: 245–252.
https://doi.org/10.1007/s11055-019-00893-y
28. *Malyshev AV, Zakharov AM, Sarkisova KYu, Dubynin VA* (2012) Reverse learning in WAG/Rij rats with depression-like behavior. Zh Vyssh Nerv Deiat Im IP Pavlova 62(5): 580–590.
https://doi.org/10.1007/s11055-013-9869-y
29. *Bessa JM, Mesquita AR, Oliveira M, Pêgo JM, Cerqueira JJ, Palha JA, Almeida OF, Sousa N* (2009) A trans-dimensional approach to the behavioral aspects of depression. Front Behav Neurosci 3: 1–7.
https://doi.org/10.3389/neuro.08.001.2009
30. *Саркисова КЮ, Куликов МА, Фоломкина АА* (2011) Оказывает ли антиабсансный препарат этосуксимид антидепрессантный эффект? Журн высш нервн деятельн им ИП Павлова 2: 227–235. [*Sarkisova KJu, Kulikov MA, Folomkina AA* (2011) Does antiabsence drug ethosuximide exert antidepressant effect? Zh Vyssh Nerv Deiat Im IP Pavlova 2: 227–235. (In Russ)].
31. *Zhang K, Jia G, Xia L, Du J, Gai G, Wang Z, Cao L, Zhang F, Tao R, Liu H, Hashimoto K, Wang G* (2021) Efficacy of anticonvulsant ethosuximide for major depressive disorder: a randomized, placebo-control clinical trial. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 271(3): 487–493.
https://doi.org/10.1007/s00406-020-01103-4
32. *Blumenfeld H, Klein JP, Schridde U, Vestal M, Rice T, Khera DS, Bashyal C, Giblin K, Paul-Laughinghouse C, Wang F, Phadke A, Mission J, Agarwal RK, Englot DJ, Motelow J, Nersesyan H, Waxman SG, Levin AR* (2008) Early treatment suppresses the development of spike-wave epilepsy in a rat model. Epilepsia 49(3): 400–409.
https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01458.x
33. *Mazarati A, Jones NC, Galanopoulou AS, Harte-Hargrove LC, Kalynchuk LE, Lenck-Santini PP, Medel-Matus JS, Nehlig A, de la Prida LM, Sarkisova K, Veliskova J* (2018) A companion to the preclinical common data elements on neurobehavioral comorbidities of epilepsy: a report of the TASK3 behavior working group of the ILAE/AES Joint Translational Task Force. Epilepsia Open 3(1): 24–52.
https://doi.org/10.1002/epi4.12236
34. *Roebuck A, An L, Marks W, Sun N, Snatch T, Howland J* (2020) Cognitive Impairments in Touchscreen-based Visual Discrimination and Reversal Learning in Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg. Neuroscience 1(430): 105–112.
https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.01.028
35. *Carron S, Dezsi G, Ozturk E, Nithianantharajah J, Jones NC* (2019) Cognitive deficits in a rat model of temporal lobe epilepsy using touchscreen-based translational tools. Epilepsia 60(8): 1650–1660.
https://doi.org/10.1111/epi.16291

36. *Clark L, Cools R, Robbins TW* (2004) The neuropsychology of ventral prefrontal cortex: decision-making and reversal learning. Brain Cogn 55(1): 41–53.
https://doi.org/10.1016/S0278-2626(03)00284-7
37. *Kalueff AV, Tuohimaa P* (2005) The grooming analyses algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. J Neurosci Methods 143(2): 69–77.
https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2004.10.001
38. *Sarkisova KYu, Kulikov MA* (2006) Behavioral characteristics of WAG/Rij rats susceptible and non-susceptible to audiogenic seizures. Behav Brain Res 166: 9–18.
https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.07.024
39. *Shohamy D, Adcock R* (2010) Dopamine and adaptive memory. Trends Cogn Sci 14: 464–472.
https://doi.org/10.1016/j.tics.2010.08.002
40. *Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, Di Filippo M* (2007) Dopamine mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. Trends Neurosci 30: 211–219.
https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.001
41. *Adamantidis AR, Tsai HC, Boutrel B, Zhang F, Stuber GD, Budygin EA* (2011) Optogenetic interrogation of dopaminergic modulation of the multiple phases of reward-seeking behavior. J Neurosci 31: 10829–10835.
https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2246-11.2011
42. *Rossi MA, Sukharnikova T, Hayrapetyan VY, Yang L, Yin HH* (2013) Operant self-stimulation of dopamine neurons in the substantia nigra. PLoS One 8: e65799.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065799
43. *Clatworthy PL, Lewis SJ, Brichard L, Hong YT, Izquierdo D, Clark L* (2009) Dopamine release in dissociable striatal subregions predicts the different effects of oral methylphenidate on reversal learning and spatial working memory. J Neurosci 29: 4690–4696.
https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3266-08.2009
44. *Clarke HF, Hill GJ, Robbins TW, Roberts AC* (2011) Dopamine, but not serotonin, regulates reversal learning in the marmoset caudate nucleus. J Neurosci 31: 4290–4297.
https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5066-10.2011
45. *Klanker M, Sandberg T, Joosten R, Willuhn I, Feenstra M, Denys D* (2015) Phasic dopamine release induced by positive feedback predicts individual differences in reversal learning. Neurobiol Learn Mem 125: 135–145.
https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.08.011
46. *Taghzouti K, Louilot A, Herman JP, Le Moal M, Simon H* (1985) Alteration behavior, spatial discrimination, and reversal disturbances following 6-hydroxy-dopamine lesions in the Nucleus accumbens of the rat. Behav Neural Biol 44: 354–363.
https://doi.org/10.1016/s0163-1047(85)90640-5
47. *Clarke HF, Walker SC, Dalley JW, Robbins TW, Roberts AC* (2007) Cognitive inflexibility after prefrontal serotonin depletion is behaviorally and neurochemically specific. Cereb Cortex 17: 18–27.
https://doi.org/10.1093/cercor/bhj120
48. *Саркисова КЮ, Куликов МА, Кудрин ВС, Мидзяновская ИС, Бирюкова ЛМ* (2014) Возрастные изменения в поведении, в содержании моноаминов, их метаболитов и в плотности D1 и D2 дофаминовых рецепторов в структурах мозга у крыс линии WAG/Rij с депрессивноподобной патологией. Журн высш нервн деятельн им ИП Павлова 64(6): 668–685. [*Sarkisova KJu, Kulikov MA, Kudrin VS, Midzyanovskaya IS, Birioukova LM* (2014) Age-related changes in behavior, in monoamines and their metabolites content, and in density of D1 and D2 dopamine receptors in the brain structures of WAG/Rij rats with depression-like pathology. Zh Vyssh Nerv Deiat Im IP Pavlova 64(6): 668–685. (In Russ)].
https://doi.org/10.7868/S0044467714060094

Ethosuximide Improves Cognitive Flexibility during Reversal Learning in WAG/Rij Rats with Absence Epilepsy and Comorbid Depression

E. A. Fedosova[a], *, A. B. Shatskova[a], and K. Yu. Sarkisova[a]

[a] *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS, Moscow, Russia*
**e-mail: ekaterina5fedosova@rambler.ru*

The WAG/Rij rat strain is a valid model for absence epilepsy with comorbidity of depression. Absence epilepsy, along with symptoms of depression, is known to be associated with cognitive impairments, such as deficits in attention and cognitive flexibility, which

is a critical executive function. The aim of the present study was to find out whether there are cognitive flexibility impairments in WAG/Rij rats and whether they are associated with absence epilepsy and comorbid depression. To identify the differences in cognitive flexibility, reversal learning (acquisition and reversal phase) in the complex maze with food reinforcement was compared in WAG/Rij rats at the age of 2 months, when symptoms of absence epilepsy and comorbid depression are absent, and at the age of 6 months, when the pathologic phenotype is fully expressed. Food motivation was assessed in the novelty-suppressed feeding (NSF) test. Ethosuximide (300 mg/kg/day, 17 days) was used to suppress symptoms of absence epilepsy and depression-like comorbidity in WAG/Rij rats. Wistar rats were used as controls. It has been found that at the age of 6 months, WAG/Rij rats performed the learning and reversal tasks more slowly, made more errors, and exhibited reduced food motivation in the NSF test (longer latency of the approach to food in an unfamiliar open field, and the smaller the amount of food consumed in the home cage) compared with Wistar rats. At the age of 2 months, WAG/Rij rats did not differ from Wistar rats in any of the measures. Ethosuximide improved reversal learning, decreased the number of errors, and increased food motivation in 6-months-old WAG/Rij rats. Ethosuximide didn't exert significant effects on reversal learning in Wistar rats. In 6-month-old WAG/Rij rats, a positive correlation ($r = 0.66$; $p < 0.05$) was found between the amount of food consumed in the home cage (food motivation measure) and the rate of achievement of the learning criterion when performing the reversal task (cognitive flexibility measure). Results suggest that cognitive flexibility impairments may be a consequence of reduced food motivation as one of the symptoms of depression co-morbid to absence epilepsy.

Keywords: absence epilepsy, WAG/Rij rats, comorbid depression, food motivation, reversal learning, cognitive flexibility

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2022, том 108, № 1, с. 59–84

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ КАК СПОСОБ КОРРЕКЦИИ НАРУШЕНИЙ НЕЙРОГЕНЕЗА ВО ВЗРОСЛОМ МОЗГЕ В МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

© 2022 г.
А. В. Чаплыгина[1], Д. Ю. Жданова[1], В. И. Ковалев[1], Р. А. Полтавцева[2, *], Н. И. Медвинская[1], Н. В. Бобкова[1]

[1]Институт биофизики клетки Российской академии наук, Пущино, Россия

[2]Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова Министерства Здравоохранения РФ, Москва, Россия

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

Поступила в редакцию 20.09.2021 г.
После доработки 18.10.2021 г.
Принята к публикации 19.10.2021 г.

В основу настоящей работы положена гипотеза о нарушении нейрогенеза в мозге при болезни Альцгеймера (БА), приводящем к некомпенсированной гибели нейронов и ухудшению памяти. Предполагается, что лечение может быть осуществлено путем активации эндогенного нейрогенеза при помощи клеточной терапии. В нашем исследовании для внутримозговой трансплантации использовали мезенхимальные стволовые клетки (МСК), выделенные из Вартонова студня пупочного канатика человека, имеющие ряд существенных преимуществ по сравнению с МСК, выделенными из других тканей. Эксперименты выполнены на трансгенных (Tg) 8–9-месячных самках мышей линии 5XFAD – модели наследственной формы БА. Для оценки эффектов трансплантации МСК во фронтальную кору головного мозга анализировались состояние пространственной памяти в сопоставлении с морфофункциональными характеристиками ниш взрослого нейрогенеза – субгранулярной зоны зубчатой фасции гиппокампа (SGZ) и субвентрикулярной зоны боковых желудочков головного мозга (SVZ), височной зоны неокортекса и CA1/CA3 полей гиппокампа – структур, ответственных за обучение и память. Анализировали иммунопозитивность к BrdU и к маркерам нейрональной дифференцировки: нестину, даблкортину, 3-бета-тубулину, NeuN, MAP2 и GFAP. Tg мыши характеризовались нарушением соотношения интенсивности пролиферативной активности в SGZ/SVZ и снижением нейрональной плотности в коре головного мозга и гиппокампе. Позитивный эффект МСК на память мышей проявился через два месяца после трансплантации. На этом же сроке МСК были обнаружены только в мозге Tg животных. Под влиянием МСК у Tg и nTg мышей возрастала плотность BrdU+ позитивных клеток в нишах взрослого нейрогенеза, однако только в гиппокампе Tg мышей отмечалось снижение числа амилоидных бляшек, повышение плотности нейронов и иммунопозитивности к синаптофизину, а также снижение числа клеток с апоптозом. Позитивное действие МСК у Tg животных проявилось в гиппокампе – структуре, отдаленной от места трансплантации клеток во фронтальной коре, что свидетельствует о паракринном действии МСК, валидности химерной модели и перспективах клинического использования МСК для лечения БА.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, нейрогенез, мезенхимальные стволовые клетки, трансгенные самки линии 5XFAD

DOI: 10.31857/S0869813922010046

Несмотря на то, что в мировой литературе накоплен значительный экспериментальный материал по изучению морфологических, биохимических и физиологических характеристик болезни Альцгеймера (БА), в настоящее время не существует однозначной концепции молекулярных основ патогенеза данного заболевания и адекватных подходов к его лечению и профилактике [1]. По прогнозам ВОЗ, если не будет найдено эффективное лечение, то к 2050 г. число заболевших деменциями, где основную долю составляют больные БА, приблизится к 131 млн человек [2].

Нейрофармакология, включающая развитие генной и клеточной терапии, становится на ближайшие 20 лет одним из приоритетов государственной политики РФ, согласно Национальной технологической инициативе [3]. Число публикаций по этой теме за последние 5 лет возросло более чем в 30 раз [PubMed].

Растворимые олигомеры амилоидного β-пептида (AβOs) и внутриклеточные фибриллы Тау-белка вызывают окислительный стресс в нейронах и способствуют повреждению синапсов на ранних этапах развития БА, что впоследствии ведет к нейродегенерации и потере памяти [4, 5]. По единодушному признанию ученых и клиницистов причиной развития нейродегенеративных заболеваний является некомпенсируемая гибель нейронов [6], поэтому предполагается, что клеточная терапия для стимуляции эндогенного нейрогенеза может быть эффективным подходом. Кроме того, большинство патологий имеет комплексную этиологию, поэтому использование мезенхимальных стволовых клеток (МСК), способных оказывать воздействие на разные аспекты этих заболеваний, весьма целесообразно и может рассматриваться как потенциальное терапевтическое средство для многих нейропатологий – от нарушений белого вещества у недоношенных младенцев до нейродегенеративных заболеваний у пожилых людей [7–9].

Однако до настоящего времени отсутствует ясное понимание молекулярно-клеточных механизмов, участвующих в терапевтических эффектах МСК, что является серьезным препятствием их внедрения в клиническую практику [10]. Известно, что МСК способны оказывать разнообразные эффекты, поскольку обладают как противовоспалительными свойствами, так и способностью выделять трофические факторы. МСК, как полагают, проявляют свои регенеративные способности путем адаптации их секретома к патологическим условиям в мозге, пораженном нейродегенеративным процессом, способствуя эндогенному восстановлению повреждений посредством аутокринной и паракринной сигнализации [7, 11]. МСК способны направляться в пораженные области, что подразумевает их потенциальное использование в качестве средств для введения терапевтических агентов. Кроме того, использование МСК имеет незначительный риск активации иммунной системы реципиента из-за низкой экспрессии рецепторов основного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I, отсутствия рецепторов МНС класса II и отсутствия костимулирующих белков (например, CD40, CD80 и CD86) на плазматической мембране [12, 13]. МСК могут быть получены из широкого спектра тканей, включая костный мозг, жировую ткань, пульпу зуба, Вартонов студень пупочного канатика, пуповинную кровь [14, 15]. На сегодняшний день МСК, выделенные из постнатального костного мозга (BM-MSC), представляют собой наиболее широко изученную популяцию МСК, полученных от взрослого человека, с учетом их возможного использования в различных терапевтических приложениях и являются “золотым стандартом” в МСК-трансплантологии. Однако МСК, полученные из костного мозга, имеют ряд ограничений, главным образом, связанных с их проблематичным выделением, культивированием и использованием. В последние годы МСК, выделенные из Вартонова студня пупочного канатика (WJ-MSC), стали альтернативным источником BM-MSC, благодаря их легкой изоляции, а также иммуно- и морфофункциональным характеристикам. Будучи фенотипически схожими с МСК, получаемыми из тканей взрослого человека, WJ-MSC демонстрируют иной профиль экспрессии

генов, связанных с адгезией клеток, пролиферацией и функционированием иммунной системы. Трансплантация подтверждает их иммуномодулирующее действие на Т-клетки, аналогичное BM-MSC. Кроме того, WJ-MSC сверхэкспрессируют гены, участвующие в нейротрофической поддержке, и их секретом индуцирует созревание нейронов клеток нейробластомы SH-SY5Y в большей степени, чем BM-MSC. Существенным преимуществом по сравнению с BM-MSC и МСК из других тканей является отсутствие у WJ-MSC риска злокачественного перерождения, что делает их привлекательным кандидатом для клеточной терапии при нейродегенеративных и иммуноопосредованных расстройствах центральной нервной системы [16, 17]. В спектр активности МСК входят и выделяемые ими экзосомы, которые показывают стабильность в циркуляции, хорошую биосовместимость, низкую токсичность и иммуногенность [18], поддерживают динамическую иммуномодулирующую активность и являются переносчиками липидов, белков, факторов роста, цитокинов, хемокинов и нуклеиновых кислот секретома родительских МСК [19] и способны при интраназальном введении улучшать память у животных с моделью БА [20], в связи с этим, именно WJ-MSC были использованы для мозговой трансплантации в нашем исследовании.

Подавляющее большинство работ по изучению эффектов и механизмов действия МСК проведено на клеточных культурах ткани мозга эмбрионов, зародышей и новорожденных мышей с генетическими нейропатологиями, или hiPSC пациентов с нейродегенеративными заболеваниями [21–24]. Несмотря на всю привлекательность данного подхода, очевидно, что культура не воспроизводит всех условий развития нейродегенеративного процесса в стареющем мозге, а, следовательно, спектр действия кокультивируемых МСК может быть существенно изменен, затрудняя трансляцию полученных данных на мозг человека. Поэтому большой интерес вызывают исследования на химерных моделях *in vivo*, которые приближают исследование к реальным условиям клинического использования этих клеток. Действительно, имеются сообщения о различных благоприятных эффектах после трансплантации МСК человека в модели нейродегенеративных заболеваний, таких как БА, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз или острый инсульт мозга у грызунов [25–29]. Их действие проявилось в выделении нейротрофических факторов и защите клеток от апоптоза, в усилении нейрогенеза, в модуляции воспаления или аномальном клиренсе агрегатов бета-амилоидного белка [15]. Однако исследования МСК в условиях моделирования разных нейропатологий *in vivo* часто ограничиваются изучением эффективности разных способов введения этих клеток, включая системное, внутримозговое или интраназальное, используя короткие сроки после трансплантации, или исследованием состояния ткани мозга только в месте введения МСК без анализа состояния самих трансплантированных клеток [25], что, по-видимому, обусловлено широко распространенным представлением о весьма ограниченном времени жизни как клеток после трансплантации, так и выделяемых ими факторов [30]. Это противоречит поведенческим наблюдениям. Ранее мы показали, что позитивные эффекты на память животных с индуцированной нейродегенерацией альцгеймеровского типа развиваются в отдаленные сроки после трансплантации [31, 32]. Лишь отдельные исследования посвящены изучению состояния МСК человека и ткани мозга животных с моделями нейродегенеративных заболеваний, в частности, БА, проведенные в длительных хронических опытах [26].

В основу нашей работы была положена гипотеза, что нарушение нейрогенеза во взрослом организме в основных мозговых нишах является одним из ключевых событий в ухудшении процессов обучения и памяти при БА, а, следовательно, и лечение данной патологии может быть осуществлено за счет активации собственного эндогенного нейрогенеза. Использование МСК для модуляции эндогенного ней-

рогенеза у взрослых может оказать значительное влияние на будущие стратегии лечения БА [9, 33]. Однако несмотря на большой интерес к этой проблеме [25, 26, 29], ряд вопросов остаются не до конца выясненными, в частности, соотношение интенсивности пролиферативной активности в нишах нейрогенеза на модели БА и влияние длительной трансплантации МСК на этот процесс. Поэтому в нашем комплексном исследовании в длительных хронических экспериментах с использованием широко распространенной модели БА на Tg мышах 5XFAD проведено детальное изучение молекулярно-клеточных эффектов трансплантации МСК, выделенных из Вартонова студня пупочного канатика человека, с акцентом на изучение зон взрослого нейрогенеза (SVZ и SGZ), неокортекса и полей гиппокампа.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

Были отобраны 8–9-месячные трансгенные самки линии 5XFAD ($n = 34$) и нетрансгенные nTg контрольные животные ($n = 34$). Генотипирование мышей 5XFAD проводили с помощью ПЦР анализа ДНК, экстрагируемой из биопсии уха, с использованием праймеров 5'-AGGACTGACCACTCGACCAG-3' и 5'-CGGGGGTCTAGTTCTGCAT-3'. Мышей содержали по 6 особей в клетке в условиях естественной освещенности, со свободным доступом к воде и пище.

Выделение, культивирование и мозговая трансплантация МСК

Первичную культуру мезенхимальных стромальных клеток выделяли из Вартонова студня пупочного канатика, полученного после операции кесарево сечения от здоровых обследованных рожениц. Забор материала осуществляли с письменного информированного согласия доноров. Дальнейшее выделение и культивирование мезенхимальных стромальных клеток проводили в соответствии с протоколом, описанным нами ранее [20]. Кратко: МСК культивировали в питательной среде, содержащей DMEM:F12 (1 : 1,Gibco, США), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), 2 мМ L-глутамина (ПанЭко, РФ), 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco, США), в культуральных флаконах (75 см^2, Corning, США) при 37°C в атмосфере 5% CO_2. Смену среды проводили каждые 3-и сутки на 50–100%, пассировали при достижении конфлюэнтности 80%.

Для исследований использовали культуру МСК 3-го пассажа.

Анализ экспрессии поверхностных маркеров мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток – CD90, CD105, CD73, CD13, CD44 и маркеров гемапоэтических клеток CD14, CD34, CD45, проводили с помощью проточной цитометрии, измерения проводили на приборе FACSCalibur (BD, США). Для анализа способности исследуемых клеток к разнонаправленной дифференцировке и доказательства их мультипотентности проводили направленную дифференцировку в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях.

Трансплантацию суспензии МСК проводили в стерильных условиях под нембуталовым наркозом (40 мг/кг, в/б) с применением 0.5%-ного раствора новокаина для местного обезболивания при скальпировании. Введение клеток животным проводили через трепанационное отверстие в черепе в паренхиму фронтальной коры по стереотаксическим координатам AP +2, L 3; H 2.5 [34] в количестве 50000 клеток в 5 мкл с помощью микрошприца Гамильтона. Установлено, что при интрапаренхимальной трансплантации МСК в кору происходит минимальная травматизация мозга реципиента [35]. Контрольным Tg и nTg мышам вводили физиологический раствор по тем же координатам и в том же объеме.

Поведенческие эксперименты

Обучение пространственному навыку в водном лабиринте Морриса с последующим тестированием пространственной памяти проводили через 1 и 2 месяца после трансплантации. Круглый бассейн диаметром 80 см, заполненный водой (23°C) на глубину 30 см, условно подразделяли на четыре равных сектора, один из которых, таргетный сектор, содержал скрытую спасательную платформу (диаметром 5 см), погруженную от поверхности на глубину 0.5 см. Для исключения визуального обнаружения платформы воду в бассейне забеляли раствором сухого молока. Обучение животных пространственному навыку осуществляли на протяжении 5-ти дней, по два сеанса утром и вечером. Через сутки после окончания обучения проводили тестирование уровня пространственной памяти в течение 1 мин при отсутствии спасательной платформы. Состояние памяти оценивали по способности животного узнавать сектор бассейна, в котором при обучении располагалась спасательная платформа. Для этого анализировали число заходов в каждый сектор бассейна, выраженное в процентах, и время пребывания мышей в каждом секторе.

BrdU введение

Животные получали внутрибрюшинные инъекции 5'-бром-2'-дезоксиуридина (BrdU, Sigma) (в\б; 50 мг\кг веса в 0.7%-ном растворе NaCl) в 4-х временных точках (2, 3, 4 и 12 недель после трансплантации МСК; $n = 3$ мыши на каждую временную точку из каждой группы nTg + физиологический раствор ($n = 12$), Tg + физиологический раствор ($n = 12$), nTg + YB-1($n = 12$), Tg + YB-1($n = 12$)). Инъекцию BrdU осуществляли накануне забоя животных для каждой временной точки. В отдельной серии по анализу выживаемости пролиферирующих клеток и их дифференцировке исследовали эти показатели через 2 мес. после введения BrdU.

Иммуногистохимия

Подсчет числа иммунопозитивных клеточных ядер для определения темпа клеточного деления проводили на срезах мозга Tg и nTg стареющих самок. Мыши анестезировались диэтиловым эфиром, после чего подвергались интракардиальной перфузии физиологическим раствором (0.9%-ным раствором NaCl) с последующим введением 4%-ного параформальдегида на 0.01 М фосфатном буфере (pH 7.4). Далее животные декапитировались, мозг вынимался и подвергался постфиксации в 4%-ном свежеприготовленном растворе параформальдегида на 0.01 М фосфатном буфере (pH 7.4) в течение 2-х суток. Далее в течение 12-ти ч мозг промывали в чистом фосфатном буфере (pH 7.4), а затем в течение последующих 12-ти ч в проточной воде. Затем выдерживали 3 дня в 30%-ном растворе сахарозы, повторно отмывали проточной водой в течение последующих 12-ти ч. На замораживающем столике микротома (МЗП-01, Техном, РФ) с использованием среды Tissue-Tek (Sakura, Нидерланды) готовили срезы толщиной 30 мкм.

Для избежания перекрестных сшивок антигенных молекул, ухудшающих иммунохимическое окрашивание, применялся метод демаскирования антигена в цитратном буфере – Heat Induced Epitope Retrival [36], для чего срезы предварительно трижды отмывались в растворе TBS + Triton X100, а затем на 20 мин помещались в горячий (90–95°C) раствор цитратного буфера (10 мМ цитрата натрия, 0.5% Tween 20, pH 6.0) с последующим 10-минутным охлаждением в дистиллированной воде.

Для оценки иммуноположительных к BrdU ядер срезы инкубировались с антителами к BrdU (Abcam, Великобритания, ab1893; 1 : 1000) с последующей окраской вторичными меченными 633 Alexa антителами (Thermofisher, США, A-21100; 1 : 200). Подсчет иммуноположительных ядер проводился в 10-ти полях зрения субэпенди-

мальной зоны боковых желудочков (SVZ), субгранулярной зоны (SGZ) зубчатой фасции гиппокампа у каждого животного. Анализу подвергался каждый 6-й срез мозга. Использовали флуоресцентный микроскоп Leica DM IL (объектив 20×, что обеспечивало видимую площадь – 0.1 мм^2). Оценивали среднюю плотность иммунопозитивных ядер в пересчете на 1 мм^2.

Анализ характера дифференцировки BrdU+ клеток проводили через 2 месяца после его введения в тех же структурах мозга. Для определения характера нейрогенеза на срезах мозга осуществляли двойное иммуномечение с использованием антител к BrdU (Abcam, Великобритания, ab1893; 1 : 1000) и одному из маркеров нейрональной зрелости и глии, включая нестин (Abcam, Великобритания, США, ab ab6142; 1 : 100), даблкортин (Thermofisher, США, 481200; 1 : 100), 3 бета-тубулин (Abcam, Великобритания, ab18207; 1 : 1000) и NeuN (Abcam, Великобритания, ab104225; 1 : 1000), а также на маркер астроглии GFAP (Abcam, Великобритания, ab7260; 1 : 1000). Затем готовили вторичные антитела, меченные флуорофором 488 ((Abcam, Великобритания, ab150077; 1 : 1000) и (Abcam, Великобритания, ab150113; 1 : 1000)). Подсчет клеток с колокализацией иммунопозитивности к BrdU и одному из исследуемых маркеров нейрональной дифференцировки проводили в 10-ти полях зрения SVZ и SGZ у каждого животного. Использовали флуоресцентный микроскоп (объектив 20×), дающий видимую площадь в 0.1 мм^2. Оценивали среднюю плотность иммунопозитивных ядер в пересчете на 1 мм^2.

Другим методом оценки состояния нейрогенеза в мозге под влиянием трансплантации МСК у 4-х групп экспериментальных животных явилось определение пролиферативной активности в нишах взрослого нейрогенеза: SGZ и SVZ боковых желудочков с использованием антисыворотки к гистону H3 (HH3 – пролиферативный митотический маркер), фосфорилированному по Ser10 (Thermofisher, США, PA5-17869; 1 : 200), и вторичных антител, меченных флуорофором 594 (Abcam, Великобритания, ab150080; 1 : 400). Фосфорилированный гистон H3 (Ser10) является надежным и специфичным маркером M фазы клеточного цикла, поскольку его содержание коррелирует с переходом клетки в G2/M фазу клеточного цикла и является необходимым условием конденсации хроматина во время митоза. Подсчет флуоресцирующих клеток проводили не менее, чем в 10-ти полях зрения в указанных структурах мозга на стороне трансплантации МСК у каждого животного, используя флуоресцентный микроскоп Leica DM IL (объектив 20×, видимая площадь – 0.1 мм^2).

Для оценки состояния синаптического аппарата в неокортексе, CA1 и CA3 полях гиппокампа у 4-х групп животных проводили с использованием кроличьих моноклональных первичных антител к синаптофизину (Gene Tex, США, GTX61475; 1 : 200) и вторичных флуоресцентных козьих антител к иммуноглобулинам кролика (Cell Signaling Technology, США, 4412; 1 : 400). Срезы мозга анализировали на сканирующем конфокальном люминесцентном микроскопе Leica с объективом 63×. Площадь иммунопозитивности к синаптофизину оценивали количественно с помощью компьютерной программы ImageJ.

Для определения % клеток с апоптозом анализировали морфологическое состояние ядер и хроматина с использованием ДНК специфичного красителя DAPI, который широко применяется для идентификации апоптозных клеток по морфологическим признакам, таким как наличие апоптосом, ядерному пикнозу, фрагментации хроматина и измененной форме их ядер [37–39]. Фиксированные срезы инкубировали в растворе DAPI (Thermofisher, США, D1306; 1 : 1000000 относительно стокового раствора) и с использованием флуоресцентной микроскопии (длина волны 350 нм) осуществляли подсчет % апоптозных ядер в 10-ти полях зрения (объектив 60×, 0.125 мм^2) неокортекса и CA1/CA3 полей гиппокампа у каждо-

го контрольного животного Tg и nTg групп и мышей с трансплантацией МСК. Анализировали каждый 6-й срез этих структур.

Для определения нейрональной и астроцитарной плотности в неокортексе и полях гиппокампа проводили иммунопозитивное мечение с использованием первичных антител на нейрональный маркер MAP2 (Thermofisher, США, PA1-10005; 1 : 1000) или на маркер астроцитов GFAP (Abcam, Великобритания, ab7260; 1 : 500) соответственно. В качестве вторичных антител использовали anti-chicken Alexa Fluor® 647 (Abcam, Великобритания, ab150171; 1 : 300) или anti-rabbit Alexa Fluor® 488 (Abcam, Великобритания, ab 150077; 1 : 1000) для определения нейронов и астроцитов соответственно. Подсчет клеток проводили в 10-ти полях зрения в неокортексе и полях гиппокампа у каждого животного контрольных и экспериментальных групп. Использовали конфокальный люминесцентный микроскоп Leica DM IL (объектив 20×, площадь 0.1 мм^2).

Анализ влияния трансплантации МСК на интенсивность амилоидного бляшкообразования осуществляли в мозге трансгенных 5XFAD мышей в неокортексе и гиппокампе. Для обнаружения бляшек использовали флуоресцентное окрашивание с тиофлавином S и определяли плотность амилоидных бляшек не менее, чем в 10 полях зрения для каждого животного и каждой структуры, используя флуоресцентный микроскоп Leica DM IL (объектив 20×, видимая площадь – 0.1 мм^2).

Анализ клеточной плотности проводился минимум в 10-ти полях зрения с помощью программного обеспечения Leica Application Suite (Advanced Fluorescence LAS-AF) на микрофотографиях срезов головного мозга каждого экспериментального животного, полученных при использовании флуоресцентного микроскопа Leica DM IL с объективами 10×, 20× или 40×. Расчет клеточной плотности производился по формуле $d = n/S$, где n – число клеток в анализируемом поле, S – площадь этого поля, в мм^2, и рассчитываемого с использованием масштабной линейки. Результаты представлены как среднее значение клеточной плотности в данной структуре и ошибкой среднего, рассчитанной в статистической программе SigmaPlot 12.5. Задача существенно упрощалась, если все поля данной структуры у всех животных анализировались с использованием одного объектива и одного усиления, показателем чего служили одинаковые значения на масштабной линейке.

Статистический анализ

Данные представлены как среднее значение параметра и стандартная ошибка этого значения. Для статистического анализа стереологических данных был использован двухсторонний *t*-критерий Стьюдента или факторный анализ One Way ANOVA с последующим Post-Hoc анализом для обработки поведенческих данных. Значения, которые являются статистически значимыми ($p < 0.05$), обозначены звездочкой (*) или горизонтальными линиями, указывающими, какие два значения достоверно различаются.

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям биоэтической комиссии ИБК РАН. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам Национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для трансплантации были получены и охарактеризованы мезенхимальные стволовые клетки, был проведен их цитометрический анализ, который показал, что полученные клетки были иммунопозитивны к маркерам CD73, CD90, CD105, данные маркеры [40] рекомендованы Международным обществом клеточной терапии для идентификации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), также клетки были иммунопозитивны к CD44, иммунопозитивность к маркерам гемопоэтических клеток CD14, CD34, CD45 отсутствовала.

Полученные для трансплантации клетки показали свою способность к направленной дифференцировке в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлениях, что подтвердило их принадлежность к мезенхимальным стволовым клеткам, обладающим мультипотентностью.

Для комплексной оценки эффектов трансплантации анализировались поведение и важнейшие характеристики морфофункционального состояния как ниш нейрогенеза, так неокортекса и гиппокампа – структур, ответственных за обучение и память.

Тестирование пространственной памяти у 4-х групп экспериментальных животных в лабиринте Морриса после 5-дневного обучения показало, что через месяц после трансплантации МСК позитивный эффект – узнавание сектора, в котором при обучении находилась спасательная платформа, был слабо выражен как у группы Tg + МСК, так и nTg + МСК мышей линии 5XFAD. При тестировании памяти через 2 мес. после трансплантации все Tg мыши демонстрировали хорошую пространственную память и идентифицировали сектор обучения как по времени, так и по числу заходов в него. В результате факторного анализа были получены следующие значения факторов для выделения секторов бассейна по времени: для группы Tg + МСК $F3,20 = 45.04$, $p < 0.001$; для Tg + физ. р-р $F3,20 = 0.569$, $p < 0.643$; для nTg + МСК $F3,16 = 1.84$, $p < 0.193$ и для группы nTg + физ. р-р $F3,16 = 51.78$, $p < 0.00001$. Факторы выделения секторов бассейна по количеству заходов в сектор обучения имели следующие значения: для группы Tg + МСК $F3,20 = 5.3$, $p < 0.001$; для Tg + физ. р-р $F3,20 = 0.32$, $p < 0.81$; для nTg + МСК $F3,16 = 11.14$, $p < 0.003$ и для группы nTg + физ. р-р $F3,16 = 29.11$, $p < 0.000001$. Данные Post-hoc анализа представлены на рис. 1*a*, *b*. Контрольные nTg мыши, подвергнутые аналогичной трансплантации, даже несколько ухудшили свои показатели памяти. Результаты свидетельствуют о позитивном эффекте МСК в отдаленные сроки после их трансплантации у Tg мышей.

В связи с полученными поведенческими результатами представляло интерес исследовать, как долго выживают трансплантированные МСК в мозге Tg мышей. Установлено, что МСК, прижизненно меченные Hoechst 33258, определялись в месте введения через 7 и 60 дней после их трансплантации (рис. 2*c*, *d*), при этом часть клеток могла мигрировать в стриатум и SVZ боковых желудочков – нишу взрослого нейрогенеза. Важно отметить, что большая часть введенных МСК не выявила иммунопозитивности к маркерам нейронов или астроцитов NeuN, MAP2 или GFAP соответственно даже на поздних сроках трансплантации. В мозге nTg мышей введенные МСК не были обнаружены через 60 дней после их введения.

Для определения влияния трансплантации МСК на нейрогенез в мозге 5XFAD стареющих самок мышей, в начале необходимо было оценить роль экспрессии 5 мутантных генов, присутствующих у этой трансгенной линии, на плотность нейральных прогениторных клеток (НПК) в нейрогенных областях, т. е. SVZ и SGZ. Для этой цели трансгенным и контрольным нетрансгенным мышам вводили аналог тимидина 5'-бром-2'-дезоксиуридин (BrdU) на 4-х возрастных точках, начиная с 9 мес. и заканчивая в 12 мес., что позволило проанализировать динамику измене-

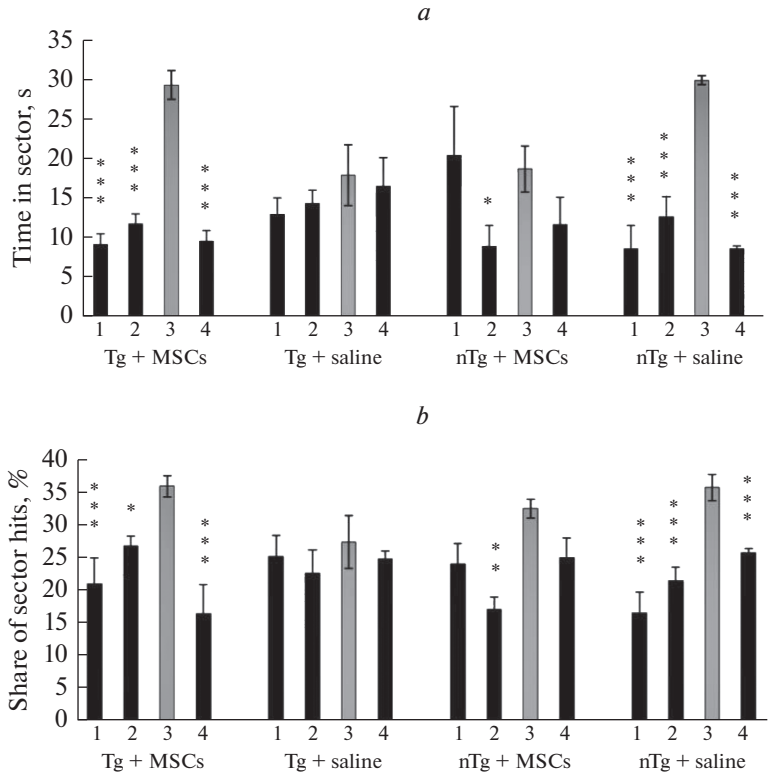


Рис. 1. Состояние пространственной памяти у Tg 5XFAD мышей через два месяца после мозговой трансплантации МСК человека. *a* – время пребывания в секторах водного лабиринта Морриса, *b* – число заходов в % в сектора лабиринта Морриса. 1, 2, 3 и 4 – сектора лабиринта Морриса, где 3 – таргетный сектор, в котором при обучении располагалась спасательная платформа. *** – $p < 0.001$, ** – $p < 0.01$, * – $p < 0.05$ (относительно таргетного 3-го сектора).

ния пролиферативной активности в мозге этих старых мышей. Контрольным группам нетрансгенных мышей вводили BrdU в том же режиме. BrdU, как известно, включается в ДНК делящихся клеток. Использование специфических антител к BrdU позволяет идентифицировать клеточные ядра, ДНК которых включили BrdU в течение суток.

На каждой временной точке мы количественно определили плотность иммунореактивных к BrdU клеток в срезах мозга этих мышей. Анализ срезов показал, что не были выявлены изменения в динамике плотности иммунореактивных клеток в период с 9-го по 12-й месяцы у Tg и nTg контрольных мышей ни в одной из нейрогенных ниш (рис. 3). Однако у nTg мышей пролиферация клеток BrdU+ в SGZ на всех временных точках показала явную тенденцию к повышению по сравнению с SVZ. У Tg животных, напротив, выраженность пролиферативной активности на всех временных точках не различалась между двумя нишами взрослого нейрогенеза. При этом сравнительный анализ показал, что у Tg животных на всех временных точках выраженность пролиферативной активности в SGZ проявила тенденцию к снижению, а плотность BrdU+ клеток в SVZ имела тенденцию к повышению по сравнению с nTg контрольными животными. Эти результаты свидетельствуют о том, что мутации и генерация бета-амилоида по-разному влияют на пролифера-

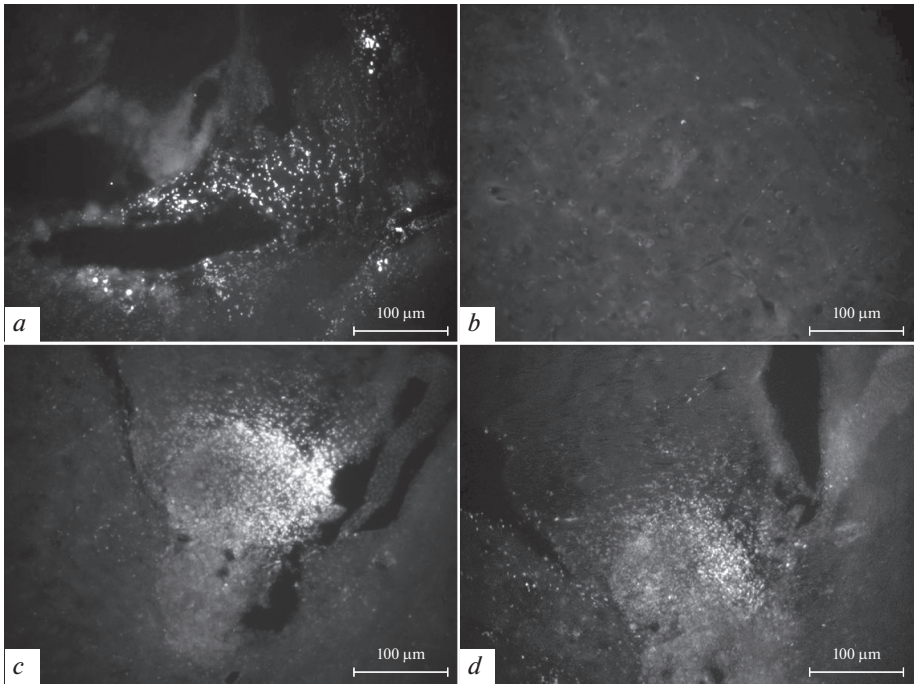


Рис. 2. Локализация трансплантированных МСК, прижизненно меченных Hoechst 33258, во фронтальной коре мозга nTg (*a*, *b*) и Tg (*c*, *d*) мышей на 7-й (*a*, *c*) и 60-й (*b*, *d*) дни после введения соответственно. Шкала – 100 мкм.

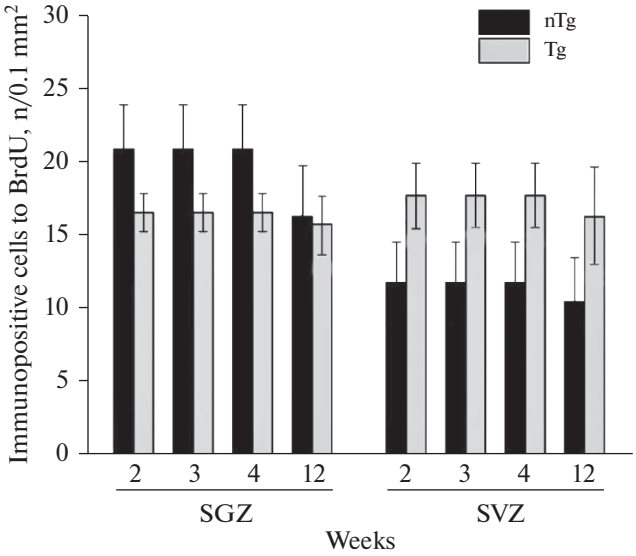


Рис. 3. Динамика пролиферативной активности клеток в мозге Tg и nTg мышей в SGZ гиппокампа и SVZ боковых желудочков мозга в возрастной период с 9-го по 12-й месяцы. По оси абсцисс – плотность иммунопозитивных к BrdU клеток на площади 0.1 мм^2 среза мозга. По оси ординат – время (недели) введения BrdU и определения BrdU+ иммунореактивных клеток.

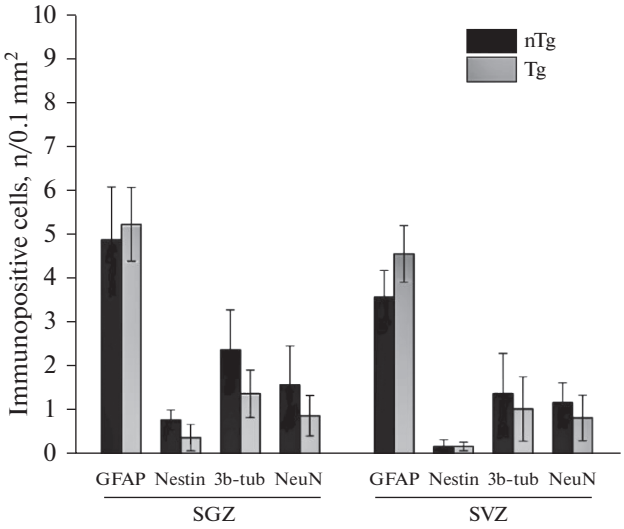


Рис. 4. Характеристика глио- и нейрогенеза в SGZ и SVZ у контрольных Tg и nTg групп мышей. Количественное распределение плотности клеток с двойной иммунопозитивностью к BrdU и маркерам нейрональной зрелости и глии. GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок, маркер астроглиальных клеток; Nestin – белок промежуточных филаментов нейральных стволовых и прогениторных клеток; 3b-tub – ассоциирован с микротрубочками, маркер дифференцирующихся нейронов; NeuN – маркерный белок ядер зрелых нейронов.

цию нейральных прогениторных клеток в нишах взрослого нейрогенеза и нарушают баланс этой активности, снижая ее в SGZ.

Чтобы проверить, проявляется ли изменение интенсивности пролиферации клеток в нишах нейрогенеза у Tg мышей с изменением количества нейральных прогениторных клеток, срезы мозга были одновременно обработаны антителами против BrdU и антителами против одного из маркеров дифференцировки нейронов. Характер нейрогенеза оценивали с использованием маркеров нейрональной зрелости – нестина, доблкортина, 3-бета-тубулина и NeuN, а также маркера покоящихся нейральных стволовых клеток в нишах нейрогенеза и астроглии GFAP. Анализ характера дальнейшей дифференцировки пролиферирующих клеток в нишах нейрогенеза, проведенный через 2 месяца после введения BrdU, показал, что у Tg и nTg мышей количественно в обеих нишах превалируют GFAP позитивные клетки, которые с большой вероятностью являются астроцитами, плотность остальных типов нейральных прогениторов была менее 2/мм^2. При сопоставлении Tg и nTg мышей мы не наблюдали достоверных различий в уровнях иммунопозитивных клеток к нестину, 3-бета-тубулину и NeuN (рис. 4). Количество иммунопозитивных клеток к даблкортину было минимально и не различалось у Tg и nTg контрольных животных. Для того, чтобы оценить выживаемость пролиферирующих клеток в нишах нейрогенеза, BrdU позитивные клетки которых одновременно имели иммунопозитивность к различным маркерам нейрональной дифференцировки, мы сравнили суммарный % клеток с двойной иммунопозитивностью, выживших в обеих нишах, а затем отдельно в каждой из зон. Количественный анализ показал, что у нетрасгенных животных таких клеток оказалось в обеих нишах 50%, а у Tg мышей 41.1%. При этом у нетрансгенных мышей определялось 45.5 и 58.3% в SGZ и SVZ соответственно, в то время как у Tg мышей выживаемость клеток с мар-

керами нейрональной дифференцировки в SGZ составила 45.6%, но на треть снизилась в SVZ и составила 37.1%. Полученные данные свидетельствуют о тенденции к снижению клеток с сигналами нейрональной дифференцировки у Tg стареющих самок, главным образом в SVZ.

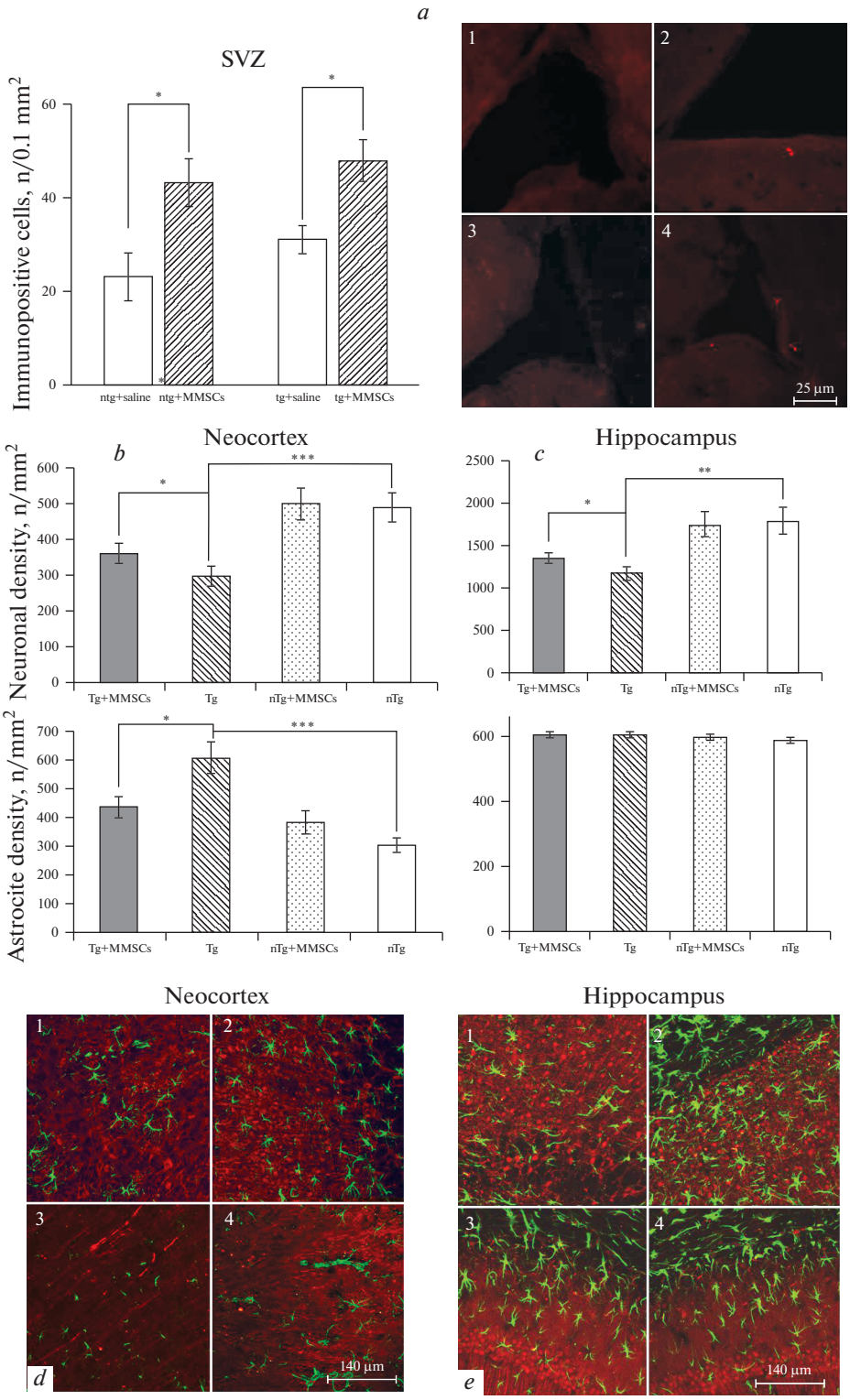
С целью понимания, с чем было связано снижение плотности клеток с сигналами нейрональной дифференцировки в ядрах нейрогенеза у трансгенных мышей, мы проанализировали пролиферативную активность, используя другой метод определения пролиферативной активности – антисыворотку к гистону H3 (HH3 – пролиферативный митотический маркер), фосфорилированному по Ser10 (1 : 200), и вторичных антител, меченных флуорофором 594 (1 : 400) в нишах взрослого нейрогенеза, наряду с анализом нейрональной плотности в коре головного мозга и гиппокампе. Было подтверждено, что Tg животные характеризовались повышенной пролиферативной активностью в SVZ мозга, но достоверно ($p < 0.01$) сниженной плотностью нейронов в неокортексе и гиппокампе по сравнению с nTg мышами (рис. 5*a*–*c*). В совокупности эти результаты свидетельствуют о том, что пролиферация нейрональных прогениторных клеток изменены в нишах нейрогенеза у Tg мышей, что и проявляется в тенденции к снижению их выживаемости в мозге в условиях развития нейродегенерации альцгеймеровского типа.

Трансплантация МСК оказала разнообразные эффекты на морфофункциональное состояние как ниш нейрогенеза, так и мозговых структур, ответственных за обучение и память – неокортекс и гиппокамп. Вне зависимости от трансгенности животных наблюдалось усиление пролиферативной активности (BrdU+ позитивные клетки), а также росло число BrdU+-DCX$^+$ клеток в нишах нейрогенеза. На рис. 5*a* представлены результаты подсчета клеток с двойной иммунопозитивностью в SVZ у Tg и nTg мышей через 2 мес. после трансплантации МСК, а также увеличение нейрональной плотности, отмеченное в неокортексе и гиппокампе только у Tg + МСК мышей, что происходило на фоне снижения плотности астроцитов в неокортексе ($p < 0.05$) при ее неизменности в гиппокампе (рис. 5*b*, *c*). Репрезентативные фотографии срезов мозга разных групп экспериментальных животных с гистоиммунохимической окраской нейронов (красный цвет) и астроцитов (зеленый цвет) представлены на рис. 5*d*, *e*.

Позитивный эффект трансплантации МСК у Tg мышей был отмечен при анализе плотности амилоидных бляшек, проявившийся в достоверном снижении плотности бляшек в гиппокампе (рис. 6*a*), что полностью ассоциировалось с позитивным влиянием МСК на память Tg животных.

Клетки, в которых ДНК или другие компоненты необратимо повреждены, в нормальных условиях подвергаются запрограммированной гибели, называемой апоптозом. Эти клетки претерпевают последовательные структурные и молекулярные изменения во время процесса апоптоза, характеризующегося образованием пузырей плазматической мембраны, уплотнением хроматина, фрагментацией

Рис. 5. Трансплантация МСК усиливает пролиферацию в SVZ у Tg и nTg мышей (*a*), репрезентативные изображения иммунопозитивности к пролиферативному маркеру – гистону H3 (HH3 – пролиферативный митотический маркер), фосфорилированному по Ser10. 1 – nTg + физ. р-р, 2 – nTg + МСК, 3 – Tg + + физ. р-р, 4 – Tg + МСК; трансплантация МСК увеличивает нейрональную (верхняя диаграмма) плотность в неокортексе (*b*) и гиппокампе (поле CA1) (*c*) только у Tg мышей, репрезентативные фотографии коры головного мозга (*d*) и гиппокампа (поле CA1) (*e*) у разных групп экспериментальных животных: 1 – Tg + МСК; 2 – Tg + физ. р-р; 3 – nTg + МСК; 4 – nTg + физ. р-р после гистоиммунохимической окраски на нейроны (MAP2 – красный) и астроциты (GFAP – зеленый). Достоверность отличия от данных контрольных Tg и nTg животных, получавших физиологический раствор * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка. Для всех микрофотографий *a* (1–4) шкала – 25 мкм. Для всех микрофотографий *d*, *e* (1–4) шкала – 140 мкм.


a
SVZ
Immunopositive cells, n/0.1 mm2
ntg+saline
ntg+MMSCs
tg+saline
tg+MMSCs
25 μm
Neocortex
Hippocampus
b
c
Neuronal density, n/mm2
Astrocite density, n/mm2
Tg+MMSCs
Tg
nTg+MMSCs
nTg
Neocortex
Hippocampus
140 μm
d
e

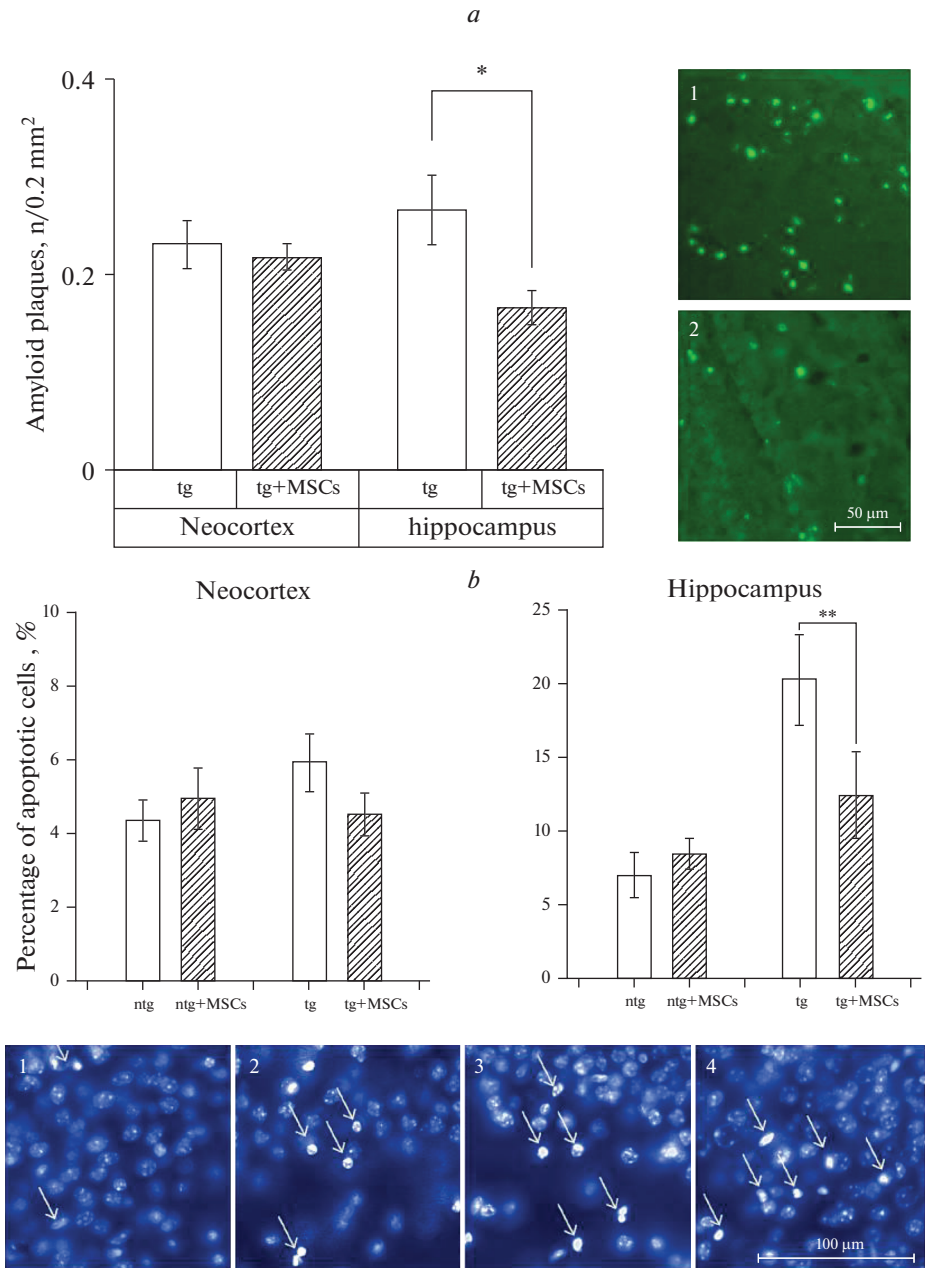


Рис. 6. Под влиянием трансплантации МСК уменьшается плотность амилоидных бляшек в гиппокампе (поля CA1, CA3) (*a*), репрезентативные микрофотографии бляшек с использованием тиофлавина S: 1 – Tg + физ. р-р, 2 – Tg + МСК. Трансплантация МСК снижает (*b*) число апоптозных клеток в гиппокампе (поле CA1) у Tg мышей линии 5XFAD, репрезентативные изображения окраски срезов гиппокампа (поле CA1) красителем DAPI, стрелочками показаны апоптотические клетки, 1 – nTg + физ. р-р, 2 – nTg + МСК, 3 – Tg + физ. р-р, 4 – Tg + МСК. Достоверность отличия данных по двухстороннему *t*-критерию Стьюдента между указанными группами мышей, соединенных горизонтальными линиями : * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка. Для микрофотографий *a* (1–2) шкала – 50 мкм. Для микрофотографий *b* (1–2) шкала – 100 мкм.

ДНК, сжатием клеток и коллапсом клетки на небольшие неповрежденные фрагменты, называемые апоптотическими тельцами. DAPI, ДНК-специфический краситель, который проявляет синюю флуоресценцию, плохо проходит через интактную клеточную мембрану, но апоптоз увеличивает проницаемость клеточной мембраны и окраску ядерного конденсированного и фрагментированного хроматина, что выражается в сильной голубой флуоресценции этих образований. Клетки с фрагментированными и конденсированными ядрами считались апоптотическими [41, 42]. Контрольные Tg животные характеризовались достоверным увеличением процента апоптозных клеток в гиппокампе ($p < 0.01$), но не в неокортексе. Введение МСК вызывало снижение выраженности апоптоза в гиппокампе. Выраженность апоптоза была незначительной в мозге nTg мышей, и введение МСК не оказывало на них достоверного влияния (рис. 6*b*).

Количественный иммуногистохимический анализ синаптофизина, представленный на рис. 7, выявил снижение синаптической плотности у Tg мышей по сравнению с nTg животными в височной коре ($p < 0.001$) и полях CA1 и CA3 ($p < 0.001$) гиппокампа.

У Tg животных с трансплантацией МСК отмечено повышение синаптической плотности по сравнению с контрольными Tg + физ. р-р. мышами в коре головного мозга ($p < 0.001$) и в полях гиппокампа ($p < 0.001$). У nTg мышей введение МСК не повлияло на уровень синаптофизина в височной коре относительно контрольной nTg + физ. р-р. группы, но увеличило синаптическую плотность в поле CA1 ($p < 0.001$). Таким образом, развитие нейродегенерации альцгеймеровского типа на модели наследственной формы БА у 5XFAD мышей происходит на фоне снижения синаптической плотности в височной коре и полях CA1 и CA3 гиппокампа, а введение этим животным МСК из Вартонова студня пуповины существенно улучшает синаптическую пластичность в этих структурах.

В целом, полученные результаты свидетельствуют, что у трансгенной линии 5XFAD мышей основные нарушения морфофункционального состояния нейронов были выявлены в гиппокампе, при этом позитивный эффект трансплантации МСК также ярко проявился в этой структуре, что коррелировало с улучшением пространственной памяти у Tg мышей после введения МСК.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Используемые в исследовании трансгенные мыши линии 5XFAD (TG6799) широко применяются в качестве модели наследственной формы БА и характеризуются ранним выраженным амилоидогенезом в головном мозге, поскольку в своем геноме несут шведскую (K670N/M671L), флоридскую (I716V) и лондонскую (V717I) мутации белка предшественника бета-амилоида APP человека APP(695), а также M146L и L286V мутации в гене пресенилина 1. Экспрессия обоих трансгенов находится под Thy1 промотером. Уже к четырем месяцам у животных наблюдается накопление высоких уровней бета-амилоида, а также синаптическая дегенерация, потеря нейронов и дефицит в пространственном обучении [43], а к шести месяцам амилоидные бляшки и глиоз обнаруживаются в коре головного мозга и гиппокампе [44]. В целом данная модель БА отражает вклад в развитие этого заболевания APP и пресенилинов, играющих важную роль в регуляции взрослого нейрогенеза [45, 46].

Особенностью данного исследования явилось использование химерной модели, позволившей анализировать состояние МСК человека, трансплантированных в мозг Tg 5XFAD мышей, пораженный нейродегенеративным процессом альцгеймеровского типа. Использование стареющих самок приближает исследование к реальным условиям клинического применения этих клеток. Факт большей подверженности женщин риску заболеть БА признается большинством исследователей

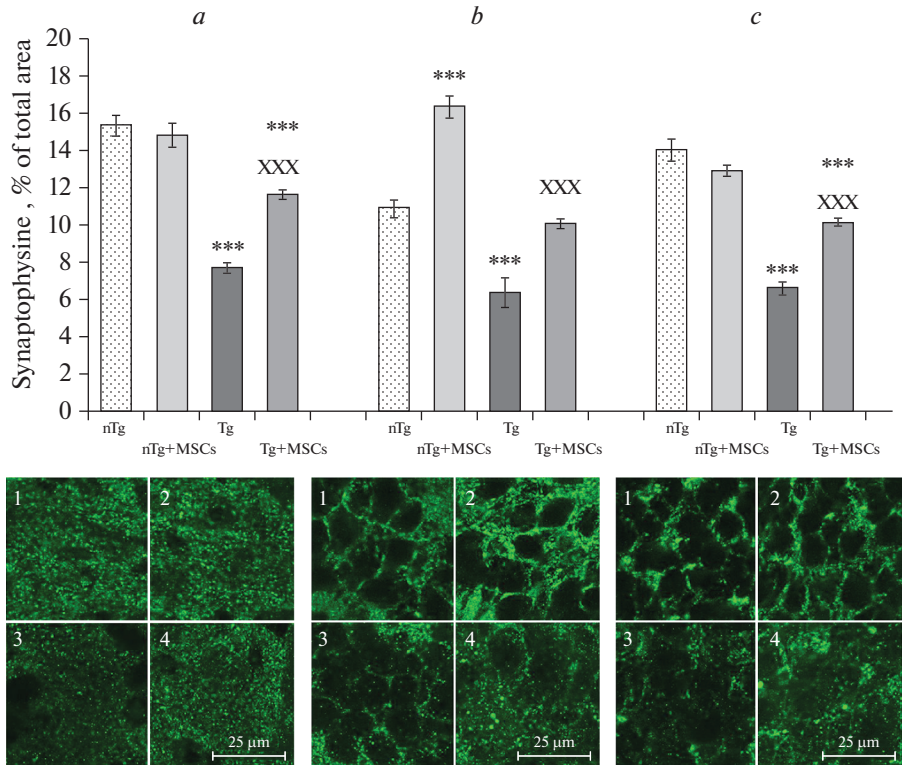


Рис. 7. Влияние трансплантации МСК человека на синаптическую плотность в височной коре (*a*), полях CA1 (*b*) и CA3 (*c*) гиппокампа у трансгенных мышей 5XFAD. По оси ординат площадь иммунофлуоресценции синаптофизина на срезах мозга разных групп животных, указанных на оси абсцисс. Репрезентативные изображения иммунофлуоресцентного мечения на синаптофизин: 1 – nTg + физ. р-р, 2 – nTg + МСК, 3 – Tg + физ. р-р, 4 – Tg + МСК. Достоверность отличия данных по двухстороннему *t*-критерию Стьюдента: *** – $p < 0.001$ (относительно группы nTg мышей), xxx – $p < 0.001$ (относительно группы Tg мышей). Для микрофотографий *a*–*c* (1–4) шкала – 25 мкм.

[47–49], однако экспериментальных работ на моделях БА у стареющих самок сравнительно мало [50].

Полученные результаты не только подтвердили существующие данные литературы о наличии характерных для трансгенных животных таких изменений, как нарушение пространственной памяти, наличие амилоидных бляшек в мозге, снижение нейрональной плотности в неокортексе и гиппокампе, уменьшение синаптогенеза [51], но и выявили ряд интересных особенностей. Снижение нейрональной плотности, что было характерно для всех групп Tg животных, безусловно, связано с токсическим влиянием бета-амилоида, который, как показано другими авторами, увеличивает число реактивных астроцитов вблизи амилоидных бляшек [52]. Такие астроциты окружают бляшки, изолируя их от контактов со здоровой тканью [53], возможно, поэтому токсическое действие сформированных бляшек менее выражено, чем у растворимых олигомерных форм этого белка. Тем не менее, реактивные астроциты участвуют в секреции воспалительных цитокинов, включая IL-1, IL-6 и TNF-alpha, тем самым способствуя нейровоспалению [54], и, по-видимому, гибели нейронов. Следует отметить и тот факт, что агрегаты Aβ через активацию синте-

за хемотаксических молекул в окружающих моноцитах способствуют привлечению астроцитов к амилоидным бляшкам [55]. Отсутствие различий в астроцитарной плотности в гиппокампе у всех групп животных вне зависимости от трансгенности, по-видимому, связано с постоянством их числа даже при БА, что отличает гиппокамп от коры головного мозга [56].

Большая подверженность гибели нейронов гиппокампа у Tg мышей хорошо соответствует как существующему представлению об ускоренном старении при БА, так и зеркальной гипотезе о более раннем старении структур мозга, которые в эмбриогенезе развиваются позже [57]. Гиппокамп и является такой структурой. Ранее в нашей работе мы также показали, что нейроны в гиппокампе старых трансгенных мышей характеризуются более выраженными морфологическими нарушениями, чем клетки возрастного контроля нетрансгенных животных. Это свидетельствует об ускоренном старении клеток гиппокампа в условиях развития БА [58]. Известно, что часть клеток при старении переходит в сенесцентные клетки, которые экспрессируют провоспалительные цитокины, факторы роста и протеазы (цитокины IL-6 и IL-8, MMP-1, MMP-3, фибронектин и ламинин B), что в совокупности составляет секреторный фенотип, связанный со старением (SASP). Такой “коктейль” может негативно влиять на микроокружение и в конечном итоге приводить к активации апоптоза в нейронах и их гибели [59], что мы и видели в гиппокампе, но не в неокортексе трансгенных мышей.

Наблюдаемое нами снижение нейрональной плотности в мозге трансгенных животных может быть и следствием ухудшения нейрогенеза, что было описано в мозге трансгенных животных с другими моделями БА [60–62]. Некоторыми авторами высказывается предположение, что нарушение нейрогенеза является ранним критическим событием в БА, которое может лежать в основе нарушений памяти, по крайней мере частично, и усугублять уязвимость нейронов в формировании гиппокампа [63]. Кроме того, нарушение нейрогенеза может являться результатом как внутренней патологии нейрональных клеток-предшественников, так и нарушением самих нейрогенных ниш, о чем, к сожалению, не позволяют судить наши результаты, и требуется дополнительное исследование этого вопроса. Интересно отметить, что снижение пролиферативной активности в нишах взрослого нейрогенеза авторы наблюдали только у трансгенных мышей старше 9 мес., что ставит под сомнение участие в этом процессе бета-амилоида, генерация которого начинается в более ранние сроки.

Для оценки нейрогенеза мы использовали целый ряд маркеров нейрональной дифференцировки. Известно, что во взрослом организме нестин в основном синтезируется в клетках-предшественниках нейронов SGZ. При дифференцировке нестин замещается тканеспецифичными белками промежуточных филаментов. Клетки-предшественники нейронов начинают экспрессировать даблкортин при активном делении, а их дочерние нейрональные клетки продолжают экспрессировать даблкортин в течение 2-х–3-х нед., когда клетки созревают в нейроны. Понижение уровня даблкортина начинается через 2 недели и происходит в то же время, когда эти клетки начинают экспрессировать NeuN. 3-бета-тубулин образует микротрубочки и встречается почти исключительно в нейронах. Он является отличительным ранним маркером дифференцированных нервных клеток. Иммунореактивность к NeuN становится очевидной по мере снижения экспрессии даблкортина.

Использование подсчета BrdU+ клеток позволило нам выявить нарушение баланса выраженности пролиферативной активности между двумя нишами взрослого нейрогенеза, характерного для нетрансгенных животных. В исследованиях редко уделяют внимание этому факту, поскольку в основном изучают SGZ, отвечающую за нейрогенез в гиппокампе не только у животных, но и у человека [64]. Анализ судьбы пролиферирующих клеток с использованием различных перечисленных

выше маркеров нейрональной зрелости показал, что подавляющее большинство клеток в обеих нишах были иммунопозитивны к астроглиальному маркеру GFAP. Учитывая, что иммунопозитивность к этому маркеру имеют и нейральные стволовые клетки, непосредственно расположенные в нишах нейрогенеза, полученные данные могут быть расценены как отсутствие нейрональной дифференцировки в мозге Tg животных. Суммарная оценка числа клеток в зонах нейрогенеза свидетельствует, что у животных используемой нами трансгенной линии в большей степени страдает нейрогенез в SVZ, где пролиферирующие клетки либо не вступают в дифференцировку, либо погибают на ее ранних стадиях.

Результаты иммуноцитохимического окрашивания клеток, выделенных из Вартонова студня пупочного канатика и использованных нами для мозговой трансплантации, свидетельствуют об их принадлежности к МСК и отсутствии в препарате гемопоэтических стволовых клеток, о чем свидетельствует наличие специфических маркеров МСК на их поверхности, таких как CD 90, CD 105, CD 73, CD 44, CD 13, отсутствие CD14, CD34, CD45 [40], а также их дифференцировка в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлениях подтверждает их мультипотентность.

Далее нас интересовала судьба трансплантированных во фронтальную кору МСК. Присутствие МСК, прижизненно меченных Hoechst 33258, в месте введения у трансгенных животных нами было установлено как через 7, так и через 60 дней после трансплантации, в то время как у nTg мышей в отдаленные сроки мы не обнаружили меченых МСК. Выживание МСК в мозге модельных животных без использования иммуносупрессии отмечали и другие авторы [65]. По-видимому, это свидетельствует как о возможном снижении иммунной защиты у Tg животных [66], что ранее нами было обнаружено у бульбэктомированных животных – другой модели спорадической формы БА [67], так и о способности МСК вызывать иммуносупрессию и иммуномодуляцию [68], позволяющую им выживать даже при ксеногенной трансплантации. Другой особенностью большей части введенных МСК человека явилась слабая способность к дифференцировке, проявившаяся в отсутствие иммунопозитивности к маркерам нейронов и астроцитов, что, по-видимому, позволяло им длительное время выделять ростовые и трофические факторы, оказывая паракринное воздействие на морфофункциональное состояние клеток мозга Tg мышей и их функционирование [65].

В данной работе было установлено, что максимальный позитивный эффект МСК на память Tg мышей также проявился через 2 мес. после их трансплантации, что ассоциировалось с присутствием в их мозге МСК. Ранее полученные нами данные также показали высокую эффективность трансплантации МСК в отношении памяти мышей с другой моделью БА [31]. Причины нарушения памяти в группе nTg + МСК мышей до настоящего времени неясны. По-видимому, МСК в здоровом и в мозге, пораженном патологическим процессом, оказывают разные эффекты, на что указывалось в литературе [69].

Количественный анализ амилоидных бляшек у Tg мышей с трансплантацией человеческих МСК выявил достоверное снижение плотности бляшек в гиппокампе, что полностью ассоциировалось с позитивным влиянием МСК на память Tg животных. Очевидно, что эффект был обусловлен очисткой мозговых структур, ответственных за память, от токсического действия бета-амилоида за счет системного действия многочисленных биологически активных соединений, таких как противовоспалительные цитокины, трофические и ростовые факторы, выделяемые МСК и нормализующие деятельность клеток неокортекса и гиппокампа [70]. Снижение числа бляшек, возможно, связано с тем, что выделяемая МСК молекула внутриклеточной адгезии-1 (sICAM-1), которая через сигнальный путь sICAM-1/LFA-1 (антиген-1, связанный с функцией лимфоцитов (LFA-1)) индуцирует экспрессию непрелизина

в микроглии, что способствует утилизации бета-амилоида и уменьшает число бляшек [27]. Другой возможностью снижения бляшек под влиянием МСК является активация аутофагии [28].

В наших исследованиях было показано, что трансплантация МСК вызывает активацию пролиферации в нишах взрослого нейрогенеза, главным образом, в SVZ. Снижение потери нейронов в гиппокампе и усиление нейрогенеза в разных животных моделях поражений мозга под влиянием МСК наблюдали и другие авторы [71]. Эффект авторы связали с активацией BDNF-TrkB сигнального пути, вызывавшего активацию внутриклеточных Akt и/или Erk, что приводило к фосфорилированию CREB, ответственного за транскрипцию BDNF.

Недавно было высказано предположение, что сигнальный путь Wnt модулирует нейрогенез в моделях БА, связанных с амилоидом-β, где в качестве лечения использовали МСК. В обработанных Aβ нейрональных клетках-предшественниках (NPC) при кокультивировании с МСК значительно увеличивалась экспрессию Ki-67, GFAP, SOX2, нестина, а также β-катенина и Ngn1, что доказывает усиление сигнального пути Wnt [29].

Нейрогенез в субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа может действовать как эндогенный механизм восстановления памяти при БА. Известна тесная связь Wnt сигнального пути с регуляцией и контролем внутриклеточной активности Ca^{2+} и Ca^{2+}-зависимых механизмов. β-катенин является центральным звеном канонического пути Wnt/β-катенина и связан с регуляцией нейрогенеза в зубчатой фасции гиппокампа и в SVZ, а также модулирует синаптическую передачу и пластичность [72].

Однако полученные нами результаты не позволяют прямо ассоциировать улучшение памяти у трансгенных старых мышей с моделью БА, наблюдаемую при трансплантации МСК, исключительно с активацией нейрогенеза, поскольку активация была отмечена и в мозге нетрансгенных животных с аналогичным введением МСК, но память улучшалась только у трансгенных мышей. Конечно, основной причиной могло быть отсутствие МСК в мозге контрольных мышей во время обучения и тестирования памяти спустя 2 мес. после трансплантации. Причиной наблюдаемого поведенческого эффекта МСК у трансгенных мышей могла быть и повышенная плотность нейронов, главным образом, в гиппокампе.

Полученные результаты свидетельствуют о наличии у МСК нейропротективных свойств. Ряд авторов связывают их со способностью МСК выделять различные провоспалительные цитокины в ответ на повреждение (IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, TNFα, IFNβ). Установлено, что одну из центральных ролей в эффектах МСК играет IL-6 и активация сигнального пути IL-6/STAT3. Так, введение нативных, но не МСК с генетической конструкцией, подавляющей экспрессию IL-6, сопровождалось улучшением моторного поведения у крыс, которым в неонатальный период вызывали инфаркт мозга, что указывает на наличие у IL-6 репарационного действия. Путем воздействия на ряд других сигнальных путей – простагландин E2 (PGE2), белок TNF-индуцибельного гена 6 (TSG-6), рецептор прогестерона (PR) и глюкокортикоидный рецептор (GR) МСК переводят активированную микроглию в M2 фенотип, что сопровождается торможением выделения провоспалительных цитокинов и способствует восстановлению ткани и нейрорегенерации [73]. В исследованиях *in vitro* при совместном культивировании корковых нейронов и МСК было установлено, что на поверхности нейронов снижается экспрессия GluR1 субъединицы AMPAR, что повышает их устойчивость к эксайтотоксичности глутамата и препятствует повышению уровня внутриклеточного Ca^{2+}, что не оказывает влияния на их выживаемость и даже снижает число нейронов с апоптическими ядрами [74]. Возможно, это происходит за счет увеличения экспрессии антиапоптотического гена *Bcl-2* и снижения экспрессии проапоптотического гена *Bax*. В на-

шей работе ярко проявилась противоапооптотическая активность МСК в гиппокампе трансгенных старых мышей. Выраженная нейропротективная активность МСК может осуществляться и через секрецию как ростового фактора фибробластов (FGF)-II [75], так и BDNF [76]. Выделяемый МСК TNF путем активации поверхностных клеточных TNF рецепторов 1-го и 2-го типов запускает сигнальный путь, в конечном итоге приводящий к транскрипции генов, повышающих выживаемость клеток [74].

Нейропротективное действие МСК на нейрон может быть опосредовано и через их действие на астроциты. Факторы, выделяемые МСК, способны активировать сигнальный путь p38, что приводит к уменьшению синтеза белка AQP4 на отростках астроцитов, а также к повышению активности плазминогена-1 астроцитов, что способствует превращению про-нейтрофинов (pro-BDNF и pro-NGF) в их активные формы. МСК снижают синтез нейрокана в активированных астроцитах, а также регулируют VEGF-A-зависимую активность eNOS астроцитов. Реализация этих молекулярно-клеточных механизмов также приводит к снижению апоптотической гибели астроцитов и сохранению целостности и стабилизации гематоэнцефалического барьера [77], к усилению роста нейритов и восстановлению нейронных связей. Другие исследования на животных моделях продемонстрировали, что МСК человека оказывают нейропротективное действие посредством сложных комплексных механизмов, таких как модуляция нейровоспаления, усиление нейрогенеза и модуляция убиквитинирования белков [78, 79].

Известно, что МСК синтезируют и выделяют в окружающую среду факторы роста, цитокины и хемокины [80], экзосомы [81]. Выделенные МСК вещества способны модулировать локальную иммунную систему, усиливать процесс образования новых сосудов, стимулировать миграцию, пролиферацию, дифференцировку клеток и формирование внеклеточного матрикса. Важно отметить, что все эти факторы присутствуют в условиях химерной модели *in vivo*, и лишь частично могут быть воспроизведены при кокультивировании МСК с трансгенной культурой *in vitro*, что повышает ценность полученных нами результатов. Важно отметить, что все трансгенные животные, использованные в работе, находились на развернутой стадии нейродегенеративного процесса альцгеймеровского типа, поэтому позитивные эффекты внутримозговой трансплантации МСК можно рассматривать как лечебные, что особенно важно в условиях отсутствия эффективной терапии этого заболевания на этапе его развернутой фазы.

В настоящее время МСК не применяют для лечения пациентов с болезнью БА, в связи с этим сложно оценить эффективность данной терапии, но все больше данных свидетельствует о том, что данный метод окажется многообещающим способом лечения БА и других нейродегенеративных заболеваний, о чем свидетельствуют полученные нами результаты.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 18-15-00392.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Н.В.Б. и Р.А.П.), сбор данных (А.В.Ч., Ж.Д.Ю., В.И.К., Н.И.М., Р.А.П.), получение и культивирование клеток (Р.А.П.), обработка

данных (Н.В.Б., В.И.К., Д.Ю.Ж., А.В.Ч., Р.А.П.), написание и редактирование манускрипта (Н.В.Б., Д.Ю.Ж., В.И.К., Р.А.П.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Некрасову П.В. за техническую помощь в проведении экспериментов, а также сотрудникам Сектора оптической микроскопии и спектрофотометрии ЦКП ПНЦБИ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Caselli RJ, Beach TG, Knopman DS, Graff-Radford NR* (2017) Alzheimer Disease: Scientific Breakthroughs and Translational Challenges. Mayo Clin Proc 92(6): 978–994. https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2017.02.011
2. *Tiwari S, Atluri V, Kaushik A, Yndart A, Nair M* (2019) Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. Int J Nanomedicine 19(14): 5541–5554. https://doi.org/10.2147/IJN.S200490
3. *Loera-Valencia R, Piras A, Ismail MAM, Manchanda S, Eyjolfsdottir H, Saido TC. Johansson J, Eriksdotter M, Winblad B, Nilsson P* (2018) Targeting Alzheimer's disease with gene and cell therapies. J Int Med 284(1): 2–36. https://doi.org/10.1111/joim.12759
4. *Sadigh-Eteghad S, Sabermarouf B, Majdi A, Taleb M, Farhoudi M, Mahmoudi Jl* (2015) Amyloid-beta: a crucial factor in Alzheimer's disease. Med Princ Pract 24(1): 1–10. https://doi.org/10.1159/000369101
5. *Lane CA, Hardy J, Schott JM* (2018) Alzheimer's disease. Eur J Neurol 25(1): 59–70. https://doi.org/10.1111/ene.13439
6. *Winner B, Kohl Z, Gage FH* (2011) Neurodegenerative disease and adult neurogenesis. Eur J Neurosci. 33(6): 1139–1151. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07613.x
7. *Liang X, Ding Y, Zhang Y, Tse HF, Lian Q* (2014) Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives. Cell Transplant 23(9): 1045–1059. https://doi.org/10.3727/096368913x667709
8. *Josine EG Vaes, Marit A Vink, Caroline GM de Theije, Freek E Hoebeek, Manon JNL Benders, Cora H A Nijboer* (2019) The Potential of Stem Cell Therapy to Repair White Matter Injury in Preterm Infants: Lessons Learned From Experimental Models. Front Physiol 10: 540. https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00540
9. *Noureddini M, Bagheri-Mohammadi S* (2021) Adult Hippocampal Neurogenesis and Alzheimer's Disease: Novel Application of Mesenchymal Stem Cells and their Role in Hippocampal Neurogenesis. Int J Mol Cell Med 10(1): 1–10. https://doi.org/10.22088/IJMCM.BUMS.10.1.1
10. *Vitek MP, Araujo JA, Fossel M, Greenberg BD, Howel GR, Sukoff Rizzo SJ, Seyfried NT, Tenner AJ, Territo PR, Windisch M, Bain LJ, Ross AR, Carrillo MC, Lamb BT, Edelmayer RM* (2021) Translational animal models for Alzheimer's disease: An Alzheimer's Association Business Consortium Think Tank. Alzheimers Dement (N Y) 6(1): e12114. https://doi.org/10.1002/trc2.12114
11. *Paton MCB, McDonald CA, Allison BJ, Fahey MC, Jenkin G, Miller SL* (2017) Perinatal brain injury as a consequence of preterm birth and intrauterine inflammation: designing targeted stem cell therapies. Front Neurosci 11: 200. https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00200
12. *De Miguel MP, Fuentes-Julian S, Blazquez-Martinez A, Pascual CY, Aller MA, Arias J, Arnalich-Montiel F* (2012) Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. Curr Mol Med 12(5): 574–591. https://doi.org/10.2174/156652412800619950
13. *Jacobs SA, Roobrouck VD, Verfaillie CM, Van Gool SW* (2013) Immunological characteristics of human mesenchymal stem cells and multipotent adult progenitor cells. Immunol Cell Biol 91(1): 32–39. https://doi.org/10.1038/icb.2012.64
14. *Kobolak J, Dinnyes A, Memic A, Khademhosseini A, Mobasheri A* (2016) Mesenchymal stem cells: identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. Methods 99: 62–68. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.09.016
15. *Volkman R, Offen D* (2017) Concise review: mesenchymal stem cells in neurodegenerative diseases. Stem Cells 35: 1867–1880. https://doi.org/10.1002/stem.2651

16. *Frausin S, Viventi S, Verga Falzacappa L, Quattromani MJ, Leanza G, Tommasini A, Valencic E* (2015) Wharton's jelly derived mesenchymal stromal cells: Biological properties, induction of neuronal phenotype and current applications in neurodegeneration research. Acta Histochem 117(4–5): 329–338.
https://doi.org/10.1016/j.acthis.2015.02.005
17. *Donders R, Bogie JFJ, Ravanidis S, Gervois P, Vanheusden M, Marée R, Schrynemackers M, Smeets HJM, Pinxteren J, Gijbels K, Walbers S, Mays RW, Deans R, Van Den Bosch L, Stinissen P, Lambrichts I, Gyselaers W, Hellings N* (2018) Human Wharton's Jelly-Derived Stem Cells Display a Distinct Immunomodulatory and Proregenerative Transcriptional Signature Compared to Bone Marrow-Derived Stem Cells. Stem Cells 27(2): 65–84.
https://doi.org/10.1089/scd.2017.0029
18. *Shi J, Zhao YC, Niu ZF, Fan HJ, Hou SK, Guo XQ, Sang L, Lv Q* (2021) Mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles in the treatment of human diseases: progress and prospect. World J Stem Cells 13(1): 49–63.
https://doi.org/10.4252/wjsc.v13.i1.49
19. *Wang X, Thomsen P* (2021) Mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles and bone regeneration. Basic Clin Pharmacol Toxicol 128: 18–36.
https://doi.org/10.1111/bcpt.13478
20. *Zhdanova DY, Poltavtseva RA, Svirshchevskaya EV, Bobkova NV* (2021) Effect of Intranasal Administration of Multipotent Mesenchymal Stromal Cell Exosomes on Memory of Mice in Alzheimer's Disease Model. Bull Exp Biol Med 170(4): 575–582.
https://doi.org/10.1007/s10517-021-05109-3
21. *Venugopal CKS, Rai KS, Pinnelli VB, Kutty BM, Dhanushkodi A* (2018) Neuroprotection by Human Dental Pulp Mesenchymal Stem Cells: From Billions to Nano. Curr Gene Ther 18(5): 307–323.
https://doi.org/10.2174/1566523218666180913152615
22. *Mead B, Logan A, Berry M, Leadbeater W, Scheven BA* (2014) Paracrine-mediated neuroprotection and neuritogenesis of axotomised retinal ganglion cells by human dental pulp stem cells: comparison with human bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. PLoS One 9(10): e109305.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109305
23. *Labrador-Velandia S, Alonso-Alonso ML, Di Lauro S, García-Gutierrez MT, Srivastava GK, Pastor JC, Fernandez-Bueno I* (2019) Mesenchymal stem cells provide paracrine neuroprotective resources that delay degeneration of co-cultured organotypic neuroretinal cultures. Exp Eye Res 185: 107671.
https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.05.011
24. *Peng C, Li Y, Lu L, Zhu J, Li H, Hu J* (2019) Efficient One-Step Induction of Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells (UC-MSCs) Produces MSC-Derived Neurospheres (MSC-NS) with Unique Transcriptional Profile and Enhanced Neurogenic and Angiogenic Secretomes. Stem Cells Int 2019: 9208173.
https://doi.org/10.1155/2019/9208173
25. *Lee HJ, Lee JK, Lee H, Shin J-W, Carter J E, Sakamoto Toshiro, Kyung Jin H, Bae J-s* (2010) The therapeutic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in Alzheimer's disease. Neurosci Lett 481(1): 30–35.
https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.06.045
26. *Park H-J, Shin JY, Lee BR, Kim HO, Lee PH* (2012) Mesenchymal stem cells augment neurogenesis in the subventricular zone and enhance differentiation of neural precursor cells into dopaminergic neurons in the Substantia Nigra of a Parkinsonian model. Cell Transplant 21: 1629–1640.
https://doi.org/10.3727/096368912X640556
27. *Kim J-Y, Kim DH, Kim JH, Kim J-Y, Lee D, Jeon HB, Kwon S-J, Kim SM, Yoo YJ, Lee EH, Choi SJ, Seo SW, Lee JI, Na DL, Yang YS, Oh W, Chang JW* (2012) Soluble intracellular adhesion molecule-1 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell reduces amyloid-β plaques. Cell Death Differ 19: 680–691.
https://doi.org/10.1038/cdd.2011.140
28. *Shin JY, Park HJ, Kim HN, Oh SH, Bae J-S, Ha H-J, Lee PH* (2014) Mesenchymal stem cells enhance autophagy and increase β-amyloid clearance in Alzheimer disease models. Autophagy 10: 32–44.
https://doi.org/10.4161/auto.26508
29. *Oh SH, Kim HN, Park H-J, Shin JY, Lee PH* (2015) Mesenchymal stem cells increase hippocampal neurogenesis and neuronal differentiation by enhancing the Wnt signaling pathway in an Alzheimer's disease model. Cell Transpl 24: 1097–1109.
https://doi.org/10.3727/096368914X679237
30. *Калинина ЮА, Гилерович ЕГ, Коржевский ДЭ* (2019) Астроциты и их участие в механизмах терапевтического действия мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при ишемическом повреждении головного мозга. Гены и клетки 14(1): 33–40. [*Kalinina YA, Gilerovich EG, Korzhevskij DE* (2019) Astrocytes and their participation in the mechanisms of

therapeutic action of multipotent mesenchymal stromal cells in ischemic brain damage. Genes and Cells 14 (1): 33–40. (In Russ)].
https://doi.org/10.23868/201903004

31. *Bobkova NV, Poltavtseva RA, Samokhin AN, Sukhikh GT* (2013) Therapeutic effect of mesenchymal multipotent stromal cells on memory in animals with Alzheimer-type neurodegeneration. Bull Exp Biol Med 156(1): 119–121.
https://doi.org/10.1007/s10517-013-2293-z
32. *Poltavtseva RA, Samokhin AN, Bobkova NV, Alexandrova MA, Sukhikh GT* (2020) Effect of Transplantation of Neural Stem and Progenitor Cells on Memory in Animals with Alzheimer's Type Neurodegeneration. Bull Exp Biol Med 168(4): 589–596.
https://doi.org/10.1007/s10517-020-04758-0
33. *Арсентьева ЕВ, Полякова ДИ* (2021) Современный взгляд на использование клеточных технологий для стимуляции репаративного нейрогенеза. Научное обозрение. Мед науки (2): 16–24. [*Arsent'yeva YEV, Polyakova DI* (2021) A modern view of the use of cell technologies to stimulate reparative neurogenesis. Scientific Review. Med Sci (2): 16–24. (In Russ)].
34. *Franklin KBJ, Paxinos G* (2008) The mouse brain in stereotaxic coordinates. Amsterdam. Elsevier.
35. *Nemecek S, Subrtova D* (1995) Cerebrospinal fluid dissemination of fetal neural isografts in brain of adult rats. Sb Ved Pr Lek Fak Karlovy Univer Hradci Kralove 38(1): 5–9.
36. *Werner M, Von Wasielewski R, Komminoth P* (1996) Antigen retrival, signal amplification and intensification in immunohistochemistry. Histochem Cell Biol 105(4): 253–260.
https://doi.org/10.1007/BF01463928
37. *Zhu M, Li W, Guo J, Lu Y, Dong X, Lin B, Chen Y, Zhang X, Li M* (2016) Alpha fetoprotein antagonises benzyl isothiocyanate inhibition of the malignant behaviors of hepatocellular carcinoma cells. Oncotarget 7(46): 75749–75762.
https://doi.org/10.18632/oncotarget.12407
38. *Wang W, Zhu M, Xu Z, Li W, Dong X, Chen Y, Lin B, Li M* (2019) Ropivacaine promotes apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through damaging mitochondria and activating caspase-3 activity. Biol Res 52(1): 36.
https://doi.org/10.1186/s40659-019-0242-7
39. *Yi S, Liu G, Wu Y, Liang Q, Li L* (2020) Baicalein suppresses the growth of the human thyroid cancer cells by inducing mitotic catastrophe, apoptosis and autophagy via NF-kB signalling pathway. J BUON 25(1): 389–394.
40. *Du WJ, Chi Y, Yang ZX, Li ZJ, Cui JJ, Song BQ, Li X, Yang SG, Han ZB, Han ZC* (2016) Heterogeneity of proangiogenic features in mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord, and placenta. Stem Cell Res & Therapy 7(1): 1–1.
https://doi.org/10.1186/s13287-016-0418-9
41. *Borner C* (2003) The Bcl2 protein family: Sensors and checkpoints for life-or-death decisions. Mol Immunol 39: 615–647.
https://doi.org/10.1016/s0161-5890(02)00252-3
42. *Lewandowska U, Szewczyk K, Owczarek K, Hrabec Z, Podsędek A, Koziołkiewicz M, Hrabec E* (2013) Flavanols from Evening Primrose (*Oenothera paradoxa*) Defatted Seeds Inhibit Prostate Cells Invasiveness and Cause Changes in Bcl-2/Bax mRNA Ratio. J Agricult and Food Chem 61(12): 2987–2998.
https://doi.org/10.1021/jf304269x
43. *Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Vassar R* (2006) Intraneuronal β-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. J Neurosci 26 (40): 10129–10140.
https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006
44. *Bobkova NV, Lyabin DN, Medvinskaya NI, Samokhin AN, Nekrasov PV, Nesterova IV, Ovchinnikov LP* (2015) The Y-box binding protein 1 suppresses Alzheimer's disease progression in two animal models. PLoS One 10 (9): e0138867.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138867
45. *Lazarov O, Marr RA* (2010) Neurogenesis and Alzheimer's disease: at the crossroads. Exp Neurol 223(2): 267–281.
https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.08.009
46. *Bonds JA, Kuttner-Hirshler Y, Bartolotti N, Tobin MK, Pizzi M, Marr R, Lazarov O* (2015) Presenilin-1 dependent neurogenesis regulates hippocampal learning and memory. PLoS One 10(6): e0131266.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131266
47. *Baum LW* (2005) Sex, hormones, and Alzheimer's disease. J Gerontol Ser A: Biol Sci and Med Sci 60(6): 736–743.
https://doi.org/10.1093/gerona/60.6.736

48. *Webber KM, Casadesus G, Perry G, Atwood CS, Bowen R, Smith MA* (2005) Gender differences in Alzheimer disease: the role of luteinizing hormone in disease pathogenesis. Alzheimer Disease & Associated Disorders 19(2): 95–99.
https://doi.org/10.1097/01.wad.0000165512.90864.3f
49. *Mielke MM, Vemuri P, Rocca WA* (2014) Clinical epidemiology of Alzheimer's disease: assessing sex and gender differences. Clin Epidemiol 6: 37–48.
https://doi.org/10.2147/CLEP.S37929
50. *Rodriguez JJ, Jones VC, Tabuchi M, Allan SM, Knight EM, LaFerla FM, Oddo S, Verkhratsky A* (2008) Impaired adult neurogenesis in the dentate gyrus of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. PloS One 13;3(8): e2935.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002935
51. *Hall AM, Roberson ED* (2012) Mouse models of Alzheimer's disease. Brain Res Bull 88(1): 3–12.
https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.11.017
52. *Vehmas AK, Kawas CH, Stewart WF, Troncoso JC* (2003) Immune reactive cells in senile plaques and cognitive decline in Alzheimer's disease. Neurobiol Aging 24(2): 321–331.
https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00090-8
53. *Itagaki S, McGeer PL, Akiyama H, Zhu S, Selkoe D* (1989) Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. J Neuroimmunol 24(3): 173–182.
https://doi.org/10.1016/0165-5728(89)90115-X
54. *Hartlage-Rübsamen M, Zeitschel U, Apelt J, Gärtner U, Franke H, Stahl T, Günther A, Schliebs R, Penkowa M, Bigl V, Roßner S* (2003) Astrocytic expression of the Alzheimer's disease β-secretase (BACE1) is stimulus-dependent. Glia 41(2): 169–179.
https://doi.org/10.1002/glia.10178
55. *Koistinaho M, Lin S, Wu XI, Esterman M, Koger D, Hanson J, Higgs R, Liu F, Malkani S, Bales KR, Paul SM* (2004) Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-β peptides. Nature Med 10(7): 719–726.
https://doi.org/10.1038/nm1058
56. *von Bartheld CS, Bahney J, Herculano-Houzel S* (2016) The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: a review of 150 years of cell counting. J Compar Neurol 524(18): 3865–3895.
https://doi.org/10.1002/cne.24040
57. *Douaud G, Groves AR, Tamnes CK, Westlye LT, Duff EP, Engvig A, Walhovd KB, James A, Gass A, Monsch AU, Matthews PM* (2014) A common brain network links development, aging, and vulnerability to disease. Proc Natl Acad Sci USA 111(49): 17648–17653.
https://doi.org/10.1073/pnas.1410378111
58. *Evgen'ev M, Bobkova N, Krasnov G, Garbuz D, Funikov S, Kudryavtseva A, Kulikov A, Samokhin A, Maltsev A, Nesterova I* (2019) The Effect of Human HSP70 Administration on a Mouse Model of Alzheimer's Disease Strongly Depends on Transgenicity and Age. J Alzheimers Dis 67(4): 1391–1404.
https://doi.org/10.3233/JAD-180987
59. *Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J* (2010) The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. Annu Rev Pathol: Mechanisms of Disease 5: 99–118.
https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144
60. *Li D, Tang J, Xu H, Fan X, Bai Y, Yang L* (2008) Decreased hippocampal cell proliferation correlates with increased expression of BMP4 in the APPswe/PS1ΔE9 mouse model of Alzheimer's disease. Hippocampus 18(7): 692–698.
https://doi.org/10.1002/hipo.20428
61. *Donovan MH, Yazdani U, Norris RD, Games D, German DC, Eisch AJ* (2006) Decreased adult hippocampal neurogenesis in the PDAPP mouse model of Alzheimer's disease. J Compar Neurol 495(1): 70–83.
https://doi.org/10.1002/cne.20840
62. *Taniuchi N, Niidome T, Goto Y, Akaike A, Kihara T, Sugimoto H* (2007) Decreased proliferation of hippocampal progenitor cells in APPswe/PS1dE9 transgenic mice. Neuroreport 18(17): 1801–1805.
https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e3282f1c9e9
63. *Demars M, Hu YS, Gadadhar A, Lazarov O* (2010) Impaired neurogenesis is an early event in the etiology of familial Alzheimer's disease in transgenic mice. J Neurosci Res 88(10): 2103–2117.
https://doi.org/10.1002/jnr.22387
64. *Boldrini M, Fulmore CA, Tartt AN, Simeon LR, Pavlova I, Poposka V, Rosoklija GB, Stankov A, Arango V, Dwork AJ, Hen R* (2018) Human hippocampal neurogenesis persists throughout aging. Cell Stem Cell 22(4): 589–599.
https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.03.015
65. *Zhang R, Cai Y, Xiao R, Zhong H, Li X, Guo L, Xu H, Fan X* (2019) Human amniotic epithelial cell transplantation promotes neurogenesis and ameliorates social deficits in BTBR mice. Stem Cell Res & Therapy 10(1): 1–3.
https://doi.org/10.1186/s13287-019-1267-0

66. *Shi Q, Chowdhury S, Ma R, Le KX, Hong S, Caldarone BJ, Stevens B, Lemere CA* (2017) Complement C3 deficiency protects against neurodegeneration in aged plaque-rich APP/PS1 mice. Sci Translat Med 9(392).
https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf6295

67. *Novoselova EG, Bobkova NV, Sinotova OA, Ogai VB, Glushkova OV, Medvinskaya NI, Samokhin AN* (2003) The immune state of bulbectomized mice. Dokl Biol Sci 393: 505–507.
https://doi.org/10.1023/b:dobs.0000010308.59629.c0

68. *Vercelli A, Mereuta OM, Garbossa D, Muraca G, Mareschi K, Rustichelli D, Ferrero I, Mazzini L, Madon E, Fagioli F* (2008) Human mesenchymal stem cell transplantation extends survival, improves motor performance and decreases neuroinflammation in mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Neurobiol Disease 31(3): 395–405.
https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.05.016

69. *Björklund A, Lindvall O* (2000) Cell replacement therapies for central nervous system disorders. Nature Neurosci 3(6): 537–544.
https://doi.org/10.1038/75705

70. *Aithal AP, Bairy LK, Seetharam RN* (2021) Safety and therapeutic potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in regenerative medicine. Stem Cell Investig 8: 10.
https://doi.org/10.21037/sci-2020-036

71. *Ko HR, Ahn SY, Chang YS, Hwang I, Yun T, Sung DK, Sung SI, Park WS, Ahn JY* (2018) Human UCB-MSCs treatment upon intraventricular hemorrhage contributes to attenuate hippocampal neuron loss and circuit damage through BDNF-CREB signaling. Stem Cell Res & Therapy 9(1): 1–5.
https://doi.org/10.1186/s13287-018-1052-5

72. *Varela-Nallar L, Inestrosa NC* (2013) Wnt signaling in the regulation of adult hippocampal neurogenesis. Front Cell Neurosci 7: 100.
https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00100

73. *Xu C, Fu F, Li X, Zhang S* (2017) Mesenchymal stem cells maintain the microenvironment of central nervous system by regulating the polarization of macrophages/microglia after traumatic brain injury. Int J Neurosci 127(12): 1124–1135.
https://doi.org/10.1080/00207454.2017.1325884

74. *Papazian I, Kyrargyri V, Evangelidou M, Voulgari-Kokota A, Probert L* (2018) Mesenchymal stem cell protection of neurons against glutamate excitotoxicity involves reduction of NMDA-triggered calcium responses and surface GluR1, and is partly mediated by TNF. Int J Mol Sci 19(3): 651.
https://doi.org/10.3390/ijms1903065

75. *Reuss B, Halbach OV* (2003) Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system. Cell Tissue Res 313(2): 139–157.
https://doi.org/10.1007/s00441-003-0756-7

76. *Isele NB, Lee HS, Landshamer S, Straube A, Padovan CS, Plesnila N, Culmsee C* (2007) Bone marrow stromal cells mediate protection through stimulation of PI3-K/Akt and MAPK signaling in neurons. Neurochem Int 50(1): 243–250.
https://doi.org/10.1016/j.neuint.2006.08.007

77. *Park HJ, Shin JY, Kim HN, Oh SH, Song SK, Lee PH* (2015) Mesenchymal stem cells stabilize the blood–brain barrier through regulation of astrocytes. Stem Cell Res & Therapy 6(1): 1–2.
https://doi.org/10.1186/s13287-015-0180-4

78. *Park HJ, Lee PH, Bang OY, Lee G, Ahn YH* (2008) Mesenchymal stem cells therapy exerts neuroprotection in a progressive animal model of Parkinson's disease. J Neurochem 107(1): 141–151.
https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05589.x

79. *Park HJ, Bang G, Lee BR, Kim HO, Lee PH* (2011) Neuroprotective effect of human mesenchymal stem cells in an animal model of double toxin induced multiple system atrophy parkinsonism. Cell Transplant 20: 827–835.
https://doi.org/10.3727/096368910X540630

80. *Poltavtsev AM, Poltavtseva RA, Yushina MN, Volgina NE, Svirshchevskaya EV* (2017) Cytokine Production in Mixed Cultures of Mesenchymal Stromal Cells from Wharton's Jelly and Peripheral Blood Lymphocytes. Bull Exp Biol Med 163(1): 169–175.
https://doi.org/10.1007/s10517-017-3759-1

81. *Полтавцева РА, Бобкова НВ, Жданова ДЮ, Свирщевская ЕВ, Сухих ГТ* (2021) Нейродегенерация альцгеймеровского типа. Возможная коррекция ухудшения памяти при внутривенном введении препарата экзосом. Биол мембр 38(5): 374–387. [*Poltavtseva RA, Bobkova NV, Zhdanova DYU, Svirshchevskaya EV, Sukhikh GT* (2021) Alzheimer's type neurodegeneration. possible correction of memory impairment with intravenous injection of exosomes. Biol Membr 38(5): 374–387. (In Russ)].
https://doi.org/10.31857/S0233475521050066

Cell Therapy as a Way to Correct Disorders of Neurogenesis in the Adult Brain in a Model of Alzheimer's Disease

A. V. Chaplygina[a], D. Y. Zhdanova[a], V. I. Kovalev[a], R. A. Poltavtseva[b, *], N. I. Medvinskaya[a], and N. V. Bobkova[a]

[a] *Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow region, Russia*
[b] *"National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology named after Academician V.I.Kulakov", Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russia*
**e-mail: rimpol@mail.ru*

Our work is based on the hypothesis of an impairments in neurogenesis during the course of aging and as a result of neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease (AD. Uncompensated neuronal death leads to loss of memory. There is an opinion that activating endogenous neurogenesis and cell replacement therapy may be the effective treatment of AD. We used mesenchymal stromal cells (MSCs) from the Wharton jelly of the human umbilical cord, having a number of significant advantages compared to MSCs from other tissues. We transplanted MSCs in the frontal cortex of transgenic (Tg) 8–9 month old female 5XFAD mice, a model of the hereditary AD. To examine the effects of MSC transplantation into the frontal cortex of the brain, the level of spatial memory was analyzed in association with the morpho-functional characteristics of the niches of adult neurogenesis – the subgranular zone of the dentate gyrus of the hippocampus (SGZ) and the subventricular zone of the lateral ventricles of the brain (SVZ), the temporal cortex and CA1/CA3 regions of the hippocampus, the brain areas responsible for learning and memory. The immunopositivity to BrdU and to the neuronal differentiation markers: nestin, doblcortin, 3-beta-tubulin, NeuN, MAP2 and GFAP were analyzed. Tg mice were characterized by a change in the ratio of the intensity of proliferative activity in the SGZ/SVZ and a decreased neuronal density in the cortex and hippocampus. Treatment with human MSCs had profound positive effect on both memory and density of neurons and astrocytes in the temporal cortex and hippocampal regions in Tg mice two months after transplantation. At the same time, MSCs were detected in the brains of Tg animals only. Both Tg and nTg mice treated with MSCs had the increased density of BrdU+ positive cells in the niches of adult neurogenesis, but decreased number of amyloid plaques and cells with apoptosis, as well as increased immunopositivity to synaptophysin were detected only in the hippocampus of Tg + MSC mice. Thus the positive effect of MSC was manifested in the hippocampus of Tg animals, a structure located at a distance from the site of cell transplantation in the frontal cortex. Overall, our data indicate that MSCs show the paracrine effect in the chimeric model and that brain transplantation of MSCs may be an effective therapy of AD.

Keywords: Alzheimer's disease, neurogenesis, mesenchymal stem cells, 5XFAD transgenic females

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2022, том 108, № 1, с. 85–97

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УЧАСТИЕ 5-HT_1 И 5-HT_{5A} РЕЦЕПТОРОВ В МОДУЛЯЦИИ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ И ВНУТРЕННИХ СВОЙСТВ МЕМБРАНЫ СПИНАЛЬНЫХ МОТОНЕЙРОНОВ ЛЯГУШКИ (*Rana ridibunda*)

© 2022 г. Н. И. Калинина[1, *], Н. П. Веселкин[1, 2]

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

[2]*Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

**E-mail: nkalinina54@mail.ru*

Поступила в редакцию 31.10.2021 г.
После доработки 15.11.2021 г.
Принята к публикации 15.11.2021 г.

Эндогенный моноамин серотонин (5-HT) участвует в модуляции моторного выхода у позвоночных животных, взаимодействуя с различными типами 5-HT рецепторов. Ранее 5-HT_{5A} рецепторы были обнаружены в поясничных мотонейронах крысы с помощью иммуногистохимических методов, где предполагается их постсинаптическая локализация. Однако сведений о наличии 5-HT_{5A} рецепторов в поясничном отделе спинного мозга низших позвоночных (в том числе амфибий) мы не обнаружили. В настоящей работе с использованием фармакологического подхода, вне- и внутриклеточной регистрации потенциалов острым электродом исследовано возможное участие 5-HT_{5A} рецепторов (наряду с 5-HT_1 рецепторами) в модуляции моторного выхода спинальных мотонейронов лягушки *Rana ridibunda*. Результаты внеклеточного отведения (при аппликации 5-CT, агониста 5-HT_1 и 5-HT_{5A} рецепторов и SB-699551 селективного антагониста 5-HT_{5A} рецептора) указывают на пространственно-временную модуляцию активности нейронов вентрального рога. Изменение амплитуды полевого антидромного потенциала, пиковой амплитуды вызванного корешкового потенциала и внутриклеточного дорсально-корешкового постсинаптического потенциала, а также изменение частоты внеклеточных спайков и латентности первого внутриклеточного ПД при аппликации 5-CT были время-зависимыми: в первые минуты наблюдалась потенциация, которая позже сменялась угнетением. Суммарно полученные результаты свидетельствуют об участии 5-HT_{5A} рецепторов наряду с 5-HT_1 рецепторами в модуляции моторного выхода спинальных мотонейронов лягушки.

Ключевые слова: лягушка, спинной мозг, мотонейрон, 5-HT_{5A} рецептор, синаптическая передача

DOI: 10.31857/S0869813922010071

Список сокращений: ДК – дорсальный корешок; ВК – вентральный корешок; ДК-ВК – корешковый потенциал, регистрируемый с ВК при стимуляции ДК; ДК ПСП – внутриклеточный вызванный дорсально-корешковый постсинаптический потенциал; ПД – потенциал действия; ТТХ – тетродотоксин; 5-CT – 5-Carboxamidotryptamine maleate, агонист 5-HT1A,B/D, 5-HT5A, а также 5-HT7 рецепторов; MS – метисергид антагонист 5-HT 1,2 рецепторов; SB 699551 – селективный антагонист 5-HT5A рецепторов; AHP – следовая гиперполяризация; fAHP – быстрая фаза следовой гиперполяризации; mAHP – средняя фаза следовой гиперполяризации; МПП – мембранный потенциал покоя.

ВВЕДЕНИЕ

Эндогенный моноамин серотонин (5-HT) участвует в модуляции моторного выхода, взаимодействуя с различными типами 5-HT рецепторов [1–6]. Серотонинергические нейроны, локализованные в ядрах шва и ретикулярной формации, дают проекции почти ко всем областям головного и спинного мозга. У млекопитающих нисходящие серотонинергические волокна образуют синапсы на соматодендритной мембране поясничных мотонейронов [7, 3].

В настоящее время различают 7 семейств серотониновых рецепторов 5-HT_{1-7}, которые объединяют 16 подтипов. За исключением 5-HT_3 рецепторов, которые представляют собой лиганд-управляемые ионные каналы, все остальные типы 5-HT рецепторов являются метаботропными, связанными с G-белками [8–10].

Экспрессия различных подтипов 5-HT рецепторов исследовалась разными методиками, включая *in situ* гибридизацию, фармакологию, иммуногистохимию. В мотонейронах млекопитающих обнаружены 5-$HT_{1A,B/D}$, 5-$HT_{2A,B,C}$ [3] и 5-HT_{5A} рецепторы [11–13], для остальных подтипов 5-HT рецепторов данных нет.

Ранее мы показали, что в поясничных мотонейронах лягушки серотонин уменьшает частоту глицинергических миниатюрных тормозных постсинаптических потенциалов (мТПСП), не оказывая заметного влияния на частоту ГАМКергических мТПСП [14]. Этот эффект реализуется посредством активации пресинаптических 5-$HT_{1B/D}$ рецепторов и приводит к частичному облегчению моторного выхода [15]. Кроме того, мы получили данные, свидетельствующие о наличии 5-HT_{1A} и 5-$HT_{2B,C}$ рецепторов на постсинаптической мембране поясничных мотонейронов лягушки, и предположили возможную совместную модуляцию аккомодационных свойств мотонейрона этими двумя типами серотониновых рецепторов [16].

5-HT_{5A} рецепторы относятся к малоисследованной группе серотониновых рецепторов [9]. Недостаточное понимание роли этого рецептора частично объяснялось отсутствием доступных селективных лигандов 5-HT_{5A} рецептора [17, 18]. Рецептор 5-HT_{5A} остается только условно классифицированным в семействе рецепторов 5-HT (база данных IUPHAR) [10]. Хотя селективного агониста до сих пор нет, разработка его селективного антагониста (SB-699551) [19] позволила детальнее исследовать функциональную роль этого “орфанного” рецептора [20]. Этот малоизученный подтип принадлежит семейству рецепторов, связанных с G-белком, которые отрицательно влияют на аденилатциклазу [21–23]. Его активация приводит к мобилизации внутриклеточного Ca^{2+} [24] и стимуляции внутренне выпрямляющих калиевых каналов [20, 25].

Рецепторы 5-HT_{5A} в основном локализуются в коре головного мозга, гиппокампе и мозжечке [26], а также в миндалине, хвостатом ядре, мозжечке, гипоталамусе, черной субстанции, таламусе и спинном мозге [11, 27–30]. 5-HT_{5A} рецепторы были обнаружены иммуногистохимически в поясничных мотонейронах дорсолатерального ядра и в мотонейронах Lamina IX спинного мозга крысы [11, 31]. Наблюдения, полученные с помощью электронного микроскопа, предполагают постсинаптическую локализацию 5-HT_{5A} рецепторов [11].

Умеренная экспрессия 5-HT_{5A} рецепторов во всех группах мотонейронов Lamina IX и в колонке промежуточных дилатеральных клеток (по сравнению с дорсальным рогом и дорсолатеральным ядром L6) предполагает, что 5-HT_{5A} рецепторы также участвуют в контроле моторных и вегетативных функций [11]. Учитывая это, мы предположили, что 5-HT_{5A} рецепторы могут играть роль в модуляции моторного выхода у амфибий.

В недавних экспериментах на крысах было показано, что при активации 5-HT_{5A} рецепторов уменьшаются болевые ощущения в спинном мозге, а 5-HT и агонист серотонина 5-CT уменьшают нейропатическую боль посредством активации рецепторов 5-HT_{5A} и 5-$HT_{1A,B/D}$. Эти рецепторы могут быть важной частью нисходящей системы подавления боли у млекопитающих [32–34]. Данных о наличии 5-HT_{5A} рецепторов в поясничном отделе спинного мозга низших позвоночных (в том числе амфибий) мы не обнаружили. Поэтому в данной работе мы поставили цель проверить наличие 5-HT_{5A} рецепторов и в случае присутствия исследовать их роль (наряду с ролью 5-HT_1 рецепторов) в модуляции моторного выхода (синаптической передачи и собственных свойств мембраны) спинальных мотонейронов лягушки *Rana ridibunda*. Для этого мы провели электрофизиологическую регистрацию внеклеточных и внутриклеточных потециалов мотонейронов в присутствии селективных антагонистов и агонистов $5HT_{1,5A}$ рецепторов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Приготовление среза спинного мозга

Опыты проводили на препарате поясничного сегмента изолированного спинного мозга лягушки *Rana ridibunda*. Эксперименты выполнялись в соответствии с требованиями Комитета по биоэтике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, разработанными на основе международных рекомендаций European Communities Council Directive 1986 (86/609/EEC). Под эфирным наркозом производили дорсальную ламинэктомию. После снятия оболочки выделяли IX и X сегменты спинного мозга вместе с корешками в виде фронтальных срезов толщиной 2–3 мм (такая толщина позволяет регистрировать в середине среза структурно неповрежденные клетки). Один из них фиксировали в экспериментальной камере ростральной поверхностью вверх. Приготовление препарата, устройство камеры, схема эксперимента подробно описаны ранее [14].

Для перфузии использовали раствор следующего состава (мМ): 100 NaCl, 2 KCl, 0.5 $MgCl_2$, 5.5 глюкоза, 1.5 $CaCl_2$, 9 $NaHCO_3$, 2 Трис, pH 7.4–7.6, аэрируемый газовой смесью (98% O_2 и 2% CO_2) и имеющий температуру 16–18°C. Скорость протока составляла 6 мл/мин, объем ванны 0.5 мл.

Внеклеточная и внутриклеточная регистрация потенциалов

Потенциалы регистрировали с помощью микроэлектродного дифференциального усилителя, разработанного в нашей лаборатории (вед. инж. Б.Т. Рябов), оцифровывали с частотой 10–20 кГц с помощью АЦП NI USB-6211 (National Instruments, США) и записывали на компьютере, используя программу WinWCP (Strathclyde Electrophysiology Software, Великобритания).

Потенциалы отводили от мотонейронов IX или X сегментов как внеклеточно (вблизи ядра поясничных мотонейронов), так и внутриклеточно с помощью острых стеклянных микроэлектродов с диаметром кончика 1–1.5 мкм, заполненных 3М раствором KCl, имевших сопротивление 10–20 МОм. Глубина погружения микроэлектрода, двигавшегося строго вертикально вдоль колонки мотонейронов, составляла от 300 до 1200 мкм от ростральной поверхности среза в зоне неповрежденных клеток. Известно, что поясничный спинальный мотонейрон является самой крупной клеткой спинного мозга, имеющей разветвленное дендритное дерево. Дендриты поясничных мотонейронов лягушки могут распространяться в ростро-каудальном направлении спинного мозга на расстояние до 2 мм [35]. Учитывая особенности структуры мотонейронов, неповрежденные клетки можно наколоть

примерно в середине среза, т.е. на указанной выше глубине. Клетки, расположенные в зоне повреждения структуры дендритов (до 300 мкм от ростральной поверхности мозга), имеют отличные от здоровых клеток параметры, что показано нами ранее [36]. Поясничные мотонейроны идентифицировали по наличию антидромного потенциала действия, возникающего при стимуляции IX или X вентрального корешка. В анализ включали мотонейроны с мембранным потенциалом покоя не менее –60 мВ и амплитудой антидромного потенциала действия не менее 70 мВ.

Фармакология

Агонист 5-$HT_{1A,B/D}$ и 5-HT_{5A} рецепторов (5-CT, 5–10 мкМ), антагонист 5-$HT_{1,2}$ рецепторов (метисергид, MS, 10 мкМ) и селективный антагонист 5-HT_{5A} рецепторов (SB 699551, 10 мкМ) добавляли в перфузирующий раствор. Все реактивы были приобретены в Sigma-Aldrich или Tocris Bioscience.

Статистическая обработка

Анализ первичных электрофизиологических данных производился с использованием программы Clampfit 10.5 (Molecular Devices, США). Для статистического анализа и графического представления результатов использовали программу Sigma Plot 12.5. Нормальность распределения данных оценивалась по критерию Шапиро–Уилка. Статистическая значимость оценивалась с использованием парного критерия Стьюдента и однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующими апостериорными сравнениями средних значений по тесту Тьюки. Все значения приведены как среднее ± стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Влияние аппликации агониста 5-HT_{5A} и антагониста 5-$HT_{1,2}$ рецепторов на антидромный полевой потенциал (внеклеточная регистрация)

Аппликация 5-CT, агониста 5-$HT_{1A,B/D}$ и 5-HT_{5A} рецепторов достоверно вызывала потенциацию амплитуды антидромного полевого потенциала, регистрируемого внеклеточно вблизи поясничных мотонейронов с 2.3 ± 0.3 мВ до 3.4 ± 0.3 мВ ($n = 6$). Потенциация исчезала при отмывке в нормальном растворе (рис. 1*a*, слева сверху).

Чтобы выявить, эффект активации конкретных подтипов 5-HT рецепторов, мы использовали совместное применение 5-CT с селективным антагонистом 5-HT_{5A} рецепторов – SB 699551 и селективным антагонистом 5-$HT_{1A,B/D}$ рецепторов – метисергидом. Потенциация ответа была меньше (2.8 ± 0.5 мВ, $n = 6$) при совместной аппликации 5-CT и селективного антагониста 5-HT_{5A} рецепторов SB 699551 (10 мкМ), то есть активация только 5-$HT_{1A,B/D}$ рецепторов была недостаточна для полной потенциации, вызванной аппликацией 5-CT (рис. 1*a*). В то же время при блокировании 5-$HT_{1A,B/D}$ рецепторов метисергидом (при преимущественной активации 5-HT_{5A} рецепторов) увеличение амплитуды полевого потенциала сохранялось, составив 3.8 ± 0.4 мВ против 2.6 ± 0.3 мВ в контроле, $n = 6$ (рис. 1*b*).

Этот результат свидетельствует об участии в потенциации антидромного полевого потенциала как 5-$HT_{1A,B/D}$, так и 5-HT_{5A} рецепторов в разной степени, причем эффект 5-HT_{5A} рецепторов преобладает.

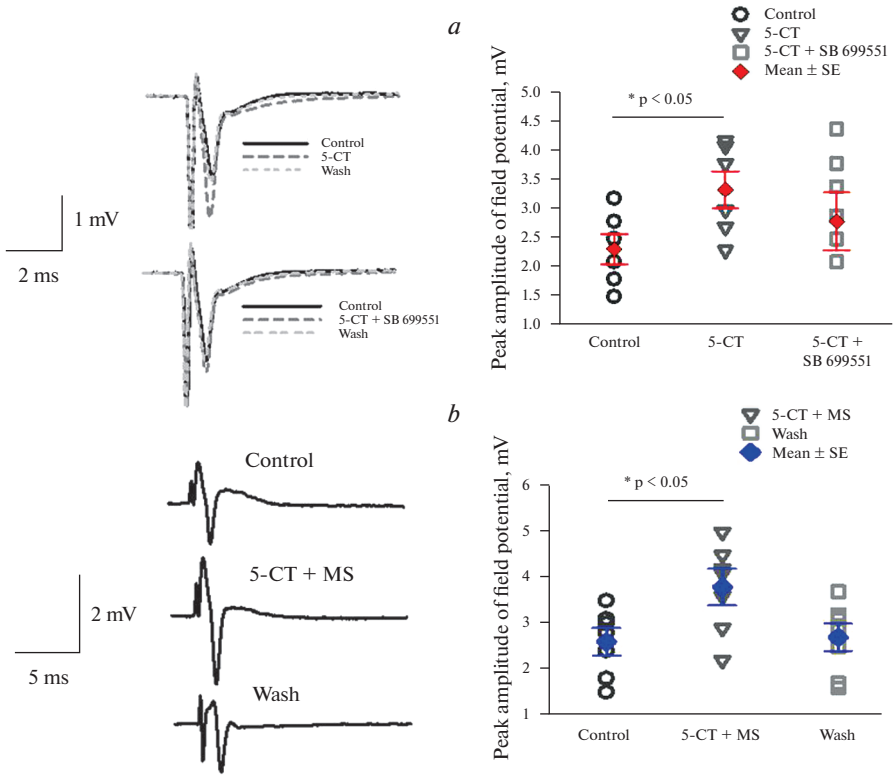


Рис. 1. Действие агониста и антагонистов 5-HT$_{1A,B/D,\ 5A}$ рецепторов на амплитуду полевого антидромного потенциала. (*a*) – 5-CT потенцирует (слева вверху), а смесь 5-CT и SB 699551 вызывает меньшую потенциацию (слева внизу), однофакторный дисперсионный анализ ($F_{1,10}$ = 6.2), (*b*) – потенциация амплитуды антидромного полевого потенциала при совместной аппликации 5-CT и метисергида, однофакторный дисперсионный анализ ($F_{2,12}$ = 4.5).

2. Модуляция полевого антидромного потенциала по величине и по времени

Действие агониста 5-CT и антагонистов 5HT$_{1A,B/D}$ и 5-HT$_{5A}$ рецепторов на полевой антидромный потенциал отличалось как по величине, так и по времени развития эффекта (рис. 2*a*). При активации 5-HT$_{5A}$ рецепторов потенциация происходила раньше по времени (через 5–7 мин) и была больше по величине (порядка 47%), в то время как активация 5HT$_{1A,B/D}$ рецепторов вызывала меньшую потенциацию (порядка 22%), развивающуюся медленнее (20–25 мин). При совместной активации 5-HT$_{5A}$ и 5-HT$_{1A,B/D}$ рецепторов потенциация была такая же, как при активации 5-HT$_{5A}$ рецепторов (составляя по величине порядка 46%), но максимальный эффект развивался позже по времени (через 10–12 мин).

3. Эффект совместной аппликации 5-CT и метисергида на частоту вызванных внеклеточных антидромных ПД

При совместной аппликации 5-CT и метисергида, т.е. активации 5-HT$_{5A}$ рецепторов, наблюдалось увеличение амплитуды ПД примерно вдвое, количество внеклеточных ПД, возникающих в ответ на антидромную стимуляцию вентрального

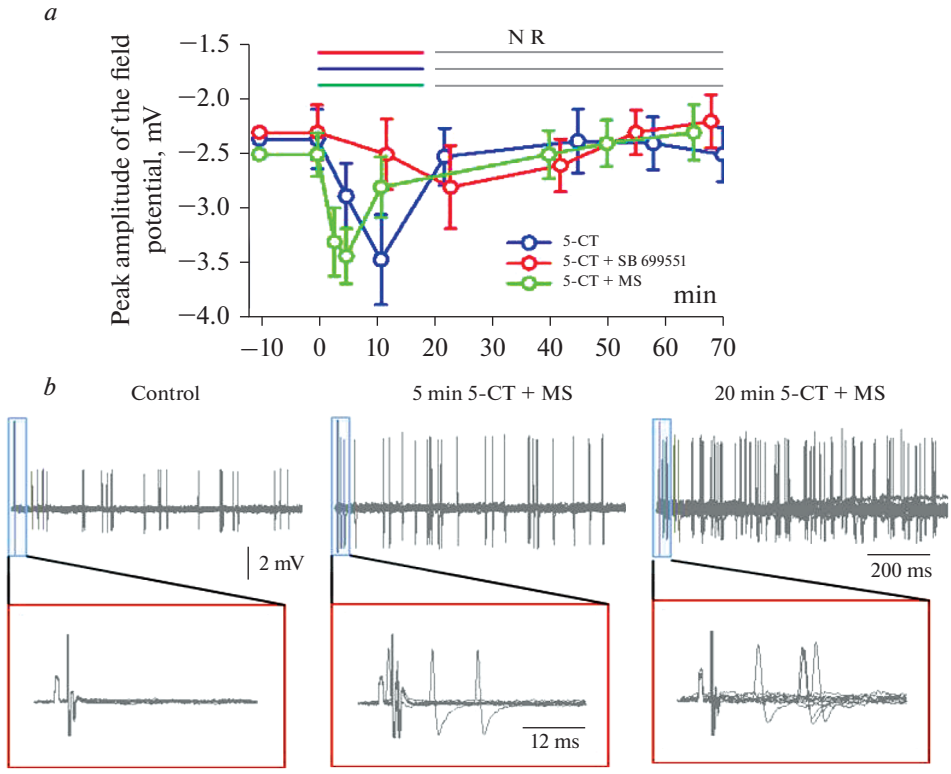


Рис. 2. Модуляция полевого антидромного потенциала по величине и по времени в зависимости от типа активируемых рецепторов (*a*) и модуляция по амплитуде и частоте внеклеточных ПД (*b*). (*b*) – увеличение числа внеклеточных антидромных ПД и амплитуды ПД при совместной аппликации агониста (5-CT) и антагониста 5-$HT_{1,2}$ рецепторов метисергида (активация 5-HT_{5A} рецепторов). Наложение 10 пробегов. На развертке 30 мс (нижние записи) хорошо видна потенциация антидромного полевого потенциала через 5 мин, а через 20 мин – восстановление к исходному уровню, хотя количество ПД при этом продолжает нарастать.

корешка, возросло в 4 раза (рис. 2*b*). Время-зависимый эффект активации серотониновых рецепторов на изменение амплитуды полевого антидромного потенциала сохранялся: вначале наблюдали потенцирующий эффект, который позже сменялся угнетающим (рис. 2*b*). Однако частота генерации ПД продолжала увеличиваться в течение всего эксперимента. Возможным механизмом этого явления может быть активация других нейронов в локальных сетях спинного мозга, однако это предположение требует дополнительной экспериментальной проверки.

4. Действие 5-CT и MS на вызванные корешковые потенциалы

При активации 5-$HT_{1A,B/D,\ 5A}$ рецепторов с помощью агониста 5-CT (5–10 мкМ) наблюдалось уменьшение амплитуды ранних моно- и дисинаптических компонентов (с латентностью 2–12 мс) до 33 ± 7% от начального уровня и увеличение на 46 ± 8% (n = 6) амплитуды поздних компонентов (с латентностью 12–200 мс) корешковых потенциалов, регистрируемых от вентрального корешка при стимуляции дорсального корешка (ДК-ВК потенциалов). Соответственно изменялась пло-

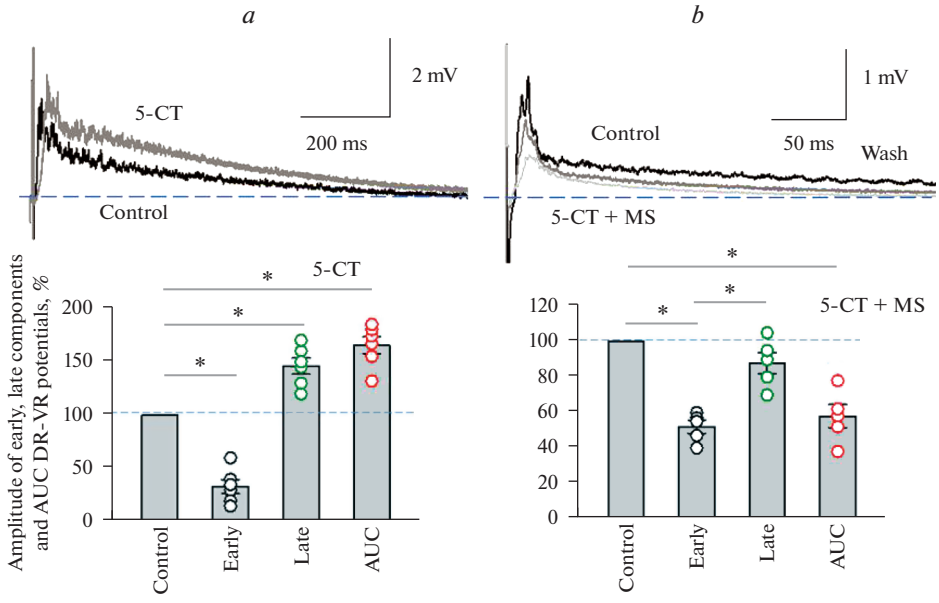


Рис. 3. Действие агониста 5-CT (активация 5-HT$_{1A,B/D}$ и 5-HT$_{5A}$ рецепторов) (*a*) и совместное действие 5-CT и метисергида (MS) (активация 5-HT$_{5A}$ рецепторов) (*b*) на корешковые ДК-ВК потенциалы. Однофакторный дисперсионный анализ. Для (*a*): $F_{3,20} = 84.3$; для (*b*): $F_{3,16} = 23.6$. * $p < 0.001$ (Tukey Test).

щадь под кривой ДК-ВК потенциалов (увеличение на 66 ± 8%, $n = 6$) (рис. 3*a*). Активации 5-HT$_{5A}$ рецепторов путем аппликации неселективного агониста 5-CT в условиях блокады 5-HT$_{1A,B/D}$ рецепторов с помощью метисергида вызывала уменьшение амплитуды ранних компонентов в два раза (до 52 ± 5% от начального уровня, $n = 5$), т.е. в меньшей степени, чем при аппликации одного агониста (5-CT). Кроме того, исчезал эффект потенциации поздних компонентов ДК-ВК ответа. Амплитуда поздних компонентов и площадь под кривой также уменьшались (до 88 ± 6% и до 58 ± 7% соответственно) (рис. 3*b*). Эти результаты указывают на участие в модуляции вызванной синаптической активности как 5-HT$_{1A,B/D}$, так и 5-HT$_{5A}$ рецепторов.

5. Действие 5-CT и метисергида на вызванные внутриклеточные потенциалы

При внутриклеточной регистрации многокомпонентного ПСП, вызванного стимуляцией дорсального корешка (ДК ПСП), аппликация 5-CT вызывала время-зависимый эффект: в первые 3–5 мин наблюдалась кратковременная потенциация пиковой амплитуды ДК ПСП на 53 ± 4.4%, а затем, через 10–15 мин, – уменьшение амплитуды ДК ПСП до 76 ± 4% ($n = 5$, *t*-test, $p < 0.001$) от исходного ответа (рис. 4*a*, *b*). При блокировании 5-HT$_{1A,B/D}$ рецепторов метисергидом время-зависимый эффект не наблюдался, ответ уменьшался, и через 14 мин составлял примерно 20% от исходного в контроле (рис. 4*c*, *d*, *e*). Эти наблюдения указывают на ингибирующую роль 5-HT$_{5A}$ рецепторов на пиковую амплитуду внутриклеточного ДК ПСП.

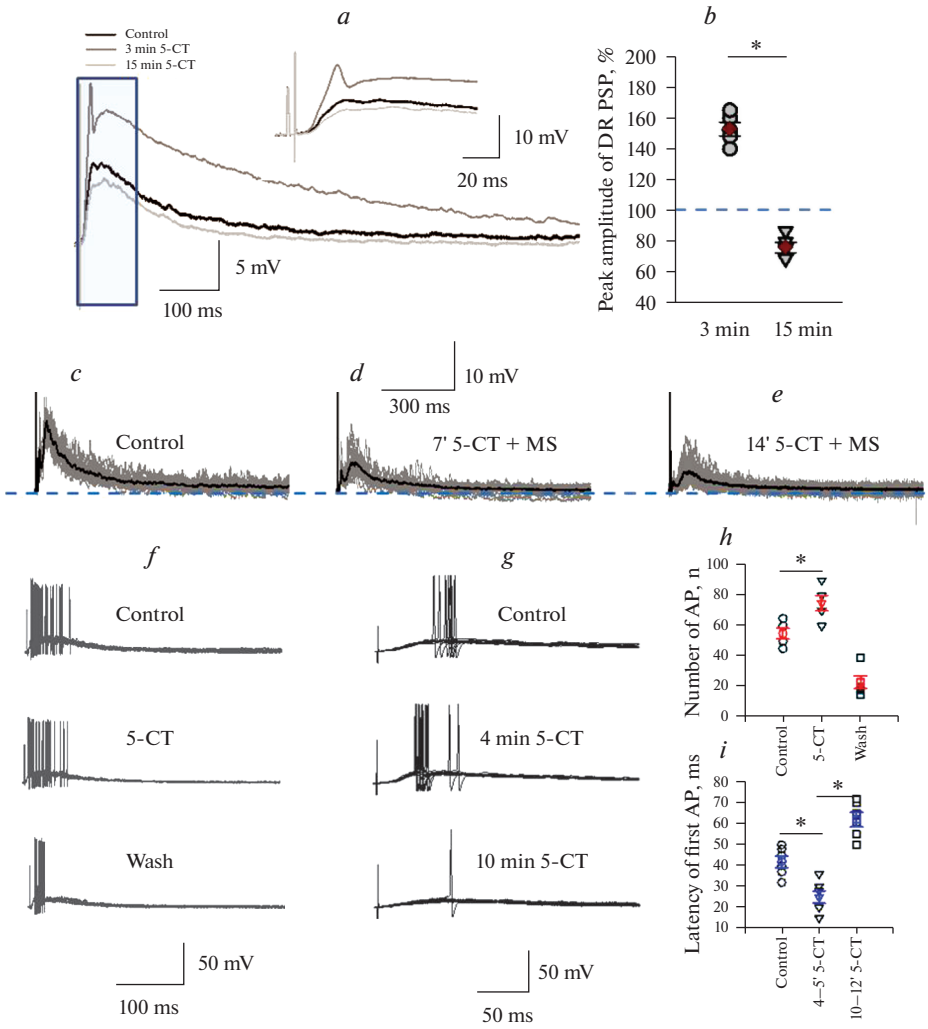


Рис. 4. Время-зависимый эффект 5-CT на вызванный внутриклеточный ДК ВПСП. (*a*) – активация 5-HT_1 и 5-HT_{5A} рецепторов вызывает первоначальную потенциацию (3 мин аппликации) и последующее угнетение ответа (14 мин аппликации). На вставке показано то же самое при меньшей развертке; (*b*) – соответствующая столбчатая диаграмма; (*c*, *d*, *e*) – потенциация пропадает при блокировании 5-$HT_{1A,B/D}$ рецепторов с помощью метисергида (MS): контроль, 7 мин, 14 мин соответственно аппликации смеси 5-CT + MS. Наблюдается угнетение всего ДК ВПСП (парный *t*-тест Стьюдента, $p < 0.05$). (*f*) – увеличение количества ПД при аппликации 5-CT и уменьшение при отмывке ниже исходного уровня; (*g*) – уменьшение латентности первого ПД при стимуляции ДК через 4 мин и увеличение ее через 10 мин аппликации; (*h*, *i*) – соответствующие диаграммы (время-зависимый эффект), для (*h*): *t*-тест, $p = 0.04$; для (*i*): однофакторный дисперсионный анализ $p < 0.001$ (тест Тьюки), $F_{2,15} = 34$.

6. Действие 5-CT на частоту и латентность ПД, вызванных стимуляцией ДК

Поскольку 5-CT вызывает потенциацию антидромного полевого потенциала (рис. 1*a*, слева), отражающего синхронный разряд мотонейронов, то можно ожидать увеличение числа внутриклеточных ПД, возникающих в каждом отдельном

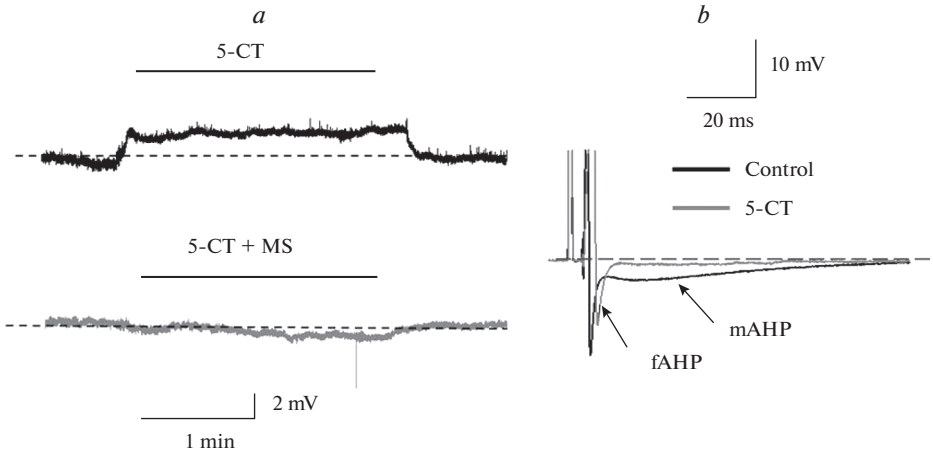


Рис. 5. Действие 5-CT и смеси 5-CT + MS на МПП в условиях блока спайковой активности с помощью TTX – (*a*). Действие 5-CT на кинетические параметры и следовую гиперполяризацию антидромного ПД – (*b*).

мотонейроне при стимуляции ДК. Этот эффект продемонстрирован на рис. 4*f*. Аппликация 5-CT через 5–6 мин увеличивала среднее число ПД от 55 ± 4 до 75 ± 5 ($n = 5$, *t*-test, $p = 0.04$), при отмывке число ПД снижалось до 23 ± 4, что ниже исходного в контроле (рис. 4*f*, *h*). На рис. 4*g* проиллюстрировано укорочение латентности первого ПД с 42 ± 3 мс в контроле до 26 ± 3 мс через 4 мин аппликации 5-CT (начальный эффект) и последующее увеличение через 10–12 мин аппликации 5-CT до 62 ± 4 мс ($n = 6$).

7. Действие 5-CT и метисергида на мембранный потенциал покоя, кинетические параметры, быструю и среднюю фазы следовой гиперполяризации антидромного ПД

Чтобы выявить эффект 5-CT на пассивные свойства мембраны мотонейронов, агонист добавляли в перфузирующий раствор в условиях блока спайковой активности с помощью блокатора натриевых каналов TTX (1 мкМ). Аппликация 5-CT вызывала небольшую деполяризацию мембраны в большинстве случаев на 1.5–2.0 мВ ($n = 4$, парный *t*-тест, $p < 0.05$, рис. 5*a*, сверху), деполяризация исчезала при совместной аппликации 5-CT и антагониста 5-HT$_{1,2}$ рецепторов метисергида (рис. 5*a*, внизу).

В отсутствие TTX аппликация 5-CT уменьшала амплитуду антидромного ПД (на 18.0 ± 0.5%, $n = 5$) и увеличивала его полуширину более чем в два раза, также снижались амплитуды быстрой (fAHP) и средней (mAHP) фаз следовой гиперполяризации: в среднем на 36.0 ± 0.2% и на 83.0 ± 0.3%, $n = 5$ соответственно (рис. 5*b*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В наших экспериментах при внеклеточной регистрации как совместная, так и раздельная активация 5-HT$_{1A,B/D}$ и 5-HT$_{5A}$ рецепторов в первые несколько минут вызывали потенциацию амплитуды негативной волны полевого антидромного потенциала, отражающего синхронный разряд нейронов, но в различной степени. Следовательно, как 5-HT$_{1A,B/D}$, так и 5-HT$_{5A}$ рецепторы вызывают потенциацию ан-

тидромного полевого потенциала. При активации 5-HT_{5A} рецепторов потенциация происходила быстрее по времени и была больше по величине, в то время как активация 5-$HT_{1A,B/D}$ рецепторов вызывала меньшую потенциацию, развивающуюся медленнее. При совместной активации 5-HT_{5A} и 5-$HT_{1A,B/D}$ рецепторов потенциация усиливалась по величине и развивалась быстрее. Эти наблюдения указывают на пространственно-временную модуляцию активности нейронов вентрального рога (как мотонейронов, так, по-видимому, и интернейронов).

Изменение амплитуды полевого антидромного потенциала, пиковой амплитуды вызванных корешкового потенциала и внутриклеточного ДК ПСП, а также изменение частоты внеклеточных спайков и латентности первого внутриклеточного ПД при аппликации 5-СТ были время-зависимыми: в первые 3–5 мин наблюдалась потенциация этих параметров, что свидетельствовало о возбуждающем эффекте, в последующие 10–15 мин потенциация сменялась угнетением. Аналогичный время-зависимый эффект при аппликации агониста 5-$HT_{1A,7}$ рецепторов 8-OH-DPAT мы наблюдали в наших предыдущих исследованиях [36] при регистрации антидромного полевого потенциала: в первые 3–5 мин – увеличение амплитуды полевого потенциала, а затем снижение ее через 15 мин. 8-OH-DPAT оказывал время-зависимое действие также на частоту и время возникновения антидромного ПД: первоначально увеличивал возбудимость мотонейронов, а затем уменьшал ее. Наблюдаемую нами потенциацию можно объяснить тем, что 5-HT_{5A} рецепторы могут постсинаптически подавлять тормозные интернейроны [11, 37]. Таким образом, активация рецепторов 5-HT_{5A}5-$HT_{1A,7}$ в тормозных и возбуждающих интернейронах может производить противоположный эффект [32].

В предыдущей работе [16] мы показали, что агонист 5-$HT_{1A,7}$ рецепторов 8-OH-DPAT не вызывал деполяризацию мембраны и не изменял входное сопротивление. Учитывая это, мы предполагаем, что 5-СТ вызывает деполяризацию, активируя либо 5-$HT_{1B/D}$, либо 5-HT_{5A} рецепторы. Мы не зарегистрировали изменение МП при блокировании 5-$HT_{1A,B/D}$ рецепторов метисергидом (рис. 5*а*, внизу), возможно, потому, что понимание индивидуальной роли 5-HT_{5A} рецепторов и рецепторов 5-HT_1 типа усложнено, из-за того, что рецепторы 5-HT_{5A} и 5-HT_{1A} связываются с множественными системами вторичных мессенджеров, которые могут перекрестно взаимодействовать друг с другом [30, 38].

В статье Goodfellow с соавт. [20] показано, что удаление гена, ответственного за экспрессию 5-HT_{5A} рецептора у нокаутных мышей, приводит к неожиданно большому увеличению ингибирующих токов 5-HT_{1A} рецептора. Авторы предполагают, что присутствие тесно связанных рецепторов 5-HT_{1A} и 5-HT_{5A} в одних и тех же нейронных клетках может служить биологической защитой, так что нарушение одного рецептора может вызвать компенсаторную активацию другого рецептора [39].

Полученные результаты подтверждают наше предположение об участии 5-HT_{5A} рецепторов наряду с 5-HT_1 рецепторами в модуляции моторного выхода спинальных мотонейронов лягушки. Однако, учитывая сложные взаимодействия 5-HT_{5A} рецепторов с 5-HT_1 и, возможно, с другими типами серотониновых рецепторов, необходимы дополнительные исследования.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках государственного задания Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова РАН (075-00408-21-00).

ВКЛАД АВТОРОВ

Н.И.К. – планирование эксперимента, сбор данных, обработка данных, написание статьи, Н.П.В. – обсуждение результатов и редактирование статьи.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Nakamura K, Wong-Lin K* (2014) Functions and computational principles of serotonergic and related systems at multiple scales. Front Integr Neurosci 8: 1–2. https://doi.org/10.3389/fnint.2014.00023
2. *Ciranna L* (2006) Serotonin as a modulator of glutamate and GABA-mediated neurotransmission: implications in physiological functions and in pathology. Current Neuropharmacol 4: 101–114. https://doi.org/10.2174/157015906776359540
3. *Rekling JC, Funk GD, Bayliss DA, Dong X-W, Feldman JL* (2000) Synaptic control of motoneuronal excitability. Physiol Rev 80 (2): 767–852. https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.2.767
4. *Jacobs BL, Azmitia EC* (1992) Structure and function of the brain serotonin system. Physiol Rev 72: 165–229. https://doi.org/10.1152/physrev.1992.72.1.165
5. *Schmidt BJ, Jordan LM* (2000) The role of serotonin in reflex modulation and locomotor rhythm production in the mammalian spinal cord. Brain Res Bull 53: 689–710. https://doi.org/10.1016/S0361-9230(00)00402-0
6. *Zhang M* (2016) Normal distribution and plasticity of serotonin receptors after spinal cord injury and their impacts on motor outputs. In: Recovery of motor function following spinal cord injury, Heidi Fuller and Monte Gates, IntechOpen. https://doi.org/10.5772/63759
7. *Alvarez FJ, Pearson JC, Harrington D, Dewey D, Torbeck L, Fyffe REW* (1998) Distribution of 5-hydroxytryptamine-immunoreactive boutons on α-motoneurons in the lumbar spinal cord of adult cats. J Comp Neurol 393: 69–83. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19980330)393:1<69::AID-CNE7>3.0.CO;2-O
8. *Fink KB, Gőthert M* (2007) 5-HT receptor regulation of neurotransmitter release. Pharmacol Rev 59(4): 360–417. https://doi.org/10.1124/pr.59.07103
9. *Hoyer D, Hannon JP, Martin GR* (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. Pharmacol Biochem Behav 71: 533–554. https://doi.org/10.1016/S0091-3057(01)00746-8
10. *Hannon J, Hoyer D* (2008) Molecular biology of 5-HT receptors. Behav Brain Res 195: 198–213. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.03.020
11. *Doly S, Fischer J, Brisorgueil MJ, Vergé D, Conrath M* (2004) 5HT5A receptor localization in the rat spinal cord suggests a role in nociception and control of pelvic floor musculature. J Comp Neurol 476: 316–329. https://doi.org/10.1002/cne.20214
12. *Perrier J-F, Rasmussen HB, Christensen RK, Petersen AV*(2013) Modulation of the intrinsic properties of motoneurons by serotonin. Current Pharmaceutical Design 19: 4371–4384. https://doi.org/10.2174/1381612813199990341
13. *Perrier J-F, Cotel F* (2015) Serotonergic modulation of spinal motor control. Current Opinion Neurobiol 33: 1–7. https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.12.008
14. *Kalinina N, Kurchavyi G, Zaitsev A, Veselkin N* (2016) Presynaptic serotonergic modulation ofspontaneous and miniature synaptic activity in frog lumbar motoneurons. J Evol Biochem Phys 52:359–368. https://doi.org/10.1134/S0022093016050045
15. *Kalinina NI, Zaitsev AV, Vesselkin NP* (2018) Presynaptic serotonin 5-HT1B/D receptor mediated inhibition of glycinergic transmission to the frog spinal motoneurons. J Comp Physiol A. 204 (3): 329–337. https://doi.org/10.1007/s00359-017-1244-y
16. *Kalinina NI, Zaitsev AV, Vesselkin NP* (2019) Different Effects of 5-HT_1 and 5-HT_2 Receptor Agonists on Excitability Modulation of Motoneurons in Frog Spinal Cord. J Evol Biochem

Phys 55(4): 284–292.
https://doi.org/10.1134/S0022093019040045

17. *Thomas DR, Soffin EM, Roberts C, Kew JN, de la Flor RM, Dawson LA, Fry VA, Coggon SA, Faedo S, Hayes PD, Corbett DF, Davies CH, Hagan JJ, Thomas DR* (2006) SB-699551-A (3-cyclopentyl-N-[2-(dimethylamino)ethyl]-N-[(4'-{[(2-phenylethyl)amino]methyl}-4-biphenylyl)methyl]propanamide dihydrochloride), a novel 5-ht5A receptor-selective antagonist, enhances 5-HT neuronal function: Evidence for an autoreceptor role for the 5-ht5A receptor in guinea pig brain. Neuropharmacology 51(3): 566–577.
https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.04.019
18. *Thomas DR* (2006) 5-ht5A Receptors as a Therapeutic Target. Pharmacol Ther 111(3): 707–714.
https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.12.006
19. *Corbett DF, Heightman TD, Moss SF, Bromidge SM, Coggon SA, Longley MJ, Roa AM, Williams JA, Thomas DR* (2005) Discovery of a potent and selective 5-ht5A receptor antagonist by high-throughput chemistry. Bioorg Med Chem Lett 15: 4014–4018.
https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.06.024
20. *Goodfellow NM, Bailey CDC, Lambe EK* (2012) The Native Serotonin 5-HT5A Receptor: Electrophysiological Characterization in Rodent Cortex and 5-HT1A-Mediated Compensatory Plasticity in the Knock-Out Mouse. J Neurosci 32(17): 5804–5809.
https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4849-11.2012
21. *Francken BJB, Jurzak M, Vanhauwe JFM, Luyten WHML, Leysen JE* (1998) The human 5-ht5A receptor couples to Gi/Go proteins and inhibits adenylate cyclase in HEK-293 cells. Eur J Pharmacol 361: 299–309.
https://doi.org/10.1016/S0014-2999(98)00744-4
22. *Francken BJB, Josson K, Lijnen P, Jurzak M, Luyten WHML, Leysen JE* (2000) Human 5-hydroxytryptamine 5A receptors activate coexpressed Gi and Go proteins in Spodoptera frugiperda-9 cells. Mol Pharmacol 57: 1034–1044.
23. *Thomas DR, Larminieb CG, Lyonsc HR, Fosberryc A, Hill MJ, Hayesb PD* (2004) Cloning and pharmacological characterisation of the guinea pig 5-ht5A receptor. Eur J Pharmacol 494 (2–3): 91–99.
https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.04.027
24. *Noda M, Yasuda S, Okada M, Higashida H, Shimada A, Iwata N, Ozaki N, Nihikawa K, Shirasawa S, Uchida M, Aoki S, Wada K* (2003) Recombinant human serotonin 5A receptors stably expressed in C6 glioma cells couple to multiple signal transduction pathways. J Neurochem 84: 222–232.
https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01518.x
25. *Grailhe R, Grabtree GW, Hen R* (2001) Human 5-HT(5) receptors: the 5-HT(5A) receptor is functional but the 5-HT(5B) receptor was lost during mammalian evolution. Eur J Pharmacol 418: 157–167.
https://doi.org/10.1016/S0014-2999(01)00933-5
26. *Pasqualetti M, Ori M, Marazziti D, Castagna M, Nardi I* (1998) Distribution of 5-HT2c and 5-ht5a receptor mRNA in human brain. Ann NY Acad Sci 861: 245.
https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb10202.x
27. *Rees S, Daas I, Foord S, Goodson S, Bull D, Kilpatrick G, Lee M* (1994) Cloning and characterisation of the human 5-HT5A serotonin receptor. FEBS Letters 355: 242–246.
https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)01209-1
28. *Oliver KR, Kinsey AM, Wainwright A, Sirinathsinghji DJ* (2000) Localization of 5-HT(5A) receptor-like immunoreactivity in the rat brain. Brain Res 867: 131–142.
https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02273-3
29. *Kinsey AM, Wainwright A, Heavens R, Sirinathsinghji DJ, Oliver KR* (2001) Distribution of 5-ht(5A), 5-ht(5B), 5-ht(6) and 5-HT(7) receptor mRNAs in the rat brain. Brain Res Mol Brain Res 88: 194–198.
https://doi.org/10.1016/S0169-328X(01)00034-1
30. *Garcia-Alcocer G, Rodriguez A, Moreno-Layseca P, Berumen LC, Escobar J, Miledi R* (2010) Serotonin receptor 5-HT5A in rat hippocampus decrease by leptin treatment. Neurosci Lett 486: 171–173.
https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.09.045
31. *Xu C, Giuliano F, Sun X.Q, Brisorgueil M-J, Leclerc P, Verge D, Conrath M* (2007) Serotonin 5-HT2A and 5-HT5A receptors are expressed by different motoneuron populations in rat Onuf's nucleus. J Comp Neurol 502: 620–634.
https://doi.org/10.1002/cne.21344
32. *Muñoz-Islas E, Vidal-Cantú GC, Bravo-Hernández M, Cervantes-Durán C, Quiñonez-Bastidas GN, Pineda-Farias JB, Barragán-Iglesias P, Granados-Soto V* (2014) Spinal 5-HT5A receptors mediate 5-HT-induced antinociception in several pain models in rats. Pharmacol Biochem Behav 120: 25–32.
https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.02.001

33. *Avila-Rojas SH, Velázquez-Lagunas I, Salinas-Abarca AB, Barragán-Iglesias P, Pineda-Farias JB, Granados-Soton V* (2015) Role of spinal 5-HT5A and 5-HT1A/1B/1D receptors in neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats. Brain Res 1622: 377–385. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.06.043

34. *Vidal-Cantú GC, Jiménez-Hernández M, Rocha-González HI, Villalón CM, Granados-Soto V, Muñoz-Islas E* (2016) Role of 5-HT5A and 5-HT1B/1D receptors in the antinociception produced by ergotamine and valerenic acid in the rat formalin test. Eur J Pharmacol 781: 109–116. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.04.009

35. *Ditjatev AE, Chmykhova NM, Dityateva GV, Babalian AL, Kleinle J, Clamann HP* (2001) Structural and Physiological Properties of Connections Between Individual Reticulospinal Axons and Lumbar Motoneurons of the Frog. J Comp Neurol 430: 433–447. https://doi.org/10.1002/1096-9861(20010219) 430:4<433::AID-CNE1041>3.0.CO;2-Z

36. *Kalinina NI, Zaitsev AV, Vesselkin NP* (2019) Serotonin Modulates Differently the Functional Properties of Damaged and Intact Motoneurons in the Frog Spinal Cord. Dokl Biol Sci 484: 5–9. https://doi.org/10.1134/S0012496619010046

37. *Barber RP, Vaughn JE, Roberts E* (1982) The cytoarchitecture of GABAergic neurons in rat spinal cord. Brain Res 238: 305–328. https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)90107-X

38. *Noda M, Higashida H, Aoki S, Wada K* (2004) Multiple signal transduction pathways mediated by 5-HT receptors. Mol Neurobiol 29: 31. https://doi.org/10.1385/MN:29:1:31

39. *Gingrich JA, Hen R* (2000) The broken mouse: the role of development, plasticity and environment in the interpretation of phenotypic changes in knockout mice. Curr Opin Neurobiol 10: 146–152. https://doi.org/10.1016/S0959-4388(99)00061-6

Involvement of 5-HT_1 and 5-HT_{5A} Receptors in Modulation of Synaptic Transmission and Internal Properties of the Membrane of Spinal Frog Motoneurons (*Rana ridibunda*)

N. I. Kalinina[a, *] and N. P. Veselkin[a, b]

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

[b] *Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia*

**e-mail: nkalinina54@mail.ru*

The endogenous monoamine serotonin (5-HT) modifies motor output in vertebrates by interacting with different types of 5-HT receptors. Previously, 5-HT_{5A} receptors were detected in rat lumbar motoneurons by immunohistochemical methods, where their postsynaptic localization is assumed. However, we found no information about the presence of 5-HT_{5A} receptors in the lumbar spinal cord of lower vertebrates (including amphibians). In the present work, we investigated the possible involvement of 5-HT_{5A} receptors (along with 5-HT_1 receptors) in the modulation of motor output of spinal motoneurons of the frog *Rana ridibunda* using a pharmacological approach, extra- and intracellular recording of potentials. Results of extracellular recordings (with the application of 5-CT, an agonist of 5-HT_1 and 5-HT_{5A} receptors, and SB-699551, a selective 5-HT_{5A} receptor antagonist) indicate spatiotemporal modulation of the activity of ventral horn neurons. Furthermore, changes in the amplitude of the field antidromic potential, the peak amplitude of the evoked medullary potential and the intracellular dorsal medullary postsynaptic potential, as well as changes in the frequency of extracellular spikes and latency of the first intracellular action potential during the 5-CT application, were time-dependent: potentiation was observed in the first minutes, which was later followed by depression. Taken together, the results indicate the involvement of 5-HT_{5A} receptors along with 5-HT_1 receptors in the modulation of motor output of frog spinal motoneurons.

Keywords: frog, spinal cord, motoneuron, 5-HT_{5A} receptor, synaptic transmission

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2022, том 108, № 1, с. 98–108

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ВЛИЯНИЕ АЛЛОСТЕРИЧЕСКОГО МОДУЛЯТОРА M_5 ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ VU 0238429 НА НЕРВНО-МЫШЕЧНУЮ ПЕРЕДАЧУ В ДИАФРАГМАЛЬНОЙ МЫШЦЕ МЫШИ

© 2022 г.
И. В. Ковязина[1, 2, *], А. А. Хамидуллина[2], Н. С. Фёдоров[3], А. И. Маломуж[1, **]

[1]*Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ Казанский научный центр РАН, Казань, Россия*

[2]*Казанский Государственный медицинский университет, Казань, Россия*

[3]*Казанский Федеральный университет, Казань, Россия*

**E-mail: irina.kovyazina@list.ru*

***E-mail: artur57@gmail.com*

Поступила в редакцию 15.10.2021 г.
После доработки 10.11.2021 г.
Принята к публикации 13.11.2021 г.

Исследовали влияние соединения VU 0238429, аллостерического модулятора мускариновых холинорецепторов M_5 подтипа, на амплитудно-временные параметры спонтанных и вызванных потенциалов концевой пластинки, а также на силу мышечных сокращений при низко- и высокочастотном раздражении двигательного нерва. Показано, что холинорецепторы M_5 подтипа могут регулировать квантовый выброс ацетилхолина из двигательных нервных окончаний в диафрагме мыши: увеличивать уровень секреции медиатора при низкочастотной стимуляции нерва и снижать его при стимуляции с частотой 70 Гц. Фармакологическая потенциация M_5 холинорецепторов оказывает угнетающее действие на силу мышечных сокращений, вызванных как прямой, так и непрямой стимуляцией, что необходимо учитывать при разработке лекарственных препаратов на основе модуляторов этих рецепторов.

Ключевые слова: нервно-мышечный контакт, M_5 холинорецептор, ацетилхолин, потенциал концевой пластинки, модуляция синаптической передачи, мышечное сокращение

DOI: 10.31857/S0869813922010083

Мускариновые холинорецепторы M_1–M_5 подтипов широко представлены в центральной и периферической нервной системе, где они контролируют ряд важных физиологических процессов [1]. Несмотря на то, что рецепторы M_5 подтипа составляют всего 2% от общей популяции мускариновых холинорецепторов в головном мозге [2], они экспрессируются в отдельных областях, представляющих терапевтический интерес. Агонисты и антагонисты M_5 холинорецепторов рассматриваются как потенциальные фармакологические агенты для лечения целого ряда расстройств, включая шизофрению, болезнь Альцгеймера, наркозависимость и болезнь Паркинсона [1, 3]. Данные, полученные на мышах, нокаутированных по гену, кодирующему мускариновые рецепторы M_5 подтипа, свидетельствуют о том, что именно эти рецепторы отвечают за вызванное ацетилхолином расширение сосудов головного мозга, и, следовательно, их лиганды могут быть использованы в

качестве терапевтического средства при лечении цереброваскулярных заболеваний или острого ишемического инсульта [2, 4].

Ранее, с помощью методов иммуногистохимии, было показано, что M_5 рецепторы присутствуют в области нервно-мышечного контакта скелетных мышц позвоночных [5, 6], однако их физиологическая роль в периферических синапсах остается до конца не выясненной. По данным Wright и соавт. [5] M_5 рецепторы локализуются на мышечных волокнах и/или шванновских клетках и контролируют рост мышц, а также размер моторных синапсов.

Недостаток информации о физиологической роли M_5 рецепторов во многом обусловлен тем, что до недавнего времени отсутствовали селективные фармакологические агенты, с помощью которых можно было бы исследовать функции этих рецепторов. Сравнительно недавно скрининговые и медицинские исследования позволили идентифицировать первые M_5 селективные аллостерические лиганды, в частности соединение VU 0238429, проявляющее высокоизбирательное потенцирующее действие на этот подтип холинорецепторов [7]. Данное соединение более чем в 30 раз избирательнее по отношению к M_5 рецепторам по сравнению с M_1 и M_3 подтипами и неэффективно в отношении M_2 и M_4 подтипов мускариновых рецепторов [7].

В настоящей работе мы исследовали влияние селективного аллостерического модулятора мускаринового ацетилхолинового рецептора M_5 подтипа – соединения VU 0238429 на амплитудно-временные характеристики одноквантовых (миниатюрных) и многоквантовых потенциалов концевой пластинки (ПКП), а также на силу мышечных сокращений при разных режимах стимуляции двигательного нерва. Показано, что холинорецепторы M_5 подтипа могут регулировать процесс квантового выделения ацетилхолина из моторных нервных окончаний. Кроме того, фармакологическая потенциация этих рецепторов снижает силу мышечных сокращений, что необходимо учитывать при поиске лекарственных препаратов, мишенью которых являются мускариновые холинорецепторы M_5 подтипа.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Препарат и растворы

Исследования были проведены на изолированных нервно-мышечных препаратах диафрагмы лабораторных мышей линии BALB/c массой 22–25 г. Животные содержались при комнатной температуре (20–24°C) в хорошо вентилируемом помещении с 12-часовым циклом свет/темнота и неограниченном доступе к пище и воде.

Экспериментальные процедуры выполняли в соответствии с инструкциями по использованию лабораторных животных Казанского медицинского университета в соответствии с руководством NIH по уходу и использованию лабораторных животных. Протокол эксперимента соответствовал требованиям Директивы Совета европейских сообществ 86/609/EEC.

Животных подвергали глубокому наркозу, а затем быстро декапитировали и выделяли диафрагмальную мышцу в реберном кольце вместе с диафрагмальными нервами, длина культи которых составляла не менее 0.5 см. Далее препарат разделяли на две полудиафрагмы с подходящими к ним нервами.

Изолированную мышцу с фрагментом нерва помещали в экспериментальную камеру, через которую протекал предварительно аэрированный раствор Рингера–Кребса следующего состава (в мМ): 137 NaCl, 5 KCl, 1 $MgCl_2$, 2 $CaCl_2$, 1 Na_2HPO_4, 15 $NaHCO_3$, 11 глюкоза; pH раствора составлял 7.3–7.4, температуру в ванночке поддерживали на уровне 22.0 ± 0.1°C.

Соединение VU 0238429 (Tocris, Великобритания) растворяли в растворе DMSO, а затем в буферном растворе до концентрации 1 мкМ, и подавали в экспериментальную камеру путем перфузии (финальная концентрация DMSO 0.01%).

Регистрация потенциалов концевой пластинки

Потенциалы концевой пластинки (ПКП) регистрировали внутриклеточно с использованием стандартной микроэлектродной техники. При регистрации ПКП мышечные сокращения блокировали μ-конотоксином GIIIB (3 мкМ, Peptide Institute Inc., Япония).

Регистрацию синаптических сигналов осуществляли с помощью комплекса, включающего микроэлектродный усилитель TEV-200A (Dagan Corporation, США) с полосой пропускания от 0.03 до 10 кГц, изолированный импульсный стимулятор 2100 (AM Systems, США), высокоскоростной аналогово-цифровой цифровой преобразователь (Digidata 1322A, Axon Instrument Inc., США) с частотой дискретизации 10 мкс и программное обеспечение AxoClamp (Axon Instrument Inc.). Двигательный нерв стимулировали прямоугольными импульсами супрамаксимальной величины и длительностью 100 мкс с частотой 0.5–70 Гц.

ПКП регистрировали в контроле и через 20 мин после добавления соединения VU 0238429 в омывающий раствор. Зарегистрированные сигналы анализировали с использованием программного обеспечения Clampfit (Axon Instrument Inc.) в автономном режиме. Оценивали амплитуду, время нарастания и постоянную времени спада (10–90% амплитуды) ПКП. Квантовый состав ПКП оценивали двумя способами: 1) как соотношение средних значений амплитуд вызванных и спонтанных ("одноквантовых") ответов; 2) как соотношение площадей вызванных и "одноквантовых" ответов. При анализе параметров ПКП, зарегистрированных в режиме высокочастотных пачек (10 с с частотами 10, 50 и 70 Гц), параметры сигналов выражали в процентах по отношению к первому сигналу, а затем усредняли (n = 20–30 пачек).

Тензометрия

Фрагмент полудиафрагмы (шириной около 1 см) помещали в экспериментальную ванночку тензометрической установки SIH Muscle Tester (WPI, США), оснащенной усилителем SI-BAM21-LC (WPI) и контроллером температуры SI-TCM2 (WPI). "Реберный" край фрагмента полудиафрагмы фиксировали крючком, который был соединен с датчиком силы (SI-KG2B, WPI), "сухожильный" край фиксировали крючком, закрепленным на плече микроманипулятора со встроенным микрометром. При помощи микрометра препарат растягивался на 10–15% от длины и в течение 15–20 мин перед началом эксперимента промывался раствором Рингера–Кребса в условиях редкой стимуляции для достижения устойчивого состояния.

Мышцу стимулировали прямоугольными стимулами супрамаксимальной амплитуды длительностью 100 мкс. Протокол стимуляции во всех экспериментах (сокращения при прямом и непрямом раздражении) был идентичный: 20 с с частотой 0.5 Гц, 10 с с частотами 10, 50 и 70 Гц. Время периода между стимуляциями составляло 20 с.

Ответы при непрямом раздражении вызывались стимуляцией диафрагмального нерва через "всасывающий" электрод. При прямом раздражении сокращения диафрагмы вызывали стимуляцией через два серебряных проволочных электрода, находящихся в экспериментальной ванночке в непосредственной близости от препарата. При этом в растворе присутствовал блокатор никотиновых холинорецепторов d-тубокурарин (2 мкМ, Sigma, США). Сигналы от датчика силы получали и анализировали в цифровом виде с использованием (ЦАП-АЦП) системы LabTrax 8/16 (WPI) и программного обеспечения MDAC Software (WPI). Сила сокращений (макси-

мальная амплитуда одиночных и тетанических изометрических сокращений) измерялась в граммах. Регистрация сокращений осуществлялась в контроле и через 20 мин после добавления соединения VU 0238429 в омывающий раствор.

Статистика

Экспериментальные результаты представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего (*SEM*). Для статистической обработки результатов экспериментов использовали двухсторонний критерий Стьюдента (для параметрических данных) либо непараметрический критерий Манна–Уитни.

Для описания относительного изменения квантового состава ПКП в ходе стимуляции нерва с частотой 10 Гц использовали модель, описанную в работе [8]. Для частот стимуляции выше 10 Гц эту модель модифицировали путем добавления "медленной" экспоненциальной компоненты:

$$m(t) = A\exp(-t/B) + C/(1 + \exp(-(t - D)/E))\exp(-t/F).$$

В этой формуле $m(t)$ соответствует квантовому составу ПКП в момент времени t, A – квантовый состав в начале стимуляции (отн. ед.), B – постоянная времени истощения готового к освобождению пула везикул (с), C – средняя амплитуда плато (отн. ед.), D – полупериод восполнения везикулярного пула (с), E – крутизна динамики восстановления везикулярного пула (с), а F – постоянная времени "медленной" фазы снижения квантового состава (при 50 и 70 Гц, с).

Для сравнения относительного изменения амплитуд ПКП при высокочастотной стимуляции нерва в контроле и в присутствии VU 0238429 использовался F-тест. Статистический анализ осуществлялся с помощью программного обеспечения OriginLab 2021b. Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние аллостерического модулятора M_5 холинорецепторов VU 0238429 на амплитудно-временные параметры ПКП при низко- и высокочастотной стимуляции двигательного нерва

Потенциация M_5 холинорецепторов не оказывала влияния на амплитуду миниатюрных ПКП (МПКП) и их частоту (рис. 1*a*), а также временные параметры (время роста и постоянная времени спада, на рисунке не представлены).

В присутствии соединения VU 0238429 (1 мкМ) при редкой частоте стимуляции нерва (0.5 Гц) квантовый состав ПКП был в среднем на 17% выше, чем в контроле (34.2 ± 2.3 по сравнению с 28.1 ± 1.2, $n_1 = 22$, $n_2 = 29$, тест Стьюдента для независимых выборок, $p < 0.05$, рис. 1*b*). При оценке квантового состава соотношением площадей многоквантовых и одноквантовых (миниатюрных) ПКП значения этой величины составили 34.2 ± 1.9 в контроле и 41.6 ± 2.9 в присутствии соединения VU 0238429, то есть относительное изменение квантового состава составило 22%. Длительность переднего фронта многоквантовых ПКП (10–90%) также достоверно увеличивалась: с 0.75 ± 0.18 мс в контроле до 0.87 ± 0.16 мс ($n_1 = 22$, $n_2 = 29$, тест Стьюдента для независимых выборок, $p < 0.05$, рис. 1*b*). При этом длительности заднего фронта ПКП (τ времени спада ПКП) в контроле и в присутствии соединения VU 0238429 достоверно не различались (2.81 ± 0.13 и 3.09 ± 0.08 мс, соответственно, $n_1 = 22$, $n_2 = 29$, тест Стьюдента для независимых выборок, $p > 0.05$, рис. 1*b*).

Значения мембранного потенциала мышечного волокна, при которых регистрировали ПКП и МПКП в контроле и в присутствии соединения VU 0238429 также достоверно не различались (–60.4 ± 2.1 мВ для VU 0238429 по сравнению с –60.0 ± 1.2 мВ в контроле, $n_1 = 22$, $n_2 = 29$, тест Стьюдента для независимых выборок, $p > 0.05$).

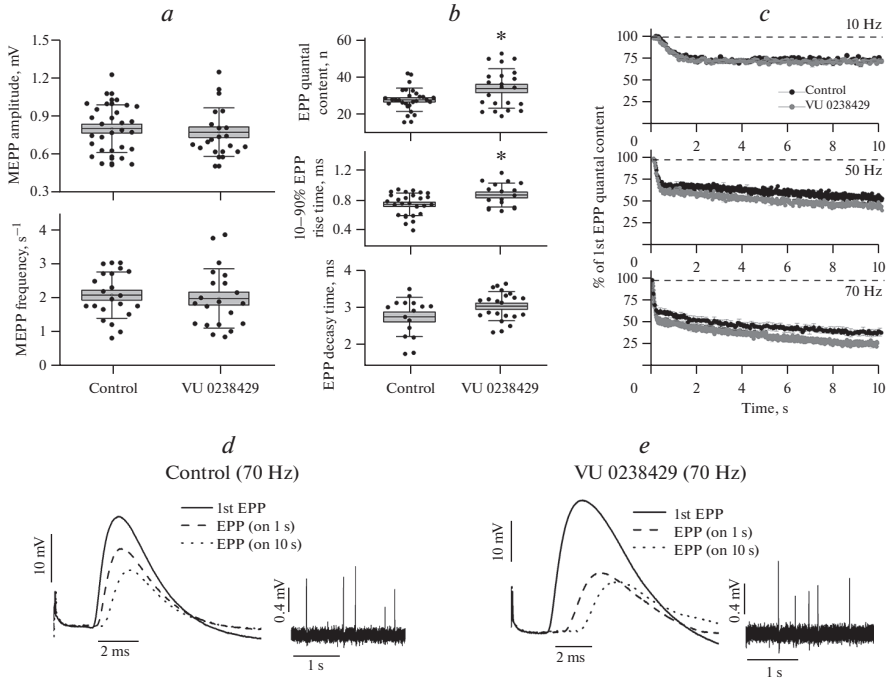


Рис. 1. Влияние модулятора мускариновых холинорецепторов M_5 подтипа VU 0238429 (1 мкМ) на амплитудно-временные параметры миниатюрных (МПКП; MEPP) и вызванных (ПКП; EPP) потенциалов концевой пластинки.

Панель (*a*) – амплитуда (amplitude) и частота (frequency) миниатюрных потенциалов концевой пластинки в контроле и после аппликации VU 0238429.

Панель (*b*) – квантовый состав (EPP quantal content), время нарастания (10–90% EPP rise time) и постоянная времени спада (decay time) вызванных потенциалов концевой пластинки при низкочастотной стимуляции нерва (0.5 Гц) в контроле и после аппликации VU 0238429. На панелях *a* и *b* данные представлены по отдельным клеткам в контроле и после аппликации VU 0238429: кружки – значения по отдельным опытам, горизонтальная линия – среднее значение ± стандартная ошибка (прямоугольник) и стандартное отклонение (вертикальный отрезок) для всей серии экспериментов ($n_1 = 22$, $n_2 = 29$).*$p < 0.05$ по сравнению с контролем (тест Стьюдента для независимых выборок).

Панель (*c*) – относительные изменения амплитуды ПКП при стимуляции нерва с частотой 10, 50 и 70 Гц в течение 10 с: черные кружки – контроль, серые кружки – VU 0238429. За 100% принята амплитуда 1-го ПКП в пачке. $n = 15$.

Панели (*d*), (*e*) – репрезентативные записи вызванных потенциалов концевой пластинки, зарегистрированных в ходе стимуляции с частотой 70 Гц в типичном эксперименте в контроле (control) и в присутствии VU 0238429: сплошная линия – 1-й ПКП в пачке импульсов, пунктирная линия – ПКП после 1 с стимуляции, линия точками – ПКП после 10 с стимуляции с частотой 70 Гц. На врезках представлены МПКП из тех же экспериментов, зарегистрированные до начала стимуляции.

При высокочастотном раздражении нерва (10–70 Гц) развивалась синаптическая депрессия, то есть последовательное снижение квантового состава ПКП в ходе пачки импульсов, наиболее выраженное при стимуляции нерва с частотой более 10 Гц (рис. 1*c*–*e*). Так, при стимуляции нерва с частотой 70 Гц квантовый состав ПКП в первые 200 мс быстро снижался (на 40% в контроле и на 50% в присутствии VU 0238429) и продолжал снижаться в последующие 10 с соответственно до 38.2 ± 3.6% и 27.8 ± 4.5% ($n = 15$) от исходных значений в контроле и в присутствии

Таблица 1. Параметры модели, описывающей изменение квантового состава ПКП при высокочастотной стимуляции нерва

	A (отн. ед)	*B* (с)	*C* (отн. ед)	*D* (с)	*E* (с)	*F* (с)
10 Гц						
контроль	0.88 ± 0.04	1.67 ± 0.27	0.75 ± 0.01	1.14 ± 0.44	1.34 ± 0.09	–
VU 0238429	0.87 ± 0.03	1.48 ± 0.16	0.72 ± 0.01	0.96 ± 0.27	1.16 ± 0.07	–
50 Гц						
контроль	0.89 ± 0.08	0.28 ± 0.05	0.73 ± 0.01	0.15 ± 0.15	0.29 ± 0.02	39.13 ± 1.03
VU 0238429	1.05 ± 0.01	0.43 ± 0.02	0.64 ±0.01	0.49 ± 0.03	0.24 ± 0.01	31.69 ± 0.80
70 Гц						
контроль	1.02 ± 0.03	0.38 ± 0.02	0.57 ± 0.01	0.42 ± 0.02	0.17 ± 0.01	25.56 ± 0.73
VU 0238429	1.05 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.53 ± 0.02	0.31 ± 0.01	0.12 ± 0.01	13.58 ± 0.13

VU 0238429. Аппроксимация относительного изменения квантового состава ПКП при высокочастотной стимуляции нерва моделью, состоящей из экспоненциального спада и возрастающей логистической функции (см. Методы исследования), показала достоверные различия в динамике этого параметра в контроле и при потенциации M_5 рецепторов (F-тест, $p < 0.05$, $n = 15$, табл. 1).

Влияние аллостерического модулятора M_5 холинорецепторов VU 0238429 на силу мышечных сокращений при прямой и непрямой стимуляции

Сила сокращений фрагмента полудиафрагмы мыши при стимуляции двигательного нерва составляла по максимальной амплитуде: 0.72 ± 0.09 г при 0.5 Гц; 0.87 ± 0.11 г при 10 Гц; 4.81 ± 0.52 г при 50 Гц и 5.15 ± 0.63 г при 70 Гц ($n = 7$). Добавление в перфузионный раствор соединения VU 0238429 в концентрации 1 мкМ приводило к снижению силы сокращений на всех исследуемых частотах стимуляции (рис. 2*a*). Так, регистрируемый параметр снижался на 24.5 ± 4.7% при 0.5 Гц; на 23.3 ± 3.6% при 10 Гц; 23.6 ± 4.6% при 50 Гц и 24.0 ± 5.7% при 70 Гц ($p < 0.05$; $n = 7$ для всех случаев).

Для того, чтобы установить, обусловлен ли выявленный нами угнетающий эффект VU 0238429 изменениями в холинергической трансмиссии в мионевральном синапсе, были проведены эксперименты с прямой стимуляцией мышцы в условиях блокады никотиновых холинорецепторов. Контрольные значения силы сокращений в данной серии экспериментов составляли по максимальной амплитуде 0.58 ± 0.07 г при 0.5 Гц; 0.58 ± 0.07 г при 10 Гц; 4.41 ± 0.79 г при 50 Гц и 4.46 ± 0.76 г при 70 Гц ($n = 7$).

В присутствие VU 0238429 сила сокращений при прямой стимуляции также снижалась (рис. 2*b*). Это угнетающее действие аллостерического модулятора так же как и в случае непрямой стимуляции проявлялось на всех исследуемых частотах и составляло соответственно: 17.2 ± 3.1% при 0.5 Гц; 15.3 ± 3.7% при 10 Гц; 16.6 ± 3.1% при 50 Гц и 16.5 ± 3.4% при 70 Гц ($p < 0.05$; $n = 7$ для всех случаев). Выраженность угнетающего эффекта соединения VU 0238429 при прямой и непрямой стимуляции нервно-мышечного препарата достоверно не отличалась для всех частот (критерий Манна–Уитни, $p > 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Пять подтипов мускариновых рецепторов млекопитающих, M_1–M_5, составляют две функционально разные группы: рецепторы с нечетными номерами (M_1, M_3, M_5) активируют предпочтительно G-белки G_q/G_{11}-типа; четные подтипы (M_2, M_4) активируют G_i/G_o белки. Большинство клеток экспрессируют два или более под-

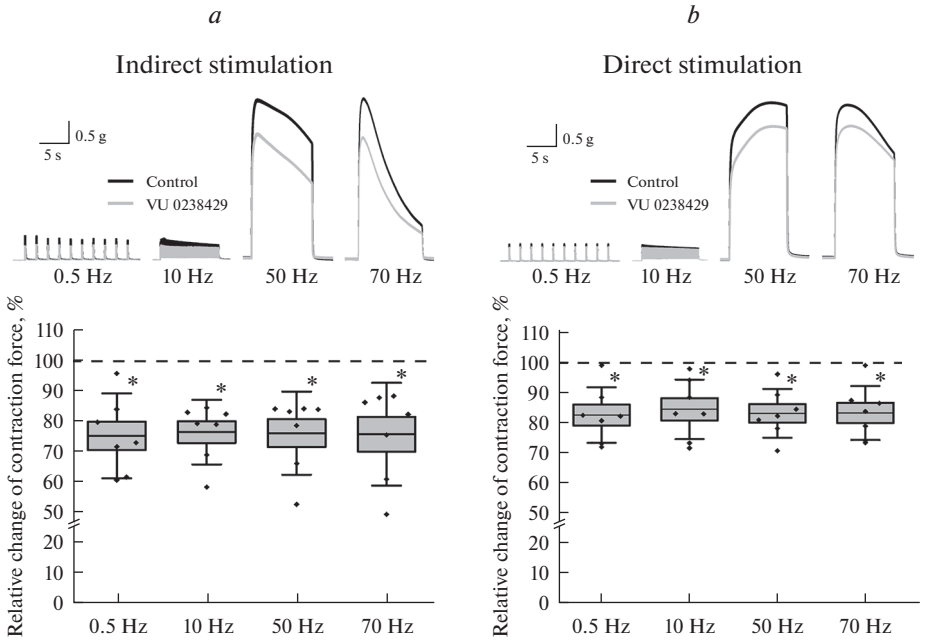


Рис. 2. Угнетающее влияние модулятора мускариновых холинорецепторов M_5 подтипа VU 0238429 (1 мкМ) на силу сокращения полудиафрагмы мыши при непрямой (панель (*a*), Indirect stimulation) и прямой (панель (*b*), Direct stimulation) стимуляции с частотами 0.5, 10, 50 и 70 Гц. В верхних частях панелей – нативные записи сокращений в отдельно взятых экспериментах в контроле (черный) и через 20 мин после аппликации VU 0238429 (серый).
В нижних частях панелей представлены относительные изменения силы сокращений после аппликации VU 0238429 по отношению к контролю (%): кружки – значения по отдельным опытам, горизонтальная линия – среднее значение ± стандартная ошибка (прямоугольник) и стандартное отклонение (вертикальный отрезок) для всей серии экспериментов (n = 7). * $p < 0.05$ по сравнению с контролем (парный тест Стьюдента для абсолютных значений в г в контроле и в присутствии VU 0238429).

типа мускариновых рецепторов, которые вызывают разнообразные физиологические ответы в зависимости от локализации и идентичности подтипов [1, 9]. Так, в нервно-мышечных контактах позвоночных были обнаружены мускариновые рецепторы всех известных на данный момент пяти подтипов [5, 6]. И если для холинорецепторов M_1, M_2 и M_3 подтипов было показано их участие в регуляции квантовой и неквантовой секреции [5, 6, 10–13], то роль рецепторов M_5 подтипа в нервно-мышечных контактах до сих пор не ясна. Отчасти этот недостаток информации был обусловлен отсутствием селективных лигандов для данного подтипа холинорецепторов.

Сравнительно недавно были синтезированы селективные в отношении M_5 рецепторов аллостерические модуляторы, позволяющие лучше изучить функции этих рецепторов в центральной и периферической нервной системах и, возможно, разработать лекарственные препараты на основе агонистов и антагонистов M_5 рецепторов. Последнее особенно важно, если учесть, что недостаточная или, наоборот, избыточная активация M_5 рецепторов может быть основным звеном патогенеза целого ряда заболеваний – болезни Альцгеймера, Паркинсона, наркозависимости, депрессии и шизофрении [1, 3]. Поскольку помимо головного мозга M_5 рецепторы

располагаются и в скелетной мускулатуре [5, 14], необходимо учитывать возможные последствия приема таких препаратов на опорно-двигательную систему при проведении терапии нейродегенеративных заболеваний.

В данной работе изучили эффекты положительного аллостерического модулятора M_5 холинорецепторов – соединения VU 0238429 – на амплитудно-временные параметры ПКП и силу сокращений диафрагмальной мышцы мыши.

Результаты исследования свидетельствуют о том, что повышенная активация холинорецепторов M_5 подтипа приводит к повышению квантового выброса ацетилхолина из двигательных нервных окончаний и увеличению длительности переднего фронта (10–90% время роста) ПКП. Изменение времени роста ПКП может быть следствием десинхронизации освобождения синаптических везикул в отдельных активных зонах [15]. Стимуляция с частотой 70 Гц приводила к несколько более выраженной депрессии амплитуд последовательных ПКП в пачке, что может быть связано с повышенным расходом медиатора и уменьшением количества везикул, готовых к освобождению. Ранее было показано, что M_5 рецепторы в моторных синапсах мыши локализуются на мышечных волокнах либо в шванновских клетках и регулируют размер волокон и концевых пластинок [5]. О наличии мускариновых рецепторов, в частности M_1 и M_3 подтипов, на сарколемме сообщалось и ранее [16, 17]. Наблюдаемые нами эффекты соединения VU 0238429 на процесс нейросекреции предполагают либо наличие некоторого количества M_5 рецепторов на нервном окончании, либо ретроградный эффект от их активации на мышечной либо шванновской клетках.

Наши результаты тензометрии косвенно подтверждают наличие холинорецепторов M_5 подтипа на сарколемме. Так, сила сокращений снижалась в присутствии аллостерического модулятора VU 0238429 в одинаковой степени при прямой и непрямой стимуляции диафрагмы. Судя по всему, основной причиной снижения амплитуды сокращений при непрямой стимуляции является тот же фактор, что и при прямой стимуляции, то есть происходят изменения в сократимости мышечных волокон, а не в работе синаптического аппарата. Если более выраженная депрессия амплитуд ПКП при высокочастотной стимуляции нерва и отражается на снижении силы сокращений, то этот вклад не столь существенен.

Эффект активации M_5 рецепторов на сократительную способность мышц, по всей видимости, связан с влиянием на электромеханическое сопряжение, а не на работу сократительного аппарата мышечных волокон. На данный момент внутриклеточные механизмы, связанные с активацией M_5 холинорецепторов, наиболее полно изучены в нейронах. Показано, что активация M_5 рецепторов запускает целый ряд клеточных реакций, таких как инактивирование аденилатциклазы, деградация фосфоинозитидов, изменение уровня циклического АМФ и модуляция работы калиевых каналов [18–20]. В нейронах гиппокампа была продемонстрирована способность мускариновых рецепторов всех подтипов модулировать работу натриевых каналов и снижать амплитуду натриевых токов. В частности, для M_5 рецепторов эта регуляция осуществляется через активацию протеинкиназы C [21]. Кроме того, было показано, что в культуре клеток фибробластов мыши (NIH 3T3) активация всех экспрессированных там мускариновых рецепторов может угнетать функционирование кальциевых каналов L типа также путем активации протеинкиназы C [22]. Вопрос колокализации M_5 рецепторов с натриевыми и/или кальциевыми каналами в скелетных мышцах и возможность их функциональной регуляции до сих пор остается открытым.

Использованное в данном исследовании соединение VU 0238429 является положительным аллостерическим модулятором ацетилхолиновых рецепторов, то есть оно избирательно увеличивает вероятность связывания эндогенного ацетилхолина

с рецепторами M_5 подтипа. Обнаруженные эффекты фармакологического соединения свидетельствуют о том, что в изолированном диафрагмальном препарате мыши даже при низкочастотной активности присутствует ацетилхолин в концентрации, достаточной для активации рецепторов, в том числе, на скелетной мышце.

Доказательства выделения ацетилхолина в изолированном нервно-мышечном препарате в отсутствие стимуляции нерва были получены еще в 60-е годы прошлого столетия, причем, как оказалось, определенная часть медиатора выделяется непосредственно из скелетной мышцы [23, 24]. Впоследствии было установлено, что выделяемый из мышцы ацетилхолин синтезируется холин- и карнитин-ацетилтрансферазами [25, 26] и концентрации этого медиатора может быть достаточно для активации мускариновых холинорецепторов. В отсутствие стимуляции нерва была продемонстрирована эндогенная активация мускариновых холинорецепторов M_1 подтипа, которая сказывается на уровне неквантового выделения ацетилхолина из нервного окончания [10]. В этой же работе было показано, что для реализации физиологического эффекта активации этих мускариновых рецепторов (которые имеют схожие с M_5 механизмы трансдукции сигнала) достаточно концентрации миметика всего в несколько нМ. Согласно данным различных авторов, в области синаптического контакта ацетилхолин детектируется в концентрации в несколько десятков нМ, создаваемой в результате неквантового выделения медиатора. С помощью этого процесса выделяется основная масса ацетилхолина именно в отсутствие нервной импульсации (см. обзоры [27, 28]). Следовательно, есть все основания полагать, что даже в покое может иметь место активация мускариновых холинорецепторов как в синапсе, так и за его пределами ацетилхолином, который выделяется как из нервного окончания, так и непосредственно из мышцы, и это способно отражаться на сократимости скелетной мускулатуры.

Таким образом, холинорецепторы M_5 подтипа могут модулировать процесс нейросекреции ацетилхолина в моторных синапсах скелетных мышц. Кроме того, их активация приводит к снижению сократительной активности мышечных волокон, что необходимо учитывать при разработке потенциальных лекарственных препаратов, мишенью которых являются M_5 рецепторы.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Электрофизиологические исследования выполнены при финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 20-04-00571), эксперименты по регистрации мышечных сокращений выполнены в рамках государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование экспериментов (И.В.К. и М.А.И.), сбор данных (А.А.Х. и Н.С.Ф.), обработка данных (И.В.К., А.А.Х., Н.С.Ф. и М.А.И.), написание и редактирование манускрипта (И.В.К. и М.А.И.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wess J, Eglen RM, Gautam D* (2007) Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. Nat Rev Drug Discov 6: 721–733. https://doi.org/10.1038/nrd2379

2. *Yamada M, Basile AS, Fedorova I, Zhang W, Duttaroy A, Cui Y, Lamping KG, Faraci FM, Deng CX, Wess J* (2003) Novel insights into M5 muscarinic acetylcholine receptor function by the use of gene targeting technology. Life Sci 74: 345–353.
https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.09.022
3. *Langmead CJ, Watson J, Reavill C* (2008) Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. Pharmacol Ther 117: 232–243.
https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.09.009
4. *Araya R, Noguchi T, Yuhki M, Kitamura N, Higuchi M, Saido TC, Seki K, Itohara S, Kawano M, Tanemura K, Takashima A, Yamada K, Kondoh Y, Kanno I, Wess J, Yamada M* (2006) Loss of M5 muscarinic acetylcholine receptors leads to cerebrovascular and neuronal abnormalities and cognitive deficits in mice. Neurobiol Dis 24: 334–344.
https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.07.010
5. *Wright MC, Potluri S, Wang X, Dentcheva E, Gautam D, Tessler A, Wess J, Rich MM, Son YJ* (2009) Distinct muscarinic acetylcholine receptor subtypes contribute to stability and growth, but not compensatory plasticity, of neuromuscular synapses. J Neurosci 29:14942–14955.
https://doi.org/10.1523/jneurosci.2276-09.2009
6. *Tsentsevitsky AN, Kovyazina IV, Nurullin LF, Nikolsky EE* (2017) Muscarinic cholinoreceptors (M1-, M2-, M3- and M4-type) modulate the acetylcholine secretion in the frog neuromuscular junction. Neurosci Lett 649: 62–69.
https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.04.015
7. *Bridges TM, Marlo JE, Niswender CM, Jones CK, Jadhav SB, Gentry PR, Plumley HC, Weaver CD, Conn PJ, Lindsley CW* (2009) Discovery of the first highly M5-preferring muscarinic acetylcholine receptor ligand, an M5 positive allosteric modulator derived from a series of 5-trifluoromethoxy N-benzyl isatins. J Med Chem 52: 3445–3448.
https://doi.org/10.1021/jm900286j
8. *Ruiz R, Cano R, Casañas JJ, Gaffield MA, Betz WJ, Tabares L* (2011) Active zones and the readily releasable pool of synaptic vesicles at the neuromuscular junction of the mouse. J Neurosci 31: 2000–2008.
https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4663-10.2011
9. *Nathanson NM* (2008) Synthesis, trafficking, and localization of muscarinic acetylcholine receptors. Pharmacol Ther 119: 33–43.
https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.04.006
10. *Malomouzh AI, Mukhtarov MR, Nikolsky EE, Vyskočil F* (2007) Muscarinic M1 acetylcholine receptors regulate the non-quantal release of acetylcholine in the rat neuromuscular junction via NO-dependent mechanism. J Neurochem 102: 2110–2117.
https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04696.x
11. *Tsentsevitsky AN, Zakyrjanova GF, Petrov AM, Kovyazina IV* (2020) Breakdown of phospholipids and the elevated nitric oxide are involved in M3 muscarinic regulation of acetylcholine secretion in the frog motor synapse. Biochem Biophys Res Commun 524: 589–594.
https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.01.112
12. *Garcia N, Santafé MM, Salon I, Lanuza MA, Tomàs J* (2005) Expression of muscarinic acetylcholine receptors (M1-, M2-, M3- and M4-type) in the neuromuscular junction of the newborn and adult rat. Histol Histopathol 20: 733–743.
https://doi.org/10.14670/HH-20.733
13. *Oliveira L, Timóteo MA, Correia-de-Sá P* (2009) Negative crosstalk between M1 and M2 muscarinic autoreceptors involves endogenous adenosine activating A1 receptors at the rat motor endplate. Neurosci Lett 459: 127–131.
https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.05.001
14. *Levey AI* (1993) Immunological localization of m1-m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. Life Sci 52: 441–448.
https://doi.org/10.1016/0024-3205(93)90300-r
15. *Bukharaeva EA, Kim KK, Nikol'skii EE, Vyskochil F* (2000) Synchronization of evoked secretion of quanta of mediator as a mechanism facilitating the action of sympathomimetics. Neurosci Behav Physiol 30: 139–146.
https://doi.org/10.1007/BF02463151
16. *Malomouzh AI, Arkhipova SS, Nikolsky EE, Vyskočil F* (2011) Immunocytochemical demonstration of M(1) muscarinic acetylcholine receptors at the presynaptic and postsynaptic membranes of rat diaphragm endplates. Physiol Res 60: 185–188.
https://doi.org/10.33549/physiolres.932131
17. *Newman Z, Malik P, Wu TY, Ochoa C, Watsa N, Lindgren C* (2007) Endocannabinoids mediate muscarine-induced synaptic depression at the vertebrate neuromuscular junction. Eur J Neurosci 25: 1619–1630.
https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05422.x
18. *Felder CC, Ma AL, Briley EM, Axelrod J* (1993) Muscarinic acetylcholine receptor subtypes associated with release of Alzheimer amyloid precursor derivatives activate multiple signal transduction pathways. Ann NY Acad Sci 695: 15–18.
https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1993.tb23020.x

19. *Guo J, Schofield GG* (2003) Activation of muscarinic m5 receptors inhibits recombinant KCNQ2/KCNQ3 K+ channels expressed in HEK293T cells. Eur J Pharmacol 462: 25–32. https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)01323-2
20. *Cumbay MG, Watts VJ* (2005) Galphaq potentiation of adenylate cyclase type 9 activity through a Ca^{2+}/calmodulin-dependent pathway. Biochem Pharmacol 69: 1247–1256. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.02.001
21. *Cantrell AR, Ma JY, Scheuer T, Catterall WA* (1996) Muscarinic modulation of sodium current by activation of protein kinase C in rat hippocampal neurons. Neuron 16: 1019–1026. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80125-7
22. *Pemberton KE, Jones SV* (1997) Inhibition of the L-type calcium channel by the five muscarinic receptors (m1-m5) expressed in NIH 3T3 cells. Pflugers Arch 433: 505–514. https://doi.org/10.1007/s004240050306
23. *Mitchell JF, Silver A* (1963) The spontaneous release of acetylcholine from the denervated hemidiaphragm of the rat. J Physiol 165: 117–129. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1963.sp007046
24. *Krnjevic K, Straughan DW* (1964) The release of acetylcholine from the denervated rat diaphragm. J Physiol 170: 371–378. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1964.sp007337
25. *Molenaar PC, Polak RL* (1980) Acetylcholine synthesizing enzymes in frog skeletal muscle. J Neurochem 35: 1021–1025. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1980.tb07855.x
26. *Tucek S* (1982) The synthesis of acetylcholine in skeletal muscles of the rat. J Physiol 322: 53–69. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1982.sp014022
27. *Krivoi II* (2002) Mechanisms of the non-neurotransmitter actions of acetylcholine in the neuromuscular apparatus. Neurosci Behav Physiol 32: 149–156. https://doi.org/10.1023/a:1013975324963
28. *Vyskocil F, Malomouzh AI, Nikolsky EE* (2009) Non-quantal acetylcholine release at the neuromuscular junction. Physiol Res 58: 763–784. https://doi.org/10.33549/physiolres.931865

Effects of Compound VU 0238429, an Allosteric Modulator of M_5 Cholinoreceptors, on the Neuromuscular Transmission in the Mouse Diaphragm

I. V. Kovyazina[a, b, *], A. A. Khamidullina[b], N. S. Fedorov[c], and A. I. Malomouzh[a, **]

[a] *Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia*

[b] *Kazan State Medical University, Department of Medical and Biological Physics, Kazan, Russia*

[c] *Kazan Federal University, Kazan, Russia*

**E-mail: irina.kovyazina@list.ru*

***E-mail: artur57@gmail.com*

The effects of compound VU 0238429, an allosteric modulator of muscarinic cholinergic receptors of M_5 subtype, on the amplitude and temporal parameters of spontaneous and evoked endplate potentials as well as on the force of muscle contractions at different patterns of motor nerve stimulation were studied. It was shown that M_5 cholinoreceptors regulate the quantal release of acetylcholine from motor nerve endings in the mouse diaphragm. Specifically, M_5 activation increases the level of transmitter release during low-frequency nerve stimulation (0.5 Hz) and enhances the synaptic depression at 70 Hz. Also, the pharmacological potentiation of M_5 cholinoreceptors exerts the depressing effect on the force of skeletal muscle contractions at both direct and indirect stimulation with frequencies in the range from 0.5 to 70 Hz, that must be taken into account when developing new medicals aimed to affect M_5 cholinoreceptors.

Keywords: neuromuscular contact, M_5 cholinergic receptor, acetylcholine, endplate potential, modulation of synaptic transmission, muscle contraction

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2022, том 108, № 1, с. 109–120

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УЧАСТИЕ ГЛУТАМИНСИНТЕТАЗЫ В РАЗВИТИИ ГИПЕРБАРИЧЕСКИХ КИСЛОРОДНЫХ СУДОРОГ

© 2022 г.
О. С. Алексеева[1, 2, *], С. Ю. Жиляев[1], Т. Ф. Платонова[1], Д. Л. Цыба[2], О. В. Кирик[2], Д. Э. Коржевский[2], И. Т. Демченко[1]

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

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

**E-mail: osa72@inbox.ru*

Поступила в редакцию 19.10.2021 г.
После доработки 16.11.2021 г.
Принята к публикации 17.11.2021 г.

Гипербарический кислород ($ГБО_2$) оказывает токсическое действие на ЦНС, механизмы которого изучены недостаточно. Целью настоящей работы явилась проверка гипотезы о том, что $ГБО_2$ ингибирует активность глутаминсинтетазы (GS) в головном мозге и повышает уровень глутаматергической нейропередачи, что приводит к развитию эпилептиформной активности на ЭЭГ и тонико-клонических моторных судорог. В опытах на бодрствующих крысах, находящихся в кислородной барокамере под давлением 5 АТА, определяли латентное время появления судорог у животных с интактной и ингибированной GS. Ферментативную активность GS необратимо подавляли с помощью селективного ингибитора L-Methionine sulfoximine (MSO). Установлено, что развитие судорог в гипербарической гипероксии коррелировало с понижением содержания GS в мозге. MSO ускорял развитие кислородных судорог. Полученные данные свидетельствуют о том, что проявление судорожного синдрома в экстремальной гипероксии зависит от ферментативной активности GS, ключевого фермента, регулирующего глутаматергическую нейропередачу.

Ключевые слова: гипербарический кислород, судороги, глутаматергическая система, глутаминсинтетаза, метионинсульфоксимин

DOI: 10.31857/S0869813922010022

Использование кислорода под повышенным давлением в клинике и при подводных погружениях сопряжено с риском его токсического действия на ЦНС, проявляющегося в виде эпилептиформной активности на электроэнцефалограмме (ЭЭГ) и мышечных судорог по типу эпилептического припадка. По современным представлениям, ключевая роль в инициировании кислородных судорог принадлежит интенсивно образующимся при экстремальной гипероксии редокс-молекулам – реактивным формам кислорода (ROS) и азота (RNS), способными через окислительно-восстановительные реакции изменять молекулярную структуру и функции клеток и нарушать межклеточное синаптическое взаимодействие. Одной из причин развития кислородных судорог может быть нарушение баланса между глутаматергической и ГАМК-ергической медиаторными системами [1, 2]. Поскольку развитию судорог в гипербарическом кислороде ($ГБО_2$) сопутствует выраженная активность ЦНС в виде эпилептиформных паттернов на ЭЭГ и высокой биоэлектрической ак-

тивности симпатических нервов, логично допустить, что сдвиг баланса медиаторных процессов происходит в сторону возбуждения за счет повышения глутаматергической нейромедиации и/или понижения активности ГАМК-ергической системы. Угнетение функции ГАМК-ергической системы подтверждено многими исследованиями, показавшими уменьшение количества тормозного медиатора в мозге животных во время $ГБО_2$-экспозиции [3–5]. Причиной снижения мозговой ГАМК в экстремальной гипероксии является инактивация фермента глутаматдекарбоксилазы (ГДК), катализирующего синтез тормозного медиатора [6]. Следовательно, низкий уровень продукции ГАМК в $ГБО_2$ ослабляет тормозную функцию и сдвигает нейромедиаторный баланс в сторону возбуждения. Вместе с тем, сдвигу медиаторного баланса в гипероксии может способствовать также активация глутаматергической системы, происходящая за счет нарушения регуляции глутаматергической передачи, связанной с выделением и удалением нейропередатчика из синаптической щели.

Глутамат является основным возбуждающим медиатором в нервной системе млекопитающих. После квантового выделения глутамата в синаптическую щель с последующей активацией постсинаптических рецепторов неиспользованная часть медиатора удаляется транспортерами обратно в пресинаптический нейрон и в глию, где происходит его конвертирование в глутамин с участием фермента глутаминсинтетазы (GS) [7]. Этот фермент локализован преимущественно в цитоплазме астроглиальных клеток и максимальное его количество выявляется в отростках астроцитов, прилегающих к глутаматергическим синапсам [8, 9].

Многочисленные исследования показали, что у больных с патологическими расстройствами, такими как шизофрения, болезнь Альцгеймера, депрессия и эпилепсия, экспрессия гена или активность GS в мозге достоверно ниже нормальных значений, а уровень глутамата повышен [10–12]. Пониженная активность GS в головном мозге обнаружена также у животных с моделью абсансной эпилепсии [13]. Хотя метаболические и функциональные изменения GS в головном мозге при гипероксии не изучались, можно полагать, что активность фермента, регулирующего цикл глутамат/глутамин, может играть значительную роль в нарушении нейротрансмиттерной передачи и развитии судорожного синдрома в гипероксии. Если допустить снижение ферментативной активности GS под влиянием гипербарического кислорода, то вполне ожидаемо повышение содержания глутамата в астроцитах, во внеклеточной среде и уменьшение его клиренса из синаптической щели, а значит и гиперактивацию глутаматергической нейропередачи, приводящую к развитию судорожного синдрома. Одним из способов проверки высказанного предположения может быть использование ингибитора GS с известным механизмом действия. При изучении действия такого ингибитора и гипербарического кислорода можно определить аддитивный или другой вид синергичного действия этих двух факторов, а значит прояснить механизм инактивации фермента в $ГБО_2$. Наиболее известным селективным ингибитором GS является метионинсульфоксимин (L-Methionine sulfoximine, MSO), широко используемый в научных исследованиях. Целью настоящей работы явилось изучение совместного действия гипербарического кислорода и ингибирования глутаминсинтетазы на скорость развития кислородных судорог.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнены на бодрствующих половозрелых крысах-самцах линии Вистар массой 200–250 г. Протокол опытов одобрен Комиссией по этике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН и соответствует этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Ба-

зельской декларации, а также “Международным рекомендациям по проведению медико-биологических исследований с использованием животных” (CIOMS, Geneva, 1985). Всего в опытах было использовано 20 животных, разделенных на четыре группы. Группа 1 – интактные животные (контроль, $n = 5$), группа 2 – животные, подвергнутые воздействию повышенного давления кислорода ($n = 5$), группы 3 и 4 – животные, которым за 6 ч до ГБО$_2$-экспозиции внутрибрюшинно вводили ингибитор GS – L-Methionine sulfoximine (L-S-(3-Amino-3-carboxypropyl)-S-methylsulfoximine, M5379; Sigma-Aldrich, США) в дозе 50 мг/кг ($n = 5$) или 100 мг/кг ($n = 5$) соответственно. Опыты проводили в кислородной барокамере объемом 107 л. Компрессия осуществлялась газовой смесью (93% O_2 + 7% N_2) до давления в камере 5 АТА (атмосфер абсолютных) со скоростью 1 АТА/мин. ГБО$_2$-экспозиция при парциальном давлении кислорода в барокамере 4.65 АТА продолжалась до появления у животных клонических или тонических судорог. При отсутствии судорожных признаков экспозиция продолжалась 100 мин. Время декомпрессии составляло 7 мин. Во время ГБО$_2$-экспозиции проводилась видео-регистрация поведенческих реакций животных.

После окончания декомпрессии, согласно утвержденному протоколу, крыс усыпляли изофлураном, декапитировали, извлекали и фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде головной мозг, затем обезвоживали и заливали в парафин по общепринятой методике [14]. Для иммуноцитохимического анализа готовили серийные фронтальные срезы мозга толщиной 5 мкм. Выявление GS в структурах мозга осуществляли при помощи ее иммуноцитохимического маркирования. Для этого после стандартной процедуры депарафинирования и регидратации проводили высокотемпературное демаскирование с последующим блокированием эндогенной пероксидазы в модифицированном цитратном буфере S1700 (Dako, Дания). Иммуноцитохимическое выявление GS проводили с использованием мышиных моноклональных антител (клон GS-6, разведение 1 : 400; Chemicon, США). Для выявления первичных антител при световой микроскопии использовали набор MACH2 Mouse HRP Polymer (MHRP520 G, H, L; Biocare medical, США) с добавлением крысиной сыворотки для блокировки перекрестной иммунореактивности вторичных антител с иммуноглобулинами крысы. Пероксидазную метку выявляли с использованием диаминобензидинового хромогена (DAB+; Dako, Дания). Часть срезов подкрашивали квасцовым гематоксилином. Анализ препаратов для микроскопии в проходящем свете и фотосъемку выполняли, используя микроскоп Leica DM750 и цифровую фотокамеру Leica ICC50 (Leica, Германия).

Для статистического анализа использовали результаты измерений латентного периода (в минутах) появления различных типов моторных судорожных реакций у животных от начала кислородной экспозиции под давлением 5 АТА. Для количественной оценки развития судорог у крыс в барокамере мы адаптировали известную шкалу судорожных состояний, позволяющую разделить тяжесть приступов на стадии: движение рта и мышц мордочки, кивание головой, клонус передних конечностей, подъем с клонусом передних конечностей и подъем и падение с клонусом передних конечностей [15]. В тех случаях, когда у животных не наблюдалось никаких судорожных проявлений за все время ГБО$_2$-экспозиции, за латентный период принимали время окончания эксперимента, равное 100 мин. Данные анализировали с помощью дисперсионного анализа SigmaPlot 13.0 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, США). Однофакторный дисперсионный анализ применяли для сравнения латентных периодов судорожных реакций при введении искусственного ликвора и препаратов.

Анализ изображений, полученных при микроскопическом исследовании, проводили в программе ImageJ (NIH, США). При этом делали по 5 микрофотографий

каждой исследуемой зоны мозга. Для дальнейшего анализа изображений использовали следующий подход.

На каждой фотографии с помощью инструмента “прямоугольник” с высокой степенью увеличения (объектив ×100, иммерсия) методом случайной выборки отбирали по 10 участков для дальнейшего анализа. В каждом участке средствами программы ImageJ определяли интенсивность окраски элементарной составляющей изображения – пикселя – в градациях белого цвета со значениями от 0 (самый черный) до 255 (самый белый), основываясь на методе использования оттенков белого цвета для визуального отображения диапазона интенсивности [16–18].

Статистическую обработку выполненных измерений осуществляли с использованием программы Rstudio [19]. Для сравнения интенсивности иммуноцитохимической реакции на глутаминсинтетазу в экспериментальных группах был проведен дисперсионный анализ с использованием ANOVA. Оценка значимости различий дисперсий двух случайных выборок проводилась с использованием критерия Фишера. Для оценки величины различий между средними применяли пост-хок тест Тьюки. Достоверность выявляли по парному *t*-критерию Стьюдента. Все данные представлены как $M \pm SD$, при этом в качестве статистически значимых принимали значения $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У крыс контрольной группы в $ГБО_2$ наблюдались различные паттерны моторной судорожной активности, проявляющиеся в определенной стадийной последовательности, подробно описанной нами ранее [20]. Кратко, первые признаки судорожной активности начинались с появления интенсивного груминга, легкого потряхивания головы и передних лап (*стадия 1*). *На стадии 2* наблюдались локальные миоклонии продолжительностью от 5–15 с, которые могли повторяться через несколько минут. При продолжающейся $ГБО_2$-экспозиции у крыс появлялись ритмические сокращения мышц всего тела продолжительностью от 10–25 с, при этом животные вставали на задние лапы и пятились назад (*стадия 3*). *На стадии 4* у животных наблюдались генерализованные клонические или тонические конвульсии. Последняя стадия судорожного синдрома сопровождалась тахикардией, гипервентиляцией и другими признаками расстройств вегетативной нервной системы.

У крыс, которым вводили препарат MSO в дозах 50 или 100 мг/кг за 6 ч до $ГБО_2$, в течение всего периода наблюдения до начала компрессии кислородом в барокамере нарушений поведения и рефлексов позы выявлено не было. При экспозиции под повышенным давлением кислорода 4.65 АТА наибольший просудорожный эффект вызывал MSO в дозе 100 мг/кг. Развитие судорожной активности у крыс с ингибированной GS происходило в той же стадийной последовательности, что и у контрольных животных. Однако выделенные нами стадии развития судорожного синдрома заметно ускорялись по отношению к контрольным значениям (рис. 1).

Время наступления судорог в контрольной группе (четвертая стадия тонико-клонических судорог) составляло 87 ± 8.2 мин, а при дозировке MSO 100 мг/кг было в 8 раз короче (рис. 2).

Распределение глутаминсинтетазы изучалось в головном мозге крыс после их экспонирования под давлением кислорода 4.65 АТА в течение 100 мин. Исследованными областями мозга являлись гиппокамп, область CA1 (stratum radiatum), поясная кора (cortex cingularis) и стриатум (corpus striatum). В указанных зонах мозга были выявлены многочисленные глутаминсинтетаза-иммунопозитивные (GluS+) клетки, которые имели морфологические признаки астроцитов (рис. 3). При визуальном анализе препаратов мозга с помощью световой микроскопии выявляются различия между плотностью распределения GluS+ клеток в контроле

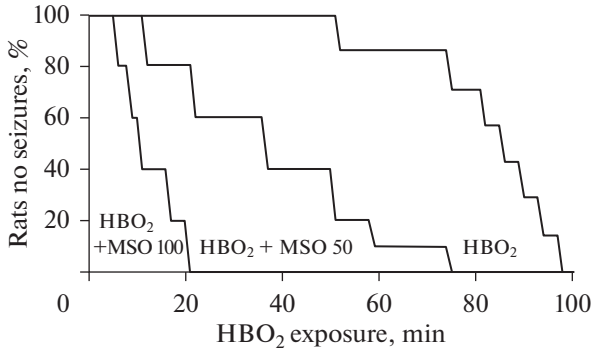


Рис. 1. Время появления судорог у крыс при ГБО$_2$ 4.65 АТА после введения MSO в дозах 50 и 100 мг/кг.

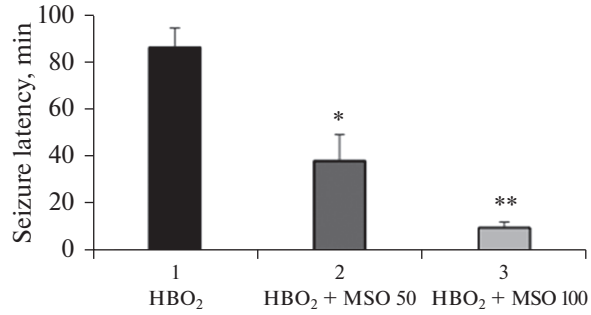


Рис. 2. Латентный период развития кислородных судорог у животных после введения MSO в дозах 50 и 100 мг/кг. * $p < 0.05$ от ГБО$_2$, ** $p < 0.001$ от ГБО$_2$.

(рис. 3*a* и 3*b*), где их присутствовало больше, чем при воздействии ГБО$_2$ (рис. 3*c*–*h*). На всех исследованных срезах плотность распределения GluS+ клеток было больше в коре, чем в гиппокампе. Интенсивность иммуноцитохимической реакции на GS астроцитов варьировала в разных областях мозга, причем наибольшая ее степень отмечена в гиппокампе и поясной коре, а наименьшая – в стриатуме. Плотность распределения GluS+ клеток хорошо коррелировала с распределением нейронов, особенно в зоне CA1 гиппокампа (рис. 3).

Для количественной оценки полученных морфологических данных были проведены измерения интенсивности окраски пикселя на срезах мозга крыс с иммуноцитохимической реакцией на GS (рис. 4). На срезах оценивались области мозга, содержащие только GluS+ клетки (астроциты), неокрашенные области не учитывались. Дисперсионный анализ показал, что средняя интенсивность пикселя в окрашенных участках (иммуноцитохимическая реакция на GS) в исследованных областях мозга крыс зависела от экспериментального воздействия. Попарное сравнение экспериментальных и контрольной групп с использованием пост-хок теста Тьюки показало достоверно значимые различия средней окраски пикселя между интактными животными и животными, подвергавшимися воздействию гипероксии 4.65 АТА, как с предварительным введением MSO, так и без него (табл. 1). Во всех этих случаях контрольные значения превышали данные экспериментальных групп (рис. 4).

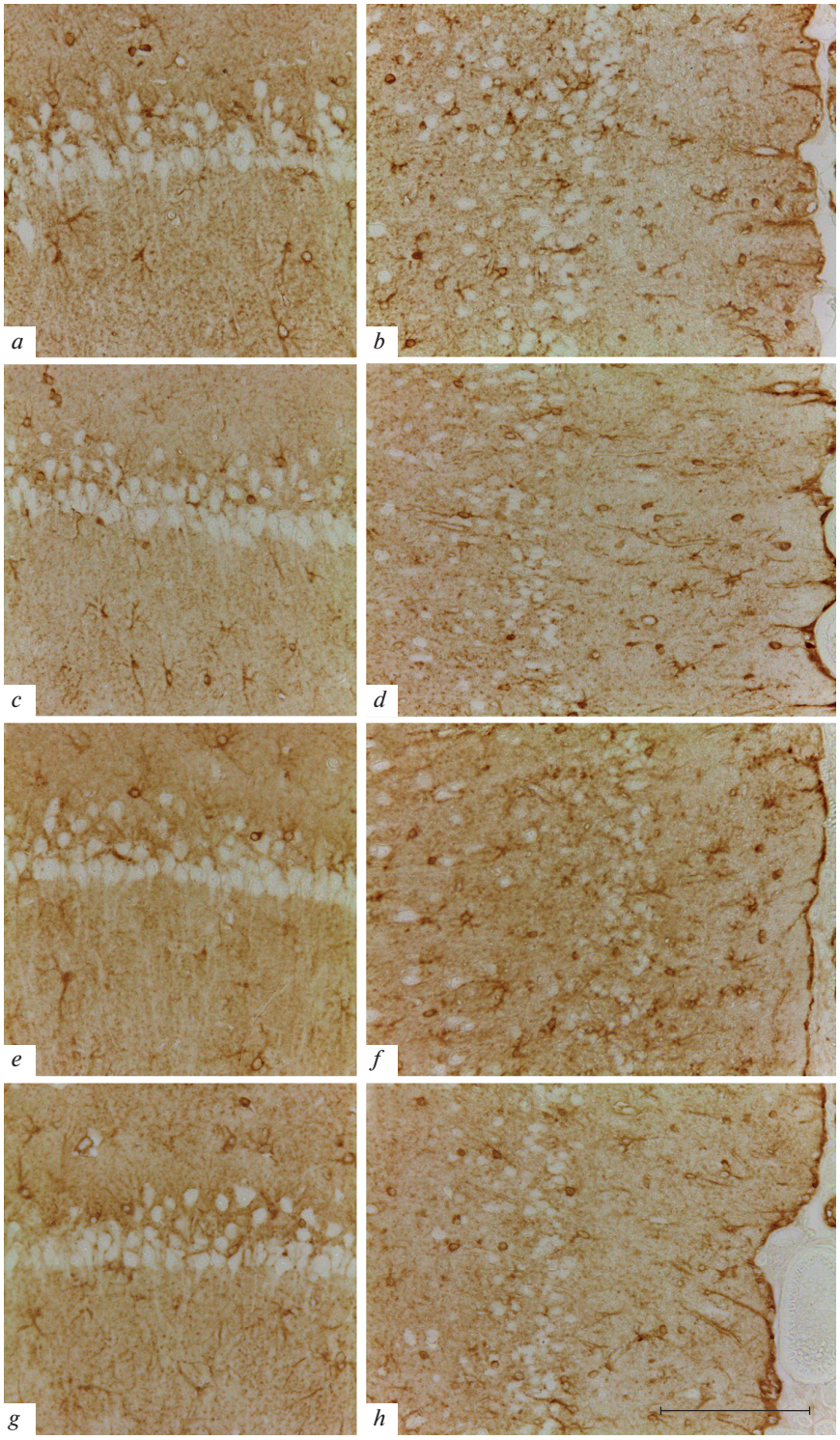

a
b
c
d
e
f
g
h

Рис. 3. Распределение GluS+ клеток на срезах гиппокампа и поясной коры. *a*, *b* –контроль; *c*, *d* – ГБО$_2$ 4.65 АТА; *e*, *f* – ГБО$_2$ + MSO 50 мг/кг; *g*, *h* – ГБО$_2$ + MSO 100 мг/кг. Масштабный отрезок – 100 мкм.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Выполненные исследования свидетельствуют, что развитие судорожного синдрома в экстремальной гипероксии зависит от активности глутаминсинтетазы – ключевого фермента, вовлекаемого в процесс глутаматергической нейропередачи. Данный вывод базируется на 2-х экспериментальных находках: (1) развитие судорог в гипербарической гипероксии коррелирует с понижением содержания GS в мозге, (2) экзогенный селективный ингибитор глутаминсинтетазы, метионинсульфоксимин, ускоряет появление кислородных судорог.

Эпилептиформные судороги у интактных крыс (контрольная группа) в барокамере начинались с локальных миоклоний и заканчивались генерализованными конвульсиями. Продолжительность ГБО$_2$-экспозиции до начала судорог составляла 87 мин, что в 2 раза больше ранее найденных нами величин латентного периода появления конвульсий у такой же линии крыс при 5 АТА чистого кислорода [20]. Причина этого может заключаться в том, что в данных опытах компрессия в барокамере проводилась газовой смесью, содержащей 93% O_2, поэтому при общем давлении в камере 5 АТА, парциальное давление кислорода составляло 4.65 АТА. При дыхании кислородом под таким давлением время появления судорог у крыс составляло также около 90 мин [21], а при 3 АТА O_2 – около 3-х ч [22]. Кислородные судороги сопровождались в наших опытах снижением в головном мозге количества белка GS, определяемого иммуногистохимическим методом с использованием моноклональных антител (рис. 3–4).

Иммуногистохимическая идентификация глутаминсинтетазы в мозге крыс контрольной группы показала, что данный фермент локализуется преимущественно в астроцитах. Интенсивность иммуноцитохимической реакции на GS оказалась неоднородной как в пределах одной структуры, так и в разных отделах головного

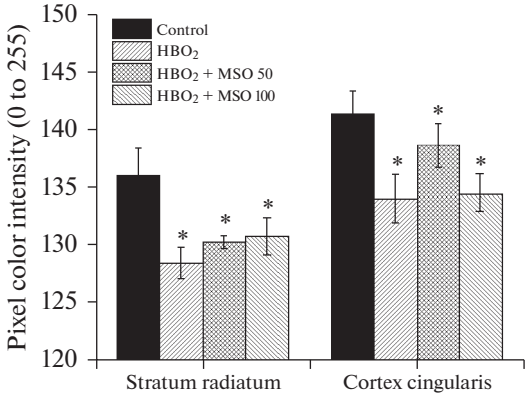


Рис. 4. Содержание глутаминсинтетазы (по интенсивности окрашивания препаратов) в клетках поясной коры и гиппокампа (CA1) мозга крыс. Иммуноцитохимическая реакция на глутаминсинтетазу проводилась у контрольных животных (дыхание воздухом), при ГБО$_2$ 4.65 АТА и при ГБО$_2$ с предварительным введением MSO в дозах 50 и 100 мг/кг. Звездочкой показаны достоверные отличия от контрольных значений, *$p < 0.05$.

Таблица 1. Результаты попарного сравнения содержания GluS+ клеток в мозге крыс контрольной и экспериментальных групп с применением пост-хок теста Тьюки

Область мозга	$ГБО_2$	$ГБО_2$ + MSO 50	$ГБО_2$ + MSO 100	Степени свободы
Поясная кора	F = –7.68 $p < 0.001$	F = –3.17 $p < 0.001$	F = –6.89 $p < 0.001$	1297
Гиппокамп	F = –7.48 $p < 0.001$	F = –5.6 $p < 0.001$	F = –5.26 $p < 0.001$	909

мозга. Причина такой неоднородности остается до конца неясной, но можно допустить, что распределение астроцитов также гетерогенно и зависит от метаболической активности мозговых структур. Отсюда не трудно понять, почему интенсивность окрашивания астроцитов в поясной коре мозга несколько больше, чем в гиппокампе, учитывая высокий уровень окислительного метаболизма в корковых структурах. Одна из возможных причин неравномерного распределения GluS+ клеток может быть связана с гетерогенным распределением глутаматергических нейронов в мозге. Подтверждением тому является наибольшая интенсивность окрашивания GS в области CA1 гиппокампа, где присутствует высокая глутаматергическая активность [23].

Снижение интенсивности иммуноцитохимической реакции астроцитов крыс на GS после гипероксии позволяет предположить, что гипербарический кислород ингибирует синтез этого фермента, что в конечном итоге может сказаться и на его активности. Существуют лишь единичные работы, в которых показано снижение активности GS в ткани мозга после экспозиции крыс в гипербарическом кислороде при давлении 5 АТА [5] и недостоверные изменения активности фермента под давлением кислорода 3 АТА [24]. Доказательством снижения ферментативной активности GS могут служить данные о снижении глутамина в мозге как следствие угнетения его синтеза при $ГБО_2$. Однако целенаправленные измерения глутамина в условиях $ГБО_2$ не проводились и лишь в одной работе показано уменьшение его содержания в мозге после кислородных судорог [25].

Убедительных доказательств изменения активности GS в гипербарической кислородной среде пока не получено, тем не менее существуют, по меньшей мере, три группы косвенных данных, свидетельствующих в пользу ингибирования ферментативной активности GS в экстремальной гипероксии. *К первой группе* следует отнести выявленное в настоящей работе уменьшение количества GS в виде снижения интенсивности ее окрашивания в астроцитах, что может свидетельствовать об угнетении активности фермента гипербарическим кислородом, принимая во внимание, что количество или масса фермента и его активность находятся в прямой зависимости [8]. Более того, показано, что интенсивность иммуноцитохимической реакции коррелирует с активностью фермента, измеряемой стандартными биохимическими методами [26, 27]. *Вторая группа* данных свидетельствует о том, что ферментативная активность GS в мозге снижается при многих заболеваниях, включая шизофрению, эпилепсию и болезнь Альцгеймера, при этом потеря активности GS при указанных патологиях сопровождается повышением концентрации внеклеточного глутамата, приводящего к гиперактивации нейронов [10–12].

И, наконец, *третья группа данных* свидетельствует о снижении активности GS с последующим развитием судорог после ее ингибирования экзогенными препаратами. В частности, метионинсульфоксимин вызывает необратимое ингибирование GS в головном мозге, при этом токсической дозой препарата является 150–180 мг/кг, вследствие введения которой у животных возникают судороги без дополнительных воздействий [28]. В наших исследованиях мы также использовали MSO, причем его введение за 6 ч до кислородной экспозиции в дозе 50 мг/кг вызывало уменьше-

ние времени развития судорог почти в 2 раза, а в дозе 100 мг/кг – в 8 раз по отношению к латентному периоду развития кислородных судорог у животных, которым препарат не вводился. Известно, что в дозе 100 мг/кг MSO на 70% ингибирует активность GS через 6–8 ч после внутрибрюшинного введения [28].

Несмотря на ключевую роль GS в регуляции возбуждающих медиаторных процессов в ЦНС механизмы, которые регулируют ее активность, мало изучены. Показано, что GS фосфорилируется по остатку треонина 301 (T301) в активном сайте фермента с помощью cAMP-зависимой протеинкиназы (PKA). Повышенное фосфорилирование T301 было выявлено у мышей на модели эпилепсии и сопровождалось снижением активности фермента и резким снижением синтеза глутамина [29]. Кроме того, было показано, что белок GS чрезвычайно чувствителен к окислительному стрессу. Исследования ткани мозга пациентов с болезнью Альцгеймера демонстрировали повышение содержания маркеров окислительного стресса и снижение активности GS [30].

Другие данные свидетельствуют об участии нитрозативного стресса в изменении активности GS. Крысы с судорогами, вызванными введением каинатной кислоты, демонстрировали высокую активность NO-синтазы, повышенное образование оксида азота и снижение активности GS в мозге [31]. Оксид азота ковалентно связывается с GS и подавляет активность фермента, модифицируя его нитрозилированием или нитрованием [32]. Индукция судорог у крыс введением пентилентетразола также приводит к нитрованию GS в головном мозге с последующим снижением активности фермента [29]. В этой связи можно предположить, что одной из причин развития кислородных судорог является ингибирование GS путем S-нитрозилирования входящего в ее состав цистеина. Такая возможность была экспериментально доказана [33]. Кроме того, уже известно S-нитрозилирование глутаматдекабоксилазы, приводящее к ингибированию данного фермента и снижению синтеза ГАМК в мозге в условиях гипероксии [6].

Совместное действие кислорода под давлением и MSO, независимо от его концентрации, в наших экспериментах приводило к аддитивному просудорожному эффекту. Такой эффект двух токсических агентов может свидетельствовать о возможности их однонаправленного влияния на ферментативную активность глутаминсинтетазы. Известно, что MSO препятствует образованию активных комплексов с АТФ, что затрудняет ферментативную деятельность GS по превращению глутамата в глутамин, а ингибирование синтеза глутамина сопровождается накоплением в межклеточной среде глутамата, являющегося драйвером развития судорожного процесса [30]. Механизм ингибирования GS связан с SH-группами в молекуле GS [33], а поскольку кислород под давлением повреждает тиоловые группы цистеина глутаматдекарбоксилазы [6], нельзя исключать аналогичного механизма инактивации GS при экстремальной гипероксии.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук и государственного задания Института экспериментальной медицины.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и дизайн эксперимента (И.Т.Д., Д.Э.К.), постановка экспериментов (С.Ю.Ж., Т.Ф.П., О.С.А.), сбор данных (Д.Л.Ц., О.С.А., С.Ю.Ж., Т.Ф.П.), обработка данных (О.В.К., Д.Л.Ц., О.С.А., С.Ю.Ж., Т.Ф.П.), написание и редактирование текста (О.С.А., И.Т.Д., Д.Э.К., О.В.К.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Demchenko IT, Piantadosi CA* (2006) Nitric oxide amplifies the excitatory to inhibitory neurotransmitter imbalance accelerating oxygen seizures. Undersea Hyperb Med 33(3): 169–174.
2. *D'Agostino DP, Putnam RW, Dean JB* (2007) Superoxide (*O^{2-}) production in CA1 neurons of rat hippocampal slices exposed to graded levels of oxygen. J Neurophysiol 98(2): 1030–1041. https://doi.org/10.1152/jn.01003.2006
3. *Wood JD, Watson WJ* (1962) Protective action of gamma-aminobutyric acid against oxygen toxicity. Nature 195: 296. https://doi.org/10.1038/195296a0
4. *Mialon P, Gibey R, Bigot JC, Barthelemy L* (1992) Changes in striatal and cortical amino acid and ammonia levels of rat brain after one hyperbaric oxygen-induced seizure. Aviat Space Environ Med 63(4): 287–291.
5. *Гершенович ЗС, Кричевская АА, Колоушек Я* (1963) Действие кислорода под давлением на активность глутаминсинтетазы в мозгу крыс. Биохимия 28(2): 303–307. [*Gershenovich ZS, Krichevskaya AA, Koloushek Ya* (1963) Effect of hyperbaric oxygen on the activity of glutamine synthetase in the brain of rats. Biochemistry 28(2): 303–307. (In Russ)].
6. *Gasier HG, Demchenko IT, Tatro LG, Piantadosi CA* (2017) S-nitrosylation of GAD65 is implicated in decreased GAD activity and oxygen-induced seizures. Neurosci Lett 653: 283–287. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.05.067
7. *Newman EA* (2003) New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. Trends Neurosci 26: 536–542. https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00237-6
8. *Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD* (1977) Glutamine synthetase: glial localization in brain. Science 195: 1365–1368. https://doi.org/10.1126/science.14400
9. *Norenberg MD* (1979) Distribution of glutamine synthetase in the rat central nervous system. J Histochem Cytochem 27: 756–762. https://doi.org/10.1177/27.3.39099
10. *Robinson SR* (2001) Changes in the cellular distribution of glutamine synthetase in Alzheimer's disease. J Neurosci Res 66: 972–980. https://doi.org/10.1002/jnr.10057
11. *Eid T, Tu N, Lee TS, Lai JC* (2013) Regulation of astrocyte glutamine synthetase in epilepsy. Neurochem Int 63(7): 670–681. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.06.008
12. *Boksha IS, Tereshkina EB, Savushkina OK, Prokhorova TA, Vorobyeva EA, Burbaeva GSh* (2018) Comparative Studies of Glutamine Synthetase Levels in the Brains of Patients with Schizophrenia and Mentally Healthy People. Neurochem J 12(1): 95–101. https://doi.org/10.1134/S1819712418010026
13. *Dutuit M, Didier-Bazes M, Vergnes M, Mutin M, Conjard A, Akaoka H, Belin MF, Touret M* (2000) Specific alteration in the expression of glial fibrillary acidic protein, glutamate dehydrogenase, and glutamine synthetase in rats with genetic absence epilepsy. Glia 32: 15–24. https://doi.org/10.1002/1098-1136(200010)32:1<15::aid-glia20>3.0.co;2-#
14. *Korzhevskii DE, Sukhorukova EG, Kirik OV, Grigorev IP* (2015) Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde. Eur J Histochem 59(3): 233–237. https://doi.org/10.4081/ejh.2015.2530
15. *Racine RJ* (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. Electroencephalography and Clin Neurophysiol 32(3): 281–294. https://doi.org/10.1016/0013-4694(72)90177-0
16. *Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, De A* (2014) IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. PLoS One 9(5): e96801. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096801
17. *Строев СА, Глущенко ТС, Тюлькова ЕИ, Миеттинен МТ, Самойлов МО* (2018) Многократная умеренная гипобарическая гипоксия индуцирует экспрессию тиоредоксина-1

в гиппокампе и неокортексе крыс. Нейрохимия 35(1): 23–33. [*Stroev SA, Glushchenko TS, Tyul'kova EI, Miettinen MT, Samoilov MO* (2018) Multiple mild hypobaric hypoxia induces expression of thioredoxin-1 in the hippocampus and neocortex of rats. Neurochemistry 35(1): 23–33. (In Russ)].
https://doi.org/10.7868/S1027813318010144

18. *Vetrovoy OV, Tyulkova EI, Stratilov VA, Baranova KA, Samoilov MO* (2020) The pattern of DNA and histone H3 methylation in rat brain in response to severe hypobaric hypoxia and hypoxic postconditioning. Cell and Tissue Biol 14(1): 36–42.
https://doi.org/10.1134/S1990519X20010101
19. *RStudio Team* (2020) RStudio: Integrated Development for R. RStudio. PBC. Boston. MA.
20. *Moskvin AN, Platonova TPh, Zhilyaev SYu, Alekseeva OS, Nikitina ER, Demchenko IT* (2020) Blockade of γ-Aminobutyric Acid Transporters in Brain Synapses Protects Against Hyperbaric Oxygen-Induced Convulsions. Neurosci Behav Physiol 50(4): 505–510.
https://doi.org/10.1007/s11055-020-00930-1
21. *Clark JM, Lambertsen CJ, Gelfand R, Troxel AB* (2006) Optimization of oxygen tolerance extension in rats by intermittent exposure. J Appl Physiol 100(3): 869–879.
https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00047.2005
22. *Demchenko IT, Welty-Wolf KE, Allen BW, Piantadosi CA* (2007) Similar but not the same: normobaric and hyperbaric pulmonary oxygen toxicity, the role of nitric oxide. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 293(1): L229–L238.
https://doi.org/10.1152/ajplung.00450.2006
23. *Hertz L, Zielke HR* (2004) Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. Trends Neurosci 27(12): 735–743.
https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.10.008
24. *Savilov PN, Yakovlev VN* (2016) Effect of Liver Damage and Hyperbaric Oxygenation on Glutamine Synthetase of Hepatocytes. Bull Exp Biol Med 60(3): 295–297.
https://doi.org/10.1007/s10517-016-3154-3
25. *Schatz RA, Lal H* (1980) Protection against hyperbaric oxygen toxicity by pargyline, succinic acid and ascorbic acid: Role of brain GABA and brain ammonia. Brain Res Bull 5(3): 781–788.
https://doi.org/10.1016/0361-9230(80)90130-6
26. *Berl S* (1966) Glutamine synthetase. Determination of its distribution in brain during development. Biochemistry 3: 916–922.
https://doi.org/10.1021/bi00867a016
27. *Vogel WH, Heginbothom SD, Boehme DH* (1975) Glutamic acid decarboxylase, glutamine synthetase and glutamic acid dehydrogenase in various areas of human brain. Brain Res 88: 131–135.
https://doi.org/10.1016/0006-8993(75)90960-9
28. *Manning JM, Moore S, Rowe WB, Meister A* (1969) Identification of L-methionine S-sulfoximine as the diastereoisomer of L-methionine SR-sulfoximine that inhibits glutamine synthetase. Biochemistry 8(6): 2681–2685.
https://doi.org/10.1021/bi00834a066
29. *Bidmon HJ, Gorg B, Palomero-Gallagher N, Schleicher A, Haussinger D, Speckmann EJ, Zilles K* (2008) Glutamine synthetase becomes nitrated and its activity is reduced during repetitive seizure activity in the pentylentetrazole model of epilepsy. Epilepsia 49(10): 1733–1748.
https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01642.x
30. *Eid T, Thomas MJ, Spencer DD, Runden-Pran E, Lai JC, Malthankar GV, Kim JH, Danbolt NC, Ottersen OP, de Lanerolle NC* (2004) Loss of glutamine synthetase in the human epileptogenic hippocampus: possible mechanism for raised extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy. Lancet 363: 28–37.
https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)15166-5
31. *Swamy M, Yusof WR, Sirajudeen KN, Mustapha Z, Govindasamy C* (2011) Decreased glutamine synthetase, increased citrulline-nitric oxide cycle activities, and oxidative stress in different regions of brain in epilepsy rat model. J Physiol Biochem 67: 105–113.
https://doi.org/10.1007/s13105-010-0054-2
32. *Kosenko E, Llansola M, Montoliu C, Monfort P, Rodrigo R, Hernandez-Viadel M, Erceg S, Sanchez-Perez AM, Felipo V* (2003) Glutamine synthetase activity and glutamine content in brain: modulation by NMDA receptors and nitric oxide. Neurochem Int 43: 493–499.
https://doi.org/10.1016/s0197-0186(03)00039-1
33. *Raju K, Doulias PT, Evans P, Krizman EN, Jackson JG, Horyn O, Daikhin Y, Nissim I, Yudkoff M, Nissim I, Sharp KA, Robinson MB, Ischiropoulos H* (2015) Regulation of brain glutamate metabolism by nitric oxide and S-nitrosylation. Sci Signal 8(384): ra68.
https://doi.org/10.1126/scisignal.aaa4312

Involvement of Glutamine Synthetase in the Development of Hyperbaric Oxygen Seizures

O. S. Alekseeva[a, b, *], S. Yu. Zhilyaev[a], T. F. Platonova[a], D. L. Tsyba[b], O. V. Kirik[b], D. E. Korzhevskii[b], and I. T. Demchenko[a]

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

[b] *Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia*

**e-mail: osa72@inbox.ru*

Hyperbaric oxygen (HBO_2) causes a toxic effect on the central nervous system through poorly understood mechanisms. The aim of this study was to test the hypothesis that HBO_2 inhibits the activity of glutamine synthetase (GS) in the brain and increases the level of glutamatergic neurotransmission, which leads to the development of epileptiform activity on the EEG and tonic-clonic motor seizures. In experiments on awake rats exposed to oxygen partial pressure of 4.65 ATA the time of onset of seizures was determined in animals with intact and inhibited GS. The enzymatic activity of GS was irreversibly suppressed using the selective inhibitor L-Methionine sulfoximine (MSO). It was found that the development of seizures in hyperbaric hyperoxia correlated with a decrease in the GS content in the brain. MSO accelerated the development of oxygen seizures. The data obtained indicate that the manifestation of convulsive syndrome in extreme hyperoxia depends on the enzymatic activity of GS, a key enzyme that regulates glutamatergic neurotransmission.

Keywords: hyperbaric oxygen, convulsions, glutamatergic system, glutamine synthetase, methionine sulfoximine

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2022, том 108, № 1, с. 121–128

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ЭФФЕКТЫ АНАЛОГА ГОНАДОТРОПИН-РИЛИЗИНГ ГОРМОНА СУРФАГОНА НА БОЛЕВУЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ У КРЫС

© 2022 г.
И. И. Бобынцев[1, *], А. О. Ворвуль[1], М. Е. Долгинцев[1], А. А. Крюков[1]

[1]*Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия*

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

Поступила в редакцию 23.10.2021 г.
После доработки 16.11.2021 г.
Принята к публикации 17.11.2021 г.

Исследовано влияние внутрибрюшинного введения синтетического аналога-агониста гонадотропин-рилизинг гормона сурфагона на спинальные и супраспинальные механизмы формирования болевой чувствительности у интактных и кастрированных крыс-самцов Вистар. Болевое раздражение наносили переменным электрическим током на основание хвоста и регистрировали (в мА) пороги болевой чувствительности и эмоционально-аффективных реакций на боль. Введение сурфагона за 12 мин до начала эксперимента в дозах от 0.004 до 150 мкг/кг оказывало альгическое действие и усиливало вызванное болью эмоционально-аффективное поведение в дозах 0.004; 0.02 и 150 мкг/кг в тесте электрокожного раздражения хвоста. У гонадэктомированных животных через 12 дней после кастрации наблюдалось повышение большинства порогов болевых реакций. При введении пептида кастрированным крысам направленность отмеченных у интактных животных эффектов сохранялась, что свидетельствует об их стероидонезависимом характере. Полученные данные свидетельствуют о наличии как спинальных, так и супраспинальных механизмов алгического действия сурфагона при электроболевом раздражении у крыс.

Ключевые слова: регуляторные пептиды, аналог гонадотропин-рилизинг гормона, сурфагон, боль, кастрация

DOI: 10.31857/S0869813922010034

Регуляторные пептиды обладают свойством физиологической полифункциональности и могут оказывать значительное влияние на болевую реакцию организма на всех уровнях ее формирования. К их числу относится гонадотропин-рилизинг гормон (Гн-РГ), для которого кроме эндокринного действия установлен целый ряд “неклассических” (неэндокринных) нейротропных эффектов: влияние на тревожность [1], агрессивно-оборонительное поведение [2], болевую чувствительность [3]. В выполненных ранее нами исследованиях с использованием различных способов введения, моделей оценки боли и вызванного ею поведения было показано влияние синтетического аналога-агониста Гн-РГ сурфагона на болевую чувствительность и болевые агрессивно-оборонительные реакции, а также зависимость его эффектов от функционального состояния гипоталамо-гипофизарно-гонадальной системы [2, 3]. Однако до настоящего времени оставался невыясненным вопрос о значении спинальных и супраспинальных механизмов в реализации эффектов сурфагона на формирование боли. Актуальность данного исследования также обу-

словлена достаточно широким практическим использованием синтетических аналогов Гн-РГ, в том числе при заболеваниях с болевым синдромом [4–7].

Целью работы являлось выяснение уровней локализации механизмов влияния аналога-агониста Гн-РГ сурфагона на болевую чувствительность у крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена с использованием интактных и кастрированных крыс-самцов Вистар массой 180–200 г, которые содержались при режиме 12 ч – свет, 12 ч – темнота и температуре 22 ± 2°С. Подопытные животные были разделены на 7 групп по 10 особей. Двухстороннюю орхидэктомию выполняли за 12 дней до начала тестирования.

Аналог-агонист Гн-РГ сурфагон (синтезирован в НМИЦ кардиологии МЗ РФ) растворяли в физиологическом растворе NaCl и вводили внутрибрюшинно за 12 мин до начала опыта в дозах 0.004; 0.02; 0.01; 1.5; 15 и 150 мкг/кг. Контрольные группы получали эквивалентные объемы физиологического раствора.

Исследования проводили с 9 до 15 ч. Для определения порогов электрокожной болевой чувствительности крысам на основание хвоста накладывали пластинчатые электроды и наносили раздражение переменным электрическим током с помощью установки Shocker LE 100-26 (Panlab, Испания). Пороги болевых реакций у крыс регистрировали в мА с помощью цифрового мультиметра UT804 (Uni-Trend, КНР). На каждом животном проводили 2 испытания с интервалом 1 мин.

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, директиве 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях, принципам Базельской декларации и рекомендациям Регионального этического комитета при Курском государственном медицинском университете (протокол № 3 от 16.11.2020).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием интегрированной среды разработки для языка R “RStudio Desktop 1.4.1717” (RStudio, PBC, США, https://www.rstudio.com). Полученные результаты представлены в виде диаграмм boxplot. Достоверность выявленных различий между двумя группами определяли с помощью *U*-критерия Манна–Уитни (пакет “coin”), тремя и более – критерия Краскела–Уоллиса с post hoc анализом Данна (пакет “dunn.test”). Различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сурфагон в использованных дозах оказывал существенное алгическое влияние на болевую чувствительность у крыс (рис. 1), выраженность которого зависела от дозы. При введении в дозе 0.004 мкг/кг пептид вызывал значительное снижение порогов как собственно болевых (напряжение хвоста, поворот головы к электродам), так и эмоционально-аффективных реакций (вращение, вокализация, кусание электродов) на 31–37% ($p < 0.05$).

При повышении дозы препарата до 0.02 мкг/кг отмечалось ослабление его эффектов: снижение порогов реакции напряжения хвоста составляло в среднем 17% и не достигало достоверно значимых различий. При этом снижение порогов реакций поворота головы, вокализации и вращения на 21–27% ($p < 0.05$) имело менее выраженный характер, чем в предыдущей группе. Однако эмоционально-аффективная реакция кусания электродов имела самые низкие пороги среди всех подопытных групп.

Увеличение вводимой дозы сурфагона до 0.1 мкг/кг не вызывало значимых изменений исследованных показателей. При этом проявилась тенденция к повыше-

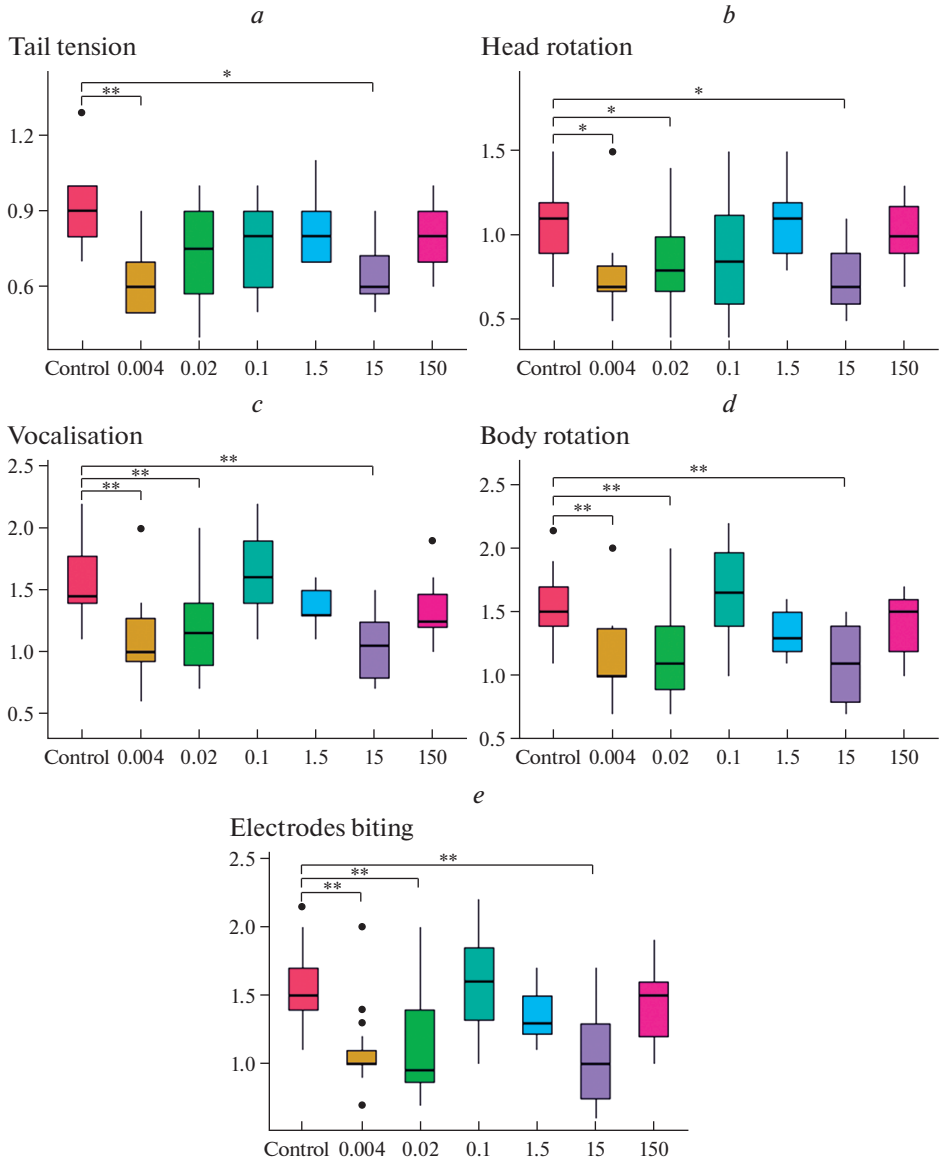


Рис. 1. Величина порогов болевых реакций у крыс в тесте электрокожного раздражения хвоста после внутрибрюшинного введения сурфагона (в мА). (*a*) – напряжение хвоста, (*b*) – повороты головы, (*c*) – вокализация, (*d*) – повороты тела, (*e*) – кусание электродов. Полужирная черта – медиана, ящик – межквартильный размах, усы – крайние значения вариационных рядов, полужирная точка – выброс. * – $p < 0.05$ в сравнении с контрольной группой (по критерию Краскела–Уоллиса с post hoc анализом Данна), ** – $p < 0.01$ в сравнении с контрольной группой (по критерию Краскела–Уоллиса с post hoc анализом Данна).

нию порогов проявления эмоционально-аффективных реакций на фоне снижения болевой чувствительности. Дальнейшее увеличение дозы пептида до 1.5 мкг/кг, как и в предыдущей подопытной группе, не вызывало достоверно значимых сдвигов.

В то же время у крыс, получавших сурфагон в дозе 15 мкг/кг, вновь проявилось алгическое действие, по выраженности сравнимое после введения пептида в минимальных дозах (на 27–36%, $p < 0.05$). Однако в наибольшей дозе – 150 мкг/кг, эффекты пептида вновь нивелировались.

Кастрация вызвала статистически достоверное повышение порогов большинства исследованных реакций на болевое раздражение на 25–33% ($p < 0.05$), кроме реакции поворота головы.

Эффекты пептида у кастрированных животных, как и у контрольных, имели алгическую направленность (рис. 2) с наибольшей выраженностью в наименьшей использованной дозе 0.004 мкг/кг, при которой пороги большинства реакций снижались на 23–30% ($p < 0.05$). При этом следует отметить отсутствие достоверно значимых изменений реакции поворота головы во всех подопытных группах кастрированных крыс. Увеличение вводимой дозы до 0.02 мкг/кг сопровождалось снижением эффектов пептида в отношении эмоционально-аффективных реакций вращения и кусания электродов при выраженном снижении порогов напряжения хвоста (на 38%, $p < 0.05$).

В подопытных группах, которым вводили сурфагон в дозах 0.1 и 1.5 мкг/кг, изменения всех исследованных реакций были слабовыраженными и не достигали достоверных различий.

Дальнейшее увеличение вводимой дозы сурфагона вновь сопровождалось проявлением его статистически значимых эффектов. Так, после введения сурфагона в дозе 15 мкг/кг наблюдалось снижение порогов реакции вращения (на 13%, $p < 0.05$), а в дозе 150 мкг/кг снижение порогов как спинальной реакции напряжения хвоста, так и супраспинальных эмоционально-аффективных проявлений в виде вокализации и вращения (на 13–25%, $p < 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные в работе результаты показали алгическое действие сурфагона как у интактных, так и у кастрированных крыс, которое имело выраженный дозозависимый характер. Установленное наличие действия пептида в наименьших и наибольших использованных дозах при отсутствии в промежуточных является проявлением *U*-эффекта, характерного для регуляторных пептидов. Данный эффект связывают с активацией при различных дозах разных систем вторичных мессенджеров [8, 9] и, следовательно, с возможностью активации различных нервных структур.

Использованная модель боли при раздражении путем фиксации электродов на хвост позволяет в одном опыте оценить спинальные (сегментарные) и супраспинальные (надсегментарные) болевые реакции, тогда как при температурном воздействии подобные результаты можно получить только при использовании двух тестов – “горячая пластина” и “отдергивание хвоста” [10]. Механизмы реакции напряжения хвоста локализованы на спинальном (сегментарном) уровне, остальные проявления болевого поведения имеют супраспинальное происхождение [11]. В выполненном нами ранее исследовании сурфагон в аналогичном интервале доз в тесте “горячая пластина” оказывал у интактных мышей-самцов преимущественно анальгетическое действие [3]. В основе этих различий могут находиться данные о том, что механизмы формирования боли имеют ряд нейрохимических особенностей на сегментарном уровне в зависимости от вида раздражителя. Так, при температурном воздействии в передаче болевых импульсов на нейроны задних рогов спинного мозга принимают участие соматостатин, нейрокинин А и нейрокинин$_2$-рецепторы [12, 14]. При электрокожном раздражении происходит возбуждение механических ноцицепторов [13] и на спинальном уровне в болевой трансмиссии участвуют вещество Р и нейрокинин$_1$-рецепторы [12, 14]. Данные особенности сег-

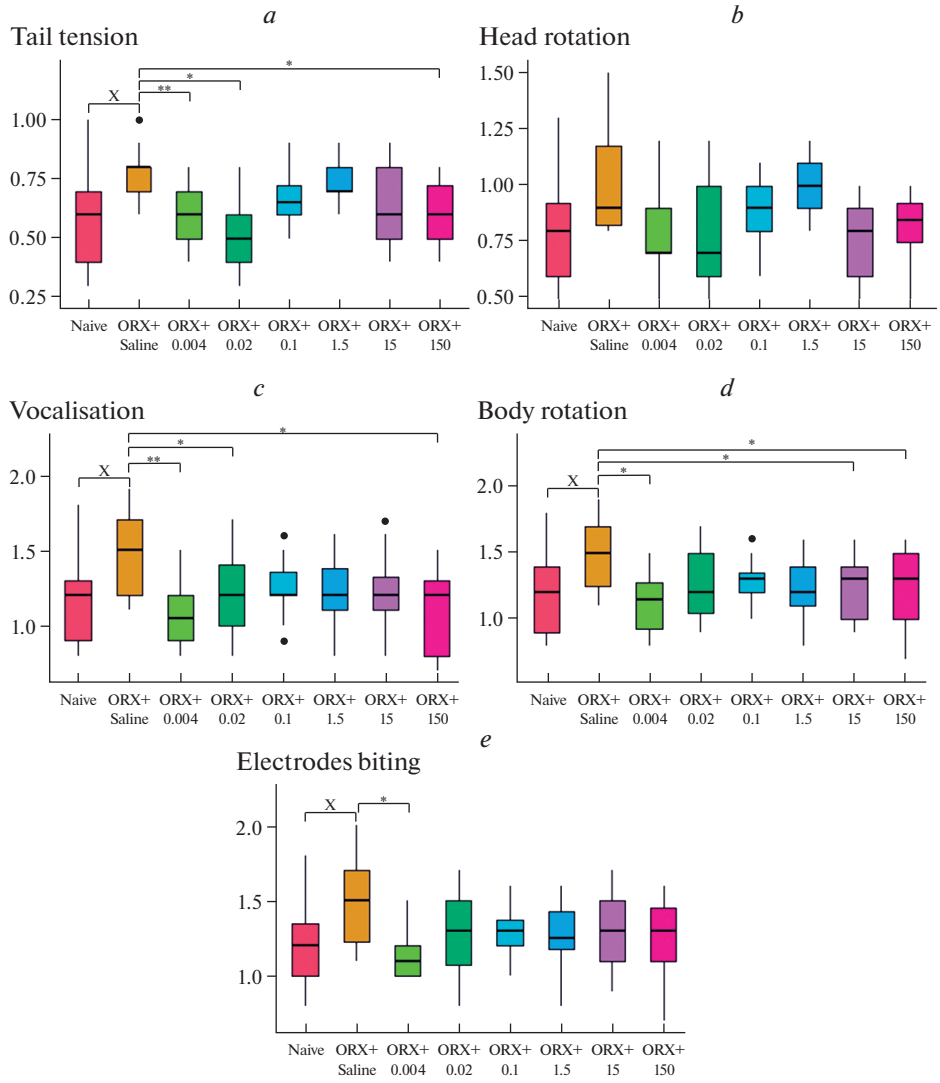


Рис. 2. Величина порогов болевых реакций у кастрированных крыс в тесте электрокожного раздражения хвоста после внутрибрюшинного введения сурфагона (в мА). (*a*) – напряжение хвоста, (*b*) – повороты головы, (*c*) – вокализация, (*d*) – повороты тела, (*e*) – кусание электродов. Полужирная черта – медиана, ящик – межквартильный размах, усы – крайние значения вариационных рядов, полужирная точка – выброс. ORX – кастрация, x – $p < 0.05$–0.01 в сравнении с контрольными животными (по *U*-критерию Мана–Уитни). * – $p < 0.05$ в сравнении с контрольной группой кастрированных животных (по критерию Краскела–Уоллиса с post hoc анализом Данна). ** – $p < 0.001$ в сравнении с контрольной группой кастрированных животных (по критерию Краскела–Уоллиса с post hoc анализом Данна).

ментарных ноцицептивных механизмов могут являться основой различий эффектов сурфагона при электрокожном и температурном раздражении, а также свидетельствовать о наличии сложного пептидергического механизма болевой нейротрансмиссии на спинальном уровне. Согласно представлениям о континууме регуляторных пептидов как функционально-непрерывной совокупности [15], Гн-РГ

может иметь иерархические взаимоотношения с участвующими в спинальной болевой нейротрансмиссии пептидами (соматостатин, вещество Р, нейрокинин А, кальцитонин-ген родственный пептид), а его аналоги-агонисты – влиять на данные процессы. Также необходимо учитывать, что входящая в структуру молекулы сурфагона аминокислота L-аргинин является источником оксида азота, который участвует в болевой нейротрансмиссии в спинном мозге [16].

При анализе полученных данных обращает внимание недостоверное ослабление спинального болевого рефлекса после введения сурфагона интактным животным в дозе 0.02 мкг/кг на фоне ярко выраженных эмоционально-аффективных реакций. Подобный характер действия пептида позволяет заключить, что механизмы их реализации находятся преимущественно на супраспинальном уровне и согласуется с описанной ранее активацией агрессивно-оборонительного поведения при неизбегаемом электроболевом раздражении [2] и анксиогенным действием сурфагона [1]. Отмеченное при этом усиление спинальных болевых рефлексов может проявляться как вследствие действия пептида непосредственно на сегментарном уровне, так и за счет ослабления нисходящих антиноцицептивных влияний из головного мозга. Известно, что в центральном сером веществе среднего мозга установлено связывание Гн-РГ и его аналогов со специфическими рецепторами [17, 18], поэтому изменение функционального состояния нейронов данной структуры может оказывать существенное влияние на болевые реакции. Кроме того, рецепторы к Гн-РГ локализованы в гиппокампе и миндалевидном комплексе [19] и связывание с ними может оказывать влияние на супраспинальные механизмы формирования боли.

Повышение порогов болевых реакций после кастрации во многом может быть связано с усилением активности серотонинергической системы [20], которая играет важную роль в активации сегментарных антиноцицептивных механизмов. О стероидонезависимом характере действия сурфагона свидетельствует сохранение направленности и выраженности его алгического действия после кастрации. Обращает внимание изменение болевых реакций после введения сурфагона в дозе 0.02 мкг/кг кастрированным животным (значительное повышение болевой чувствительности на фоне ослабления эмоционально-аффективных поведенческих реакций), противоположное эффекту пептида в данной дозе у интактных животных. Преобладание ослабления супраспинальных реакций отмечалось и после введения кастрированным крысам пептида в дозе 150 мкг/кг. Полученные на кастрированных животных данные показывают значение функционального состояния гипоталамо-гипофизарно-гонадальной системы в реализации эффектов сурфагона в отношении ноцицептивной чувствительности и вызванного болью поведения, а также свидетельствуют об участии пептида в данных процессах как на спинальном, так и супраспинальном уровнях. Следует отметить, что сурфагон у кастрированных мышей в тесте “горячая пластина” также оказывал алгическое действие [3].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, аналог-агонист Гн-РГ сурфагон при внутрибрюшинном введении в интервале доз от 0.004 до 150 мкг/кг оказывал у крыс алгическое действие и усиливал вызванное болью эмоционально-аффективное поведение в дозах 0.004; 0.02 и 150 мкг/кг в тесте электрокожного раздражения хвоста. У гонадэктомированных животных наблюдалось повышение большинства порогов болевых реакций. При введении пептида через 12 дней после кастрации направленность отмеченных у интактных животных эффектов сохранялась, что свидетельствует об их стреероидонезависимом характере. Полученные данные свидетельствуют о наличии как спинальных, так и супраспинальных механизмов алгического действия сурфагона при электроболевом раздражении у крыс.

Результаты проведенных исследований расширяют представления о физиологических эффектах регуляторных пептидов и их полифункциональности, а данные о повышении болевой чувствительности и усилении эмоционально-аффективных реакций на боль необходимо учитывать при клиническом применении аналогов-агонистов Гн-РГ.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена за счет средств Курского государственного медицинского университета.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн исследования (И.И.Б.); сбор, обработка материала, статистический анализ данных (А.О.В., М.Е.Д., А.А.К.); написание текста (И.И.Б., М.Е.Д.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Masalova OO, Kazakova SB, Savateeva-Lyubimova TN, Sivak KV, Sapronov NS, Shabanov PD* (2019) Effect of Surfagon on Open Field and Elevated Plus Maze Behavior of Gonadectomized and Non-Gonadectomized Male Rats. Bull Exp Biol Med 168(1): 52–54. https://doi.org/10.1007/s10517-019-04644-4
2. *Severianova LA, Bobyntsev II* (1995) Neurotropic effects of an luliberin analog administered intraventricularly to rats with varying sensitivity to ethanol. Bull Exp Biol Med 119(2): 120–123. https://doi.org/10.1007/BF02445854
3. *Bobyntsev II, Sever'yanova LA, Kryukov AA* (2006) Effect of gonadotropin-releasing hormone analogue on thermal nociception in mice. Bull Exp Biol Med 141(2): 193–196. https://doi.org/10.1007/s10517-006-0125-0
4. *Della Corte L, Barra F, Mercorio A, Evangelisti G, Rapisarda AMC, Ferrero S, Bifulco G, Giampaolino P* (2020) Tolerability considerations for gonadotropin-releasing hormone analogues for endometriosis. Expert Opin Drug Metab Toxicol 16(9): 759–768. https://doi.org/10.1080/17425255.2020.1789591
5. *Rossi L, Pagani O* (2018) The role of gonadotropin-releasing-hormone analogues in the treatment of breast cancer. J Womens Health (Larchmt) 27(4): 466–475. https://doi.org/10.1089/jwh.2017.6355
6. *Ortmann O, Weiss JM, Diedrich K* (2002) Gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and GnRH agonists: mechanisms of action. Reprod Biomed Online 5(1): 1–7. https://doi.org/10.1016/s1472-6483(11)60210-1
7. *Bereket A* (2017) A critical appraisal of the effect of gonadotropin-releasing hormon analog treatment on adult height of girls with central precocious puberty. J Clin Res Pediatr Endocrinol 9(2): 33–48. https://doi.org/10.4274/jcrpe.2017.S004
8. *Konda Y, Gantz I, DelValle J, Shimoto Y, Miwa H, Yamada T* (1994) Interaction of dual intracellular signaling pathways activated by the melanocortin-3 receptor. J Biol Chem 269(18): 13162–13166.
9. *Buggy JJ* (1998) Binding of alpha-melanocyte-stimulating hormone to its G-protein-coupled receptor on B-lymphocytes activates the Jak/STAT pathway. Biochem J 331(Pt 1): 211–226. https://doi.org/10.1042/bj3310211
10. *Воронина ТА, Гузеватых ЛС* (2012) Методические рекомендации по изучению анальгетической активности лекарственных средств. В кн.: Миронов АН (отв ред) Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. М. Гриф и К. 197–218. [*Voronina TA, Guzevatykh LS* (2012) Methodological recommendations for the study of analgesic activity of drugs. In: Guidelines for conducting preclinical studies of medicines. Mironov AN (ed) Vol 1. M. Grif and K. 197–218. (In Russ)].
11. *Severyanova LA, Lazarenko VA, Plotnikov DV, Dolgintsev ME, Kriukov AA* (2019) L-Lysine as the molecule influencing selective brain activity in pain-induced behavior of rats. Int J Mol Sci 20(8): 1899. https://doi.org/10.3390/ijms20081899

12. *Zieglgänsberger W* (2019) Substance P and pain chronicity. Cell Tissue Res 375(1): 227–241. https://doi.org/10.1152/10.1007/s00441-018-2922-y
13. *Treede RD, Margel W* (1995) Modern concepts of pain and hyperalgesia beyond the polymodal C-nociceptor. Physiology 10(5): 216–228. https://doi.org/10.1152/physiologyonline.1995.10.5.216
14. *Harris JA, Faust B, Gondin AB, Dämgen MA, Suomivuori CM, Veldhuis NA, Cheng Y, Dror RO, Thal DM, Manglik A* (2021) Selective G protein signaling driven by substance P-neurokinin receptor dynamics. Nat Chem Biol. https://doi.org/10.1038/s41589-021-00890-8
15. *Koroleva SV, Nikolaeva AA, Ashmarin IP* (2012) Types of bioinformatic programs in the continuum of regulatory peptides and non-peptide mediators. Traits of interaction of dopamine and serotonin systems. Neurochem J 6(2): 132–143.
16. *Severyanova LA, Bobyntsev II, Plotnikov DV, Lyashev YD* (2001) Nitric oxide synthesis in the brain mediates neuro-peptide effects on pain sensitivity and pain-induced aggression. Analgesia 5(3/4): 223–237.
17. *Jennes L, Conn PM* (1994) Gonadotropin-releasing hormone and its receptors in rat brain. Front Neuroendocrinol 15(1): 51–77. https://doi.org/10.1006/frne.1994.1003
18. *Jennes L, Eyigor O, Janovick JA, Conn PM* (1997) Brain gonadotropin releasing hormone receptors: localization and regulation. Recent Prog Horm Res (52): 475–491.
19. *Leblanc P, Crumeyrolle M, Latouche J, Jordan D, Fillion G, L'Heritier A, Kordon C, Dussaillant M, Rostène W, Haour F* (1988) Characterization and distribution of receptors for gonadotropin-releasing hormone in the rat hippocampus. Neuroendocrinology 48(5): 482–488. https://doi.org/10.1159/000125053
20. *Nayebi AR, Ahmadiani A* (1999) Involvement of the spinal serotonergic system in analgesia produced by castration. Pharmacol Biochem Behav 64(3): 467–471. https://doi.org/10.1016/s0091-3057(99)00113-6

Effects of Gonadotropin-Releasing Hormone Analogue Surfagon on Rats' Pain Sensitivity

I. I. Bobyntsev[a, *], A. O. Vorvul[a], M. E. Dolgintsev[a], and A. A. Kriukov[a]

[a] *Kursk State Medical University, Kursk, Russia*
**e-mail: bobig@mail.ru*

We investigated the effects of synthetic analogue-agonist of gonadotropin-releasing hormone surfagon administered intraperitoneally on the spinal and supraspinal mechanisms of pain formation in naïve and castrated male Wistar rats. Painful irritation was inflicted with alternating current on the tail base and pain sensitivity thresholds (in mA) and emotional-affective reactions were registered. Surfagon administration 12 min before the experiments at doses 0.004–150 μg/kg demonstrated algic activity and exaggerated pain-induced emotional-affective behaviour at doses 0.004, 0.02, and 150 μg/kg. We observed higher pain thresholds in rats on the 12th day after castration. When the peptide was administered to castrated rats, the directivity of the effects observed in intact animals was same, which indicates their steroid-independent nature. Data obtained demonstrates the presence of both spinal and supraspinal mechanisms of Surfagon algic activity in rats when electrocutaneous irritation.

Keywords: regulatory peptides, gonadotropin-releasing hormone analogue, Surfagon, pain, castration